

Tesis doctoral

**INFLUENCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DIETÉTICOS Y DEL AMBIENTE EN EL
DESARROLLO DE COLITIS ESPONTÁNEA EN
RATONES IL-10(-/-)**

Elisabet Pedrosa Tapias
Directores: Dr. MA Gassull i Duró
Dr. Josep Mañé Almero
Tutora: Dra. Marta Vives Pi

Programa de Doctorado de Inmunología
Departamento Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Facultad de Medicina
UAB
2008

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo en el "Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol" (Badalona) con la financiación FIS PI021039.

A mis padres,
por mostrarme lo más importante de la vida
y por su cariño incondicional

A David,
por compartir su vida conmigo

*"...se trata de querer cosas sencillas, amables, livianas,
para que te dé tiempo de miraras, una a una"*
Marta Pérez Martín

Agradecimientos

A mis directores de tesis, al Dr Gassull, Jefe del Servicio de Digestivo en el momento de mi llegada al "Hospital Universitari Germans Trias i Pujol", y actual director del "Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol", por haberme dejado formar parte de su equipo y por su gran interés en la investigación básica. Al Dr Mañé por su confianza, su gran esfuerzo y motivación en construir un equipo de investigación como el que hoy tiene. De todos estos años de trabajo no solo me quedo con lo aprendido del científico sino también con lo que me ha aportado tu amistad. Has conseguido cambiar mi forma de ver las cosas, ahora creo que todo es posible si se trabaja en ello con constancia, con convicción y sobretodo con imaginación y mucha ilusión. Eres el optimismo personificado y eso se agradece en el día a día, especialmente en nuestro trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, y muy especialmente a Violeta Lorén y a Lourdes Fluvà por todo el trabajo realizado para esta tesis, sin vosotras hoy no se habría acabado. A Pat Romero y Cris Sánchez por los nuevos aires que han traído y por la gran ayuda que ha supuesto su trabajo en los meses de escritura de esta tesis. Al Dr Ramon Bartolí y a Gemma Òdena por la colaboración técnica continua y por sus consejos. A la Dra Pilar Milke por su ayuda como traductora y por las correcciones, ¡muchacha suerte en esta nueva etapa!. A Rebeca Santaolalla por el trabajo compartido, por tantas validaciones y por tantos momentos de risas, a ti también mucha suerte al otro lado del océano, ¡te echaremos de menos!. Gracias a todos por los buenos momentos compartidos, los de trabajo y los del tiempo libre, que también han sido y serán muchos, y que siempre van acompañados de muchas, muchas risas.

A Margarita Ortiz por su trabajo en el estabulario y por amenizar tantas horas de laboratorio.

A los clínicos del Servicio de Digestivo, al Dr Planas, actual Jefe del Servicio de Digestivo, por seguir apostando por la investigación básica. A las Dras Miriam Mañosa y Yamile Zabana por su colaboración y su gran accesibilidad, al Dr

Eugeni Domènech por su interés en la investigación, y muy especialmente al Dr Eduard Cabré por toda la colaboración en la estadística y las discusiones de esta tesis.

A Marco A. Fernández por toda su ayuda con la citometría y sobretodo por su buena y gran disponibilidad en todo momento.

A la Dra Isabel Ojanguren y a Ángela Fernández por sus análisis anatomopatológicos y por su colaboración en las técnicas inmunohistoquímicas.

A los veteranos compañeros de estabulario, UTE e Inmuno, por estar siempre dispuestos a ayudar y colaborar, y a los actuales compañeros del instituto por la interacción que se establece a diario y que siempre es positiva.

A mi familia que ha valorado mi trabajo y siempre me ha apoyado y animado a continuar. Especialmente a mis padres por haberme inculcados la constancia, la paciencia y la perseverancia como grandes valores, tan importantes para este trabajo. A David por todo lo vivido juntos y por haber "sufrido" este tramo final que ha sido duro, por su comprensión y su ánimo. A mis amigos y especialmente a "Prin" por entender mi ausencia reiterada en los últimos meses y estar siempre ahí.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ACRÓNIMOS | 1 |
| ÍNDICE FIGURAS | 3 |
| ÍNDICE TABLAS | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1. Enfermedad inflamatoria intestinal | 9 |
| 1.1. Descripción y definición de la enfermedad inflamatoria intestinal | 11 |
| 1.1.1. Colitis Ulcerosa | 11 |
| 1.1.2. Enfermedad de Crohn | 12 |
| 1.1.3. Colitis indeterminada | 14 |
| 1.1.4. Colitis microscópica | 14 |
| 1.2. Epidemiología | 14 |
| 1.3. Tratamientos | 16 |
| 1.4. Evolución y complicaciones de la enfermedad inflamatoria intestinal | 18 |
| 2. Homeostasis intestinal | 21 |
| 2.1. Estructura y función intestinal | 23 |
| 2.2. Compartimiento extraepitelial | 24 |
| 2.2.1. Moco intestinal | 24 |
| 2.2.2. Control químico del ecosistema intestinal | 25 |
| 2.2.3. Flora intestinal | 27 |
| 2.3. Compartimiento epitelial | 29 |
| 2.3.1. Células del epitelio intestinal | 31 |
| 2.3.2. "Toll-Like Receptors" | 35 |
| 2.3.3. " Nucleotide-binding Oligomerization Domain" | 38 |
| 2.4. Compartimiento subepitelial | 38 |
| 2.4.1. "Gut Associated Lymphoid Tissue". | 39 |
| 2.4.2. Células del compartimiento subepitelial. | 39 |
| 2.5. Interacción huésped-ambiente | 43 |
| 2.5.1. Tolerancia e inflamación constitutiva. | 43 |
| 2.5.2. Activación de la respuesta inmune. | 44 |

| | |
|---|-----------|
| A. Respuesta efectora. | 46 |
| B. Regulación celular | 49 |
| C. Memoria celular | 51 |
| 2.5.3. Control de la inflamación: balance entre proliferación y apoptosis | 52 |
| 3. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal | 55 |
| 3.1. Factores implicados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal | 57 |
| 3.2. Alteraciones de la flora intestinal | 59 |
| 3.3. Alteraciones del reconocimiento y procesamiento bacteriano | 62 |
| 3.4. Alteraciones de la barrera intestinal | 64 |
| 3.5. Alteraciones inmunológicas | 66 |
| 3.5.1. Inmunidad celular | 66 |
| 3.5.2. Inmunidad humoral | 70 |
| 3.6. Alteraciones de la apoptosis | 70 |
| 3.7. Patrón inmunológico de la Enfermedad de Crohn | 71 |
| 3.8. Patrón inmunológico de la Colitis Ulcerosa | 73 |
| 4. Factores ambientales relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal | 75 |
| 4.1. Estilo de vida | 77 |
| 4.2. Influencia de la dieta | 78 |
| 4.2.1. Componentes dietéticos | 78 |
| 4.3. Terapias de base dietética | 79 |
| 4.4. La grasa dietética e inflamación intestinal | 81 |
| 4.4.1. Funciones de los ácidos grasos | 82 |
| 4.4.2. Ácidos grasos saturados | 85 |
| 4.4.3. Ácidos grasos monoinsaturados | 87 |
| 4.4.4. Ácidos grasos poliinsaturados | 87 |

| | |
|---|-----|
| 5. Modelos experimentales de la enfermedad inflamatoria intestinal | 89 |
| 5.1. Modelos <i>in vivo</i> inducidos por agentes exógenos | 91 |
| 5.2. Modelos endógenos de colitis experimental | 93 |
| 5.2.1. Modelos espontáneos | 93 |
| 5.2.2. Modelos transgénicos | 94 |
| 5.2.3. Colitis inducida mediante transferencia de linfocitos | 94 |
| 5.2.4. Modelos “knock out” | 95 |
| | |
| 6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 99 |
| Estudio 1: Evaluación de los cambios inmunológicos a nivel intestinal en ratones IL10(-/-) mantenidos en dos condiciones ambientales distintas | 101 |
| Estudio 2: Efecto de la substitución del 50% de la fracción de grasa de la dieta con MCT sobre el desarrollo de colitis en el modelo de ratones IL10 (-/-) | 103 |
| | |
| 7. MATERIAL Y MÉTODOS | 105 |
| 7.1. Animales de experimentación | 107 |
| 7.2. Dietas | 108 |
| 7.3. Reactivos y kits | 108 |
| 7.4. Diseño experimental | 109 |
| 7.5. Sacrificio y recogida de muestras | 110 |
| 7.6. Determinación de parámetros en muestras biológicas | 111 |
| 7.6.1. Análisis histológico | 111 |
| 7.6.2. Relación peso/longitud del colon | 112 |
| 7.6.3. Incidencia de colitis | 112 |
| 7.6.4. Cuantificación de la producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo de explantes | 112 |

| | |
|--|------------|
| 7.6.5. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de llama (GC/FID) y cromatografía de gases con detector de masas cuadrupolar (GC-MS) | 115 |
| A. Procesamiento de lisados eritrocitarios | 116 |
| B. Procesamiento precromatográfico | 117 |
| C. Proceso cromatográfico para las membranas eritrocitarias (GC-FID) | 118 |
| D. Proceso cromatográfico para el análisis de las mucosas intestinales por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG-EM) | 118 |
| 7.6.6. Aislamiento de linfocitos intraepiteliales | 119 |
| 7.6.7. Aislamiento de linfocitos de lámina propia | 119 |
| 7.6.8. Análisis fenotípico y apoptótico de los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia mediante citometría de flujo. | 120 |
| 7.6.9. Determinación de la apoptosis mediante ISOL | 122 |
| 7.6.10. Determinación de CD3+, TLR2 y MyD88 por inmunohistoquímica | 123 |
| 7.6.11. Cuantificación de la expresión de TLR2 y TLR9 | 125 |
| A. Extracción RNA | 125 |
| B. Cuantificación y valoración integridad | 125 |
| C. Retrotranscripción | 126 |
| D. PCR en tiempo real | 127 |
| E. Cuantificación absoluta mediante recta estándar | 128 |
| F. Condiciones PCR en tiempo Real | 129 |
| 7.7. Análisis estadístico | 130 |
| | |
| 8. Estudio 1 | 131 |
| 8.1. Resultados estudio 1 | 133 |
| 8.2. Discusión estudio 1 | 143 |
| 8.3. Conclusiones estudio 1 | 151 |

| | |
|------------------------------------|-----|
| 9. Estudio 2 | 155 |
| 9.1. Resultados estudio 2 | 157 |
| 9.2. Discusión estudio 2 | 169 |
| 9.3. Conclusiones estudio 2 | 177 |
| | |
| 10. CONCLUSIONES GENERALES | 181 |
| | |
| 11. ANEXO | 185 |
| | |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 189 |

ACRÓNIMOS

AG Ácido graso
AGCC Ácido graso cadena corta
AGCM Ácido graso cadena media
AGCL Ácido graso cadena larga
AGI Ácido graso insaturado
AGMI Ácido graso monoinsaturado
AGPI Ácido graso poliinsaturado
AGS Ácido graso saturado
AINE antiinflamatorios no esteroideos
APC "Antigen Presenting Cells"
BCR "B cell receptor"
CU Colitis Ulcerosa
DSS Dextran Sulfato de Sodio
EC Enfermedad de Crohn
EII Enfermedad inflamatoria intestinal
FAO "Food and Agriculture Organization"
FasL Ligando de Fas
GALT, "Gut Associated Lymphoid Tissue"
GF "Germ free"
H&E Hematoxilina y Eosina
HKG "House Keeping Gen"
IEL Linfocitos intraepiteliales
Ig Inmunoglobulina
IL Interleuquina
KO "Knock out"
LPL Linfocitos de lámina propia
LPS Lipopolisacárido
MAPK "Mitogen Activated Protein Kinase"
MCT "Medium Chain Triglyceride"
MELC "Multi-Epitope-Ligand Cartographie",
MHC "Major Histocompatibility Complex"
MyD88 "Myeloid differentiation protein"

NF κ B "Nuclear Factor-kappa B"
NK "Natural killer"
NKT "Natural Killer T lymphocyte"
NOD "Nucleotide-binding Oligomerization Domain"
Pb pares de bases
PKC "Protein Kinase C"
PPAR, "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors"
PRR "Pattern-Recognition Receptors"
SPF " Specific Pathogen Free"
Tc Linfocitos T citotóxicos
Th linfocitos T "helpers"
TJ "Tight Junctions"
TLR "Toll like Receptors"
Tm Temperatura de disociación
TNBS Trinitrobenceno sulfónico
WT "Wild type"

ÍNDICE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Biopsias de la mucosa de CU activa, EC activa y mucosa normal | 13 |
| Figura 2. Estructura del intestino grueso | 23 |
| Figura 3. Corte transversal del colon. Biopsia mucosa normal | 29 |
| Figura 4. Uniones celulares | 30 |
| Figura 5. Microvellosidades, cripta de Lieberkühn y tipos celulares del epitelio | 33 |
| Figura 6. "Toll like Receptor" y vías de señalización | 37 |
| Figura 7. Compartimiento subepitelial | 41 |
| Figura 8. Activación y reclutamiento celular | 45 |
| Figura 9. Células T | 47 |
| Figura 10. Células T reguladoras | 50 |
| Figura 11. Vías apoptóticas | 53 |
| Figura 12. Factores implicados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal | 58 |
| Figura 13. Modelo de la dinámica celular de la Enfermedad de Crohn. | 72 |
| Figura 14. Modelo de la dinámica celular de la Colitis Ulcerosa | 74 |
| Figura 15. Estructura química de los ácidos grasos | 81 |
| Figura 16. Síntesis y degradación de ácidos grasos | 83 |
| Figura 17. Síntesis de eicosanoides | 84 |
| Figura 18. Diseño experimental | 110 |
| Figura 19. Sección de la placa para la valoración de citoquinas mediante "Searchlight Mouse inflammatory cytokine assay kit" | 113 |
| Figura 20. Esquema del cromatógrafo de gases | 115 |
| Figura 21. Esquema del procedimiento precromatográfico | 117 |
| Figura 22. "Plots" de citometría de flujo para validación extracción LPL | 120 |
| Figura 23. Esquema del proceso "ApoTag" | 122 |
| Figura 24. Gel de agarosa para la valoración de la integridad del RNA | 126 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25. Recta estándar para cuantificación absoluta mediante PCR en tiempo real | 129 |
| Figura 26. Peso corporal de los ratones del estudio 1 | 135 |
| Figura 27. Lesión intestinal y relación peso/longitud del colon | 138 |
| Figura 28. Porcentaje de IEL y LPL CD3 ⁺ | 138 |
| Figura 29. Porcentaje de IEL y LPL CD3 ⁺ apoptóticos | 138 |
| Figura 30. Expresión de TLR2 y TLR9 valorada por PCR en tiempo real | 140 |
| Figura 31. Tinción inmunohistoquímica para TLR2 | 141 |
| Figura 32. Tinción inmunohistoquímica para MyD88 | 142 |
| Figura 33. Lesión intestinal y relación peso/longitud del colon | 159 |
| Figura 34. Peso corporal de los ratones del estudio 2 | 160 |
| Figura 35. Lesión intestinal | 161 |
| Figura 36. Células apoptóticas valoradas por ISOL | 166 |
| Figura 37. Porcentaje de IEL y LPL CD3 ⁺ | 167 |
| Figura 38. Porcentaje de IEL y LPL CD3 ⁺ apoptóticos | 167 |
| Figura 39. Expresión de TLR2 y TLR9 valorada por PCR en tiempo real | 167 |

ÍNDICE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Incidencia de la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn mundial | 15 |
| Tabla 2. Tratamientos de la enfermedad inflamatoria intestinal | 17 |
| Tabla 3. Moléculas de membrana presentes en IEL | 34 |
| Tabla 4. "Toll like Receptor" y sus ligandos | 35 |
| Tabla 5. Anticuerpos presentes en la enfermedad inflamatoria intestinal | 70 |
| Tabla 6. Ácidos grasos y fuentes dietéticas | 82 |
| Tabla 7. Baremo de supervisión | 107 |
| Tabla 8. Componentes de la dieta y porcentaje de ácidos grasos | 108 |
| Tabla 9. Composición soluciones A, B y C para aislamiento IEL y LPL | 111 |
| Tabla 10. Recogida de las muestras biológicas | 112 |
| Tabla 11. Baremo de lesión intestinal | 113 |
| Tabla 12. Baremo de la ulceración intestinal | 113 |
| Tabla 13. Concentraciones de la citoquinas en los estándares de "Searchlight Mouse inflammatory cytokine assay Kit" | 114 |
| Taula 14. Tiempos de retención de los ácidos grasos por CG-EM | 118 |
| Tabla 15. Anticuerpos inmunohistoquímica | 124 |
| Tabla 16. Condiciones PCR | 129 |
| Tabla 17. Condiciones PCR en tiempo real | 130 |
| Tabla 18. Secuencias primers TLR2, TLR9 y β -actina | 130 |
| Tabla 19. Citoquinas en sobrenadante de cultivo de explantes | 136 |
| Tabla 20. Porcentaje de células epiteliales apoptóticas por ISOL | 137 |
| Tabla 21. Porcentaje de las subpoblaciones IEL y LPL $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ | 139 |
| Tabla 22. Porcentaje del subpoblaciones IEL y LPL $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ apoptóticas | 139 |
| Tabla 23. Hemoglobina y hematocrito de los ratones | 160 |
| Tabla 24. Citoquinas en sobrenadante de cultivo de explantes. | 162 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 25. Porcentaje de ácidos grasos en mucosa | 163 |
| Tabla 26. Porcentaje ácidos grasos en las membranas eritrocitarias | 164 |
| Tabla 27. Porcentaje de las subpoblaciones CD3 ⁺ CD4 ⁺ y CD3 ⁺ CD8 ⁺ en IEL y LPL | 168 |
| Tabla 28. Porcentaje de las subpoblaciones CD3 ⁺ CD4 ⁺ y CD3 ⁺ CD8 ⁺ en IEL y LPL apoptóticas | 168 |

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal engloba una serie de enfermedades, siendo las más frecuentes la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn. Estas enfermedades de etiología desconocida y sin tratamiento curativo cursan crónicamente con periodos de remisión. Pueden presentar distintas complicaciones como refractariedad a tratamientos, megacolon tóxico, desnutrición y cáncer entre otras. Epidemiológicamente afectan a países industrializados lo que indica la influencia del factor ambiental.

1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

1.1. Descripción y definición de la enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende distintas variantes clínicas, siendo la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU) las más frecuentes aunque existen otras formas como la colitis indeterminada, colitis microscópica, etc. Este conjunto de enfermedades se caracterizan por ser de etiopatología desconocida, curso crónico, en el que se alternan periodos de actividad (brote y recidiva) intercalados por periodos de inactividad (remisión), y por manifestar un patrón de inflamación heterogéneo en diferentes niveles del tracto digestivo.

La EC y la CU tienen características comunes que dificultan el diagnóstico diferencial con lo cual han de tenerse en cuenta las características clínicas, endoscópicas, radiológicas, histológicas, serológicas así como la evolución de la enfermedad.

1.1.1 Colitis Ulcerosa

La CU fue descrita por primera vez por Sir Samuel Wilks en 1859.¹

Clínicamente la enfermedad comienza de forma gradual, ocasionalmente con estreñimiento, seguido con sangrado rectal, urgencia defecadora, diarrea, molestias abdominales y síntomas generales como pérdida de peso y apetito.

La zona de afectación se limita exclusivamente al colon siendo el recto la "zona de partida" propagándose a lo largo del colon y pudiendo alcanzar el ciego. En función de la extensión y de la afectación se habla de colitis distal (afectación del colon izquierdo), proctitis (10-20 primeros centímetros desde el ano), proctosigmoiditis (20-30 primeros centímetros desde el ano), y colitis extensa o pancolitis (afectación de la totalidad del colon).²

La actividad de la CU se evalúa generalmente mediante los índices clínicos de Truelove y Witts³ que clasifica la enfermedad en leve, moderada y severa,

Enfermedad inflamatoria intestinal

aunque existen otros como el índice de Rachmilewitz. Existen además índices endoscópicos, Powell-Tuck, Sutherland, Sninsky e histológicos, Gomes, Riley, Hanauer, que permiten diagnosticar la CU frente a otras EI.⁴

Histológicamente la CU se caracteriza por presentar una superficie cólica irregular denominada superficie vellosa o pseudovellosa, alteración en la arquitectura de las criptas y metaplasia de las células de Paneth. Además se da un aumento de las células inflamatorias, común en todas las colitis, pero que en la CU se caracteriza por ser difusa, es decir, no pueden diferenciarse zonas afectadas de no afectadas. En la CU la inflamación puede alcanzar la zona más profunda de la mucosa con acumulación de células inflamatorias en el área entre la base de las criptas y la capa muscular de la mucosa sin llegar a tener carácter transmural. A lo largo de las criptas suelen disponerse las poblaciones linfocíticas en contacto con los neutrófilos mientras que en la base de las criptas se acumulan células plasmáticas. También se observa disminución del moco intestinal.⁵ (Figura 1)

1.1.2. Enfermedad de Crohn

La EC fue observada por primera vez en 1623 por Wilhelm Fabry⁶ aunque fue descrita posteriormente por Burril B Crohn en 1932.⁷

La EC puede afectar desde la boca hasta el ano, siendo las áreas que presentan afectación con mayor frecuencia el íleon terminal y el ciego. La EC presenta una inflamación parcheada, es decir, existen áreas sanas entre áreas o segmentos inflamados de longitud variable, y heterogénea a lo largo de la superficie de las distintas zonas afectadas. La EC es una enfermedad transmural, afecta a todas las capas que componen el tubo digestivo, de la mucosa a la serosa. Además presenta lo que se conoce como "envoltura grasa" que aparece como consecuencia de la afectación de la grasa mesentérica, la cual rodea parcialmente el intestino.

Las manifestaciones clínicas varían en función de la afectación pero suelen comportar diarrea, fiebre, dolor abdominal, obstrucción intestinal, sangrado, etc.

La EC presenta un patrón clínico heterogéneo, una importante variedad demográfica y fenotípica que ha supuesto la subdivisión de los pacientes mediante la clasificación de Viena posteriormente modificada en la clasificación de Montreal.⁸ Esta clasificación considera la edad de diagnóstico, la localización y el comportamiento fenotípico de la enfermedad. Incluso, para una correcta clasificación ha de considerarse el seguimiento durante 5-10 años ya que los patrones clínicos pueden sufrir variaciones y fluctuar entre categorías.

Para la evaluación de la actividad de la EC se utiliza el índice de Best o CDAI complementado con índices endoscópicos específicos, CDEIS, SES-CD.⁴

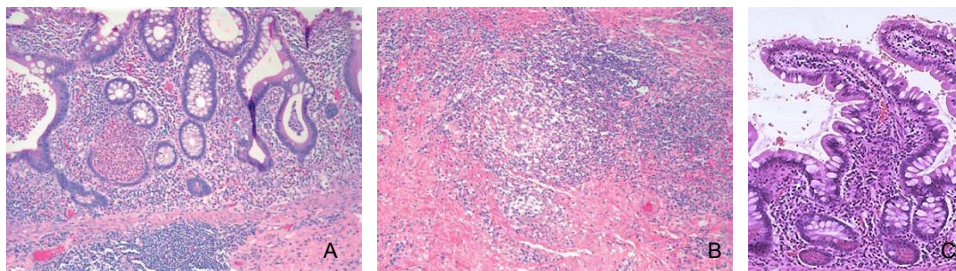


Figura 1. A. Biopsia de la mucosa de CU activa con una marcada distorsión de la arquitectura, criptiditis y ausencia de criptas. (X100 H&E). B. Biopsia mucosa de EC activa en la que se observa un granuloma con células gigantes envuelto de linfocitos. (X100 H&E). C. Mucosa normal (X200 H&E). Fuente: Baumgart DC y cols. The Lancet 2007;369;1641-57.²

La característica histológica exclusiva de la EC es la presencia de granulomas, agrupación de células monocito-macrófago y otras células inflamatorias, aunque no aparecen siempre, son claves en el diagnóstico. La EC comparte características con la CU como el infiltrado inflamatorio formado por linfocitos y células plasmáticas además de las irregularidades de las criptas. El ensanchamiento de la submucosa debido al edema es muy habitual y la estenosis es una complicación frecuente. (Figura 1)

En la EC también puede verse afectado el sistema nervioso entérico con aparición de hipertrofia irregular e hiperplasia de las fibras nerviosas, así como alteraciones del cuerpo de las células neuronales y de las células gliales de la submucosa y el plexo mientérico.

1.1.3. Colitis indeterminada

Colitis indeterminada es un término ampliamente utilizado pero, tal y como indica su nombre, las características específicas y únicas de esta entidad están por determinar.⁹ Muchos de los pacientes pueden clasificarse durante largos periodos como colitis indeterminada y acabar progresando hacia CU o EC, por lo tanto, la colitis indeterminada puede no ser una entidad propiamente dicha sino un fenotipo transitorio.¹⁰

Se trata de una afectación exclusiva del colon que al ser analizada a nivel anatomopatológico muestra características de CU y de EC, y que a pesar de responder a los tratamientos convencionales de éstas, muestra una peor evolución. De manera que tras la valoración clínica, endoscópica e histológica se considera que se está frente a una colitis indeterminada cuando se ha descartado la colitis infecciosa y otras causas de colitis.

1.1.4. Colitis microscópica

La colitis microscópica incluye aquellas patologías que cursan con diarrea crónica acuosa mientras que presentan una endoscopia y radiología normal con alteraciones microscópicas en el colon.¹¹ Clínicamente puede confundirse con el síndrome del colon irritable, por lo tanto para hacer un diagnóstico correcto será imprescindible el análisis por un patólogo experimentado. Dentro de colitis microscópica existen las colitis microscópicas típicas (colitis colágena y colitis linfocítica) y las atípicas¹² que incluyen fenotipos modificados de la típicas con presencia de células gigantes y colitis pseudomembranosa, paucicelular, granulomatosa o críptica.

1.2. Epidemiología

Las EI empezaron a diagnosticarse inicialmente en países del norte de Europa. A partir de la Segunda Guerra Mundial empiezan a aparecer en el centro y oeste de Europa, Australia y Sudáfrica, y a partir de la década de los 70-90 en el resto de Europa y Sudamérica.¹³

Aunque inicialmente en la historia de estas enfermedades se describió un gradiente de incidencia norte-sur los estudios actuales muestran dichas incidencias casi equiparadas, seguramente debido a la “globalización” del estilo de vida occidental de los últimos tiempos.

La valoración de la incidencia y prevalencia de las EII es variable según los estudios que se consulten ya que se trata de estudios retrospectivos poblacionales, hospitalarios, etc., que recogen datos muy heterogéneos. Las incidencias más altas se han descrito en el norte de Europa, Inglaterra y norte de América, donde las tasas se han empezado a estabilizar. En otras áreas como el sur de Europa, Asia y otros países en desarrollo que tradicionalmente presentaban tasas bajas están desarrollando un aumento en los últimos años (Tabla 1).

Tabla 1. Incidencia de Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn mundial.

| Incidencia de CU y EC en casos/100.000 habitantes/año | | | | | |
|---|---------|------------------|---------------|------|------|
| Autores | Estudio | Localización | Año | CU | EC |
| Devlin(13) | RP | Reino Unido | 1971-77 | 15.1 | 5.3 |
| Odes (21)/(57) | RP | Israel | 1961-85/87-92 | 5.8 | 4.2 |
| Loftus(32)/(58) | RP | EEUU | 1940-93 | 15.0 | 6.9 |
| Bernstein (36) | RP | Canadá | 1989-94 | 14.3 | 14.3 |
| Ekbom (18) | RP | Suecia | 1965-83 | 10.4 | 10.4 |
| Kildebo (2) | PP | Noruega | 1983-86 | 12.8 | 12.8 |
| Bjornsson | RP | Islandia | 1980-89 | 11.7 | 11.7 |
| Fonager (28) | RP | Dinamarca | 1981-92 | 13.2 | 13.2 |
| Gower-Rousseau | PP | Francia | 1988-90 | 3.2 | 3.2 |
| Tsianos (27) | RP | Grecia | 1982-91 | 4 | 4 |
| Tragnone (29) | RP | Italia | 1981-92 | 5.2 | 5.2 |
| Sincic BM (52) | PP | Croacia | 2000-04 | 4.2 | 4.2 |
| Wright (20) | PP | Sudáfrica | 1980-84 | 5.0 | 5.0 |
| Linares (31) | RH | Panamá/Argentina | 1987-93 | 1.2 | 1.2 |
| Sood (47)/ Al-Ghamdi(64) | PP/RH | India | 1999/1983-02 | 6.02 | 0.94 |
| Shivanda (6) | PP | Norte Europa | 1991-93 | 11.8 | 7.0 |
| Shivanda (6) | PP | Sur Europa | 1991-93 | 8.7 | 3.9 |
| Solá (83) | RH | Cataluña | 1978-87 | 0.5 | 0.8 |
| Saro C (80) | PP | Gijón | 1994-97 | 9.6 | 6.1 |

PP: prospectivo poblacional; RP: retrospectivo poblacional; RH: retrospectivo hospitalario.
Fuente: M.A. Gassull, F. Gomollón. Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia. En Enfermedad inflamatoria intestinal. III Edición. Miquel Àngel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.

Los estudios demográficos muestran resultados controvertidos respecto a la distinta incidencia entre hombres y mujeres, los que observan diferencias detectan una mayor incidencia en hombres en CU y a la inversa en EC.

También es remarcable el descenso en la edad de aparición de las EII que cada vez afecta a la población más joven.¹⁴

Entre las distintas etnias poblacionales se muestra un mayor riesgo en la población caucásica, mientras que los individuos afroamericanos y asiáticos presentan un menor riesgo. Estas incidencias parecen estar aumentando en los últimos años en grupos étnicos que presentaban un menor riesgo, seguramente debido a los cambios del estilo de vida, al desarrollo económico de las áreas geográficas donde se situaban estas poblaciones y por la inmigración.¹⁵ En un estudio en Wisconsin,¹⁶ se ha observado que la población pediátrica que padece esta enfermedad muestra la misma distribución que en las distintas etnias, alta en caucásicos y baja en afroamericanos, sudamericanos y asiáticos, la mayoría sin historia familiar. Por otro lado, los judíos ashkenazi presentan un claro aumento de la incidencia y prevalencia, independientemente de la localización geográfica, en comparación con los judíos sefardíes.¹⁷

1.3. Tratamientos

En la actualidad no existe un tratamiento curativo de la EII. Existen distintos tratamientos que pretenden controlar la inflamación, curar la mucosa afectada e inducir la remisión. Estos tratamientos además tienen como objetivo mejorar la calidad de vida del paciente, prevenir la recidiva y reducir las complicaciones de la enfermedad, siempre causando los mínimos efectos secundarios. (Tabla 2)

Por otro lado, ninguno de los tratamientos de control de la inflamación y mantenimiento de la remisión es totalmente eficaz, ni siquiera la resección de tramos intestinales afectados consiguen curar la enfermedad. Frecuentemente los pacientes con EII intervenidos quirúrgicamente acaban desarrollando nuevos brotes de actividad en zonas inicialmente inactivas.

A pesar del importante abanico de tratamientos que existen en la actualidad y frente a las distintas respuestas y complicaciones que pueden aparecer no existe ninguno eficaz al 100% para la EII.

Tabla 2. Tratamientos de la enfermedad inflamatoria intestinal.

| Tratamiento | Compuesto | Efectos | Indicaciones |
|--------------------|---|--|--|
| Amino-salicilatos | Mesalazina Sulfamida | Inhiben producción: leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, TNF α , NF κ B y de radicales libres. Disminuyen quimiotaxis neutrófilos. | Tratamiento CU y EC leve Mantenimiento CU. |
| Corticoides | Prednisona, prednisolona, budesonida, dipropionato de beclometasona | Disminuyen permeabilidad vascular, vasodilatación, infiltración neutrófilos, linfocitos y macrófagos circulantes. Inhiben factor transcripción NF κ B y la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL12, TNF α y INF γ entre otras). | Tópicos en CU y EC colónica Orales en CU y EC moderadas Intravenosos en CU y EC graves requiriendo hospitalización. Budesonida mantenimiento de algunos casos EC de afectación ileal leve y moderada. Dipropionato de beclometasona en tratamiento de CU leve-moderada y EC leve-moderada de afectación colónica |
| Inmuno-moduladores | Azatioprina, mercaptopurina, metotrexato, ciclosporina | Inhiben en general la síntesis de ADN, ARN y proteína, disminuyendo el número de linfocitos B y T. Disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias (IL4, IL5, IL6, IL25, TNF α y IFN γ). | Mantenimiento en pacientes corticodependientes y en pacientes que después de un brote grave han respondido al tratamiento intravenoso de corticoides en EC y CU Ciclosporina como tratamiento de CU corticorrefractaria |
| Agentes biológicos | Infliximab, adalimumab y certolizumab | En general bloquean citoquinas proinflamatorias, receptores, moléculas de adhesión, moléculas de señalización. Con estos compuestos se inhibe concretamente el TNF α . | Tratamiento en pacientes corticodependientes y corticorrefractarios Mantenimiento en pacientes corticodependientes con EC y CU, con o sin intolerancia y/o refractariedad a inmunomoduladores. |
| | Probióticos | Modulan el comportamiento de la flora microbiana comensal para que su reconocimiento por parte del sistema inmune local dé lugar a efectos antiinflamatorios en lugar de proinflamatorios. | No como tratamiento protocolarizado, sí en estudios de pacientes con reservoritis. En CU previno la recurrencia mientras que en EC no se han visto resultados muy alentadores |
| Aféresis | Leucoaféresis, granuloféresis, etc. | Elimina elementos celulares que ejecutan o amplifican la inflamación mediante un circuito extracorpóreo vena-vena. | Tratamiento y mantenimiento de CU y EC corticodependientes. Mantenimiento en pacientes intolerantes o sin respuesta al mantenimiento por inmunomoduladores o tratamiento biológico anti-TNF. |
| Cirugía | - | Eliminación de la zona afectada | Cuando no se responde a ningún tratamiento farmacológico y la vida del paciente corre peligro. |

Tras establecer la actividad/gravedad, localización, extensión y en caso de la EC el fenotipo (estenosante/fistulizante), se administra un determinado tratamiento farmacológico en función de los parámetros que se han evaluado. El tratamiento también variará en función del criterio del médico, existiendo partidarios del tratamiento clásico que administran fármacos de menor a mayor agresividad, o por lo contrario los partidarios del tratamiento "Top-down" que empiezan administrando un tratamiento más agresivo o radical. No existe un criterio único o consensuado ya que los distintos estudios que enfrentan dichas estrategias terapéuticas presentan resultados controvertidos.¹⁸

Otro tipo de tratamiento son las distintas formulaciones de dietas enterales que se han evaluado tanto como tratamiento primario como para el mantenimiento de la remisión. Los resultados de un metaanálisis indican que los pacientes con EII que recibieron terapia nutricional, muestran una tasa de remisión del 60% similar a las obtenidas con corticoides.¹⁹ Ahora bien, si se analizan por separado los pacientes de CU y EC, las tasas de remisión para las dietas enterales son inferiores a las obtenidas mediante el tratamiento de corticoides. Las dietas enterales constituyen un tratamiento de elección en la EII con especial relevancia para los pacientes pediátricos ya que los corticoides, administrados de forma crónica, comportan graves efectos como retraso del crecimiento, del desarrollo sexual y osteopenia.

1.4. Evolución y complicaciones de las EII

Como se ha comentado en el apartado anterior no existe un tratamiento totalmente efectivo para la EII. Además los pacientes con esta patología digestiva acaban por desarrollar complicaciones frente a los tratamientos existentes. Las distintas respuestas que pueden darse frente a los tratamientos son:

- Respuesta terapéutica. El brote entra en remisión y se administra un tratamiento de mantenimiento.

- Dependencia terapéutica. Este tipo de respuesta se da frente a los corticoides. El paciente responde al tratamiento pero cuando se disminuye la dosis de

administración o se retira el tratamiento aparece de nuevo la actividad inflamatoria. Esta respuesta se presenta en un 25% de pacientes con EII.²⁰

- Refractariedad terapéutica. El paciente no responde al tratamiento, la enfermedad sigue activa. El 16% de los pacientes con EII presentan corticorrefractariedad.²¹

La principal complicación de las EII es la alternancia de brotes de actividad, imprevistos y por causas desconocidas, seguidos de periodos de quiescencia. El 95% de pacientes con CU recidivan en alguna ocasión a los 10 años del diagnóstico, mientras que entre el 40-70 % de los pacientes de EC lo hacen durante los 2 años posteriores al diagnóstico.

La continua aparición de recidivas puede llegar a comportar el fracaso terapéutico de fármacos anteriormente efectivos. Cuando ninguno de los tratamientos farmacológicos es efectivo y la vida del paciente corre peligro o se dan complicaciones como perforación, hemorragia masiva, etc., se recurre a la cirugía. Este "tratamiento" es muy variado en función del tipo de EII (EC y CU), de la localización y extensión de la enfermedad. Se estima que la cirugía se lleva a cabo en un 30-40% de pacientes con CU y entre un 75- 90 % de EC tras 30 años del diagnóstico.^{22 23} No obstante, el mayor problema de la cirugía en EC es la recurrencia prácticamente inevitable en la zona de anastomosis quirúrgica que puede ir seguida de varias resecciones a lo largo de la vida del paciente pudiendo provocar el síndrome del intestino corto. Con frecuencia, los pacientes con CU a los que se les practica una proctocolectomía total o parcial con reservorio suelen presentar inflamación inespecífica del reservorio conocida como reservoritis. No existe consenso para el tratamiento de la reservoritis, se han hecho estudios en los que se han administrado antibióticos, corticoides, aminosalicilatos, inmunomodulares y probióticos con distintos grados de efectividad.²⁴

Otras complicaciones que pueden aparecer tanto en la CU como en la EC e incluso en colitis infecciosas es el megacolon tóxico que se diagnostica por la

aparición de una dilatación del colon superior a 6 cm sin obstrucción que ha de someterse forzosamente a cirugía.²⁵

La colitis fulminante que a pesar de conocerse como colitis, se da en un 60% de CU, 24% EC y en un 16% de Colitis Indeterminada se caracteriza por una colitis grave acompañada de una toxicidad sistémica. Puede realizarse tratamiento farmacológico o quirúrgico en función de la gravedad de la enfermedad.²⁵

Los trastornos nutricionales aparecen de forma muy frecuente en CU graves y especialmente en EC de larga duración como consecuencia de la propia inflamación provocando lo que se conoce como desnutrición energético-proteica y déficit de micronutrientes. En la mayoría de casos, a excepción del hierro y del folato, estas deficiencias son asintomáticas, pero su ausencia puede bloquear mecanismos de reparación tisular o la defensa antioxidante frente a radicales libres de oxígeno que perpetúan el proceso inflamatorio.²⁶ La desnutrición energético-proteica empeora el estado general del paciente, agrava el curso de la enfermedad y puede incrementar la necesidad de cirugía así como la morbilidad. Revertir el déficit nutricional consigue un efecto antiinflamatorio. Distintos modelos experimentales han podido constatar que las citoquinas proinflamatorias provocan anorexia y consecuentemente desnutrición energético-proteica.²⁶

Otra complicación frecuente es el cáncer colorrectal. Se ha determinado un aumento de la probabilidad de sufrir cáncer colorrectal en pacientes con CU.²⁷ Los pacientes con CU tienen 5.7 veces más probabilidad de sufrir cáncer colorrectal que el resto de la población. En la EC existen estudios con resultados controvertidos, pero parece existir un aumento de la incidencia de cáncer colorrectal en pacientes de EC de afectación cólica. Algunos estudios señalan como elementos clave en la aparición de cáncer colorrectal, la extensión, localización y gravedad de la inflamación, la duración de la enfermedad, los distintos tratamientos y la historia familiar.²⁸

2. Homeostasis intestinal

Para el correcto funcionamiento del colon la mucosa intestinal compartimentaliza sus elementos de manera que se beneficia de los elementos positivos (nutrientes y flora comensal) a la vez que se protege de los posibles agentes tóxicos o patológicos del medio extraintestinal. En primera línea de interacción una monocapa epitelial constituye una barrera selectiva. Está formada por un conjunto de células especializadas en la secreción de factores protectores así como de agentes antimicrobianos y por células provistas de receptores para el reconocimiento de los distintos elementos del medio. Estos receptores permiten mantener informado al compartimiento que se encuentra por debajo de esta monocapa epitelial, la lámina propia. En la lámina propia se distribuyen distintos tipos celulares inmunocompetentes preparados tanto para la adquisición de la tolerancia frente a los nutrientes y a la flora comensal, como para luchar frente a patógenos.

2. Homeostasis intestinal

2.1. Estructura y función intestinal

El tracto digestivo engloba una serie de órganos (esófago, estómago, intestino delgado y colon) formados por capas musculares que ejecutan el peristaltismo gástrico para la digestión de los alimentos y el peristaltismo intestinal para el progreso del bolo fecal a lo largo del intestino. Además, estos órganos están altamente irrigados por el sistema circulatorio para el abastecimiento de nutrientes y oxígeno a las células que los forman así como para la captura de nutrientes absorbidos en la luz intestinal.

Tanto el intestino delgado, dividido en tres regiones diferenciadas (duodeno, yeyuno e íleon), como el grueso (ascendente o derecho, que comprende al ciego al que se une el apéndice, transversal, descendente o izquierdo, colon sigmoide y recto) están formados por cuatro capas concéntricas: la serosa, dos capas musculares: músculo longitudinal y músculo circular, la submucosa, una capa unicelular muscular llamada *muscularis mucosae* y la mucosa, descritas de exterior a interior de la luz intestinal, respectivamente. (Figura 2).

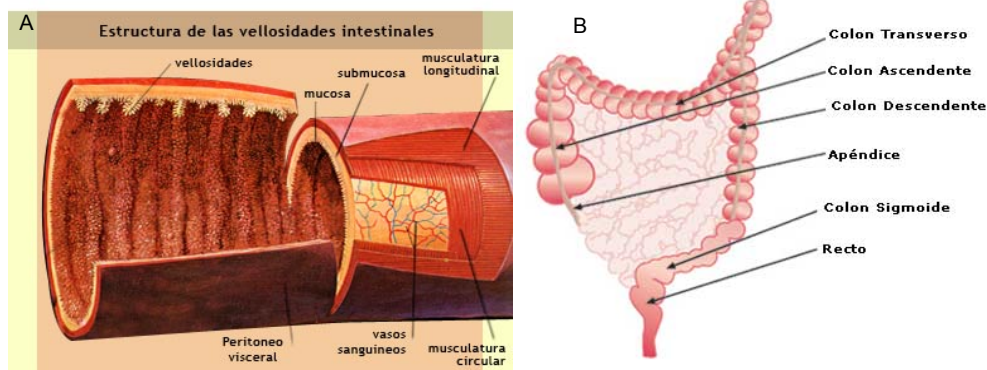


Figura 2. A Estructura del intestino grueso. B. Regiones del intestino grueso. Fuente: <http://bioquimik-sil4.blogspot.com/2007/08/primer-investigacin-sistema-digestivo.html>

La mucosa intestinal representa una superficie de 300-400 m² en la cual se digieren y absorben los nutrientes. Está formada por una capa de células epiteliales, la lámina propia y por tejido linfoide asociado a mucosa intestinal llamado "Gut Associated Lymphoide Tissue" (GALT). GALT está presente en los

distintos compartimientos intestinales localizándose mayoritariamente en el epitelio y en la lámina propia, y estando constituido por una serie de células que forman parte del sistema inmune intestinal.

2.2. Compartimiento extraepitelial

La capa epitelial del intestino confiere una barrera física, con permeabilidad selectiva, que separa el medio exterior del individuo. El compartimiento extraepitelial junto con el epitelio configura la primera línea de defensa del intestino. El epitelio está protegido por una serie de elementos que configuran el compartimiento extraepitelial:

2.2.1. Moco intestinal

El epitelio intestinal está recubierto por una capa mucosa continua que proporciona una barrera física entre dicha capa epitelial y los productos presentes en el lumen intestinal, evitando la adhesión de bacterias. El moco intestinal está formado por un 95% de agua que contiene electrolitos (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}), carbohidratos, proteínas, aminoácidos y lípidos y un 5 % de mucinas, glucoproteínas que confieren propiedades viscoelásticas al moco. En el interior de este film mucoso coexisten inmunoglobulina (Ig) A y G, secretada por células B, y bacterias. Las mucinas de los intestinos delgado y grueso se sintetizan en las células epiteliales columnares especializadas conocidas como células caliciformes.²⁹

Conceptos inmunológicos

Inmunoglobulinas son proteínas anticuerpo altamente específicas que son producidas por los linfocitos B de forma constitutiva en algunos casos y mayoritariamente en respuesta a antígenos específicos. En su forma unida a la membrana constituye el receptor de antígenos de la célula B. Existen distintos isotipos, IgA, IgG, IgM, IgE e IgD. IgA es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo tales como saliva, lágrimas, calostro y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. En sangre, se encuentra como una molécula monomérica y en mucosas en forma dimérica (IgA secretora). Su función principal es identificar a los antígenos e impedir que se localicen en las mucosas.

La protección del epitelio contra los microbios intestinales depende de la capacidad de los carbohidratos de las mucinas para unirse a los receptores microbianos o para repelerlos.³⁰ Las bacterias intestinales que no son capaces

de unirse al moco o que no desarrollan características de crecimiento que les permitan sobrevivir en el contenido luminal, se excretan gracias a la peristalsis mediante la defecación. Las bacterias que residen en el moco impiden la adhesión de los microorganismos patógenos mediante la secreción de elementos antimicrobianos o ocupando competitivamente lugares de unión.

Diversos estudios avalan la visión dinámica del moco, que lo consideran como un componente dinámico del mecanismo de defensa intestinal y no como una barrera estática. Existe una interacción directa y recíproca entre la producción de moco y las bacterias residentes. La microflora intestinal es capaz de influir en el programa de diferenciación de las células epiteliales de la mucosa, entre las que se encuentran las células caliciformes, modificando de esta manera la síntesis y secreción del moco intestinal. Además se ha descrito que algunas bacterias autóctonas producen enzimas que degradan mucinas lo que podría constituir un mecanismo de supervivencia.³¹ Recíprocamente, si la integridad de la barrera intestinal se ve afectada, se da un proceso inflamatorio, o se altera el número de células caliciformes, la composición y consistencia del moco se verán alteradas lo que conllevará una modificación de la flora autóctona. La alteración del moco por lo tanto podría comprometer su función básica de colaboración en el mantenimiento de la barrera intestinal provocando un proceso inflamatorio.

2.2.2. Control químico del ecosistema intestinal

Las células de Paneth situadas en el epitelio sintetizan y almacenan una serie de sustancias que son secretadas a la luz intestinal cuando son activadas. Estas sustancias constituyen un arma química muy importante para el control y regulación del ecosistema intestinal. Algunos ejemplos son:

-Lisozima: proteína antibacteriana característica de secreciones como lágrimas, saliva, leche materna y secreciones intestinales que se sintetiza en glándulas gástricas y pilóricas, glándulas duodenales, macrófagos y granulocitos, además de las células de Paneth. Es activa predominantemente frente a bacterias Gram

positivas rompiendo las uniones glicosídicas que estabilizan el peptidoglicano de la pared bacteriana.

-Fosfolipasa A2: componente de los gránulos de las células de Paneth. Se secreta al lumen intestinal tras la estimulación mediante productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS). Tiene acción bactericida frente a algunas especies concretas.

-Defensinas: péptidos producidos por varios tipos celulares como fagocitos, neutrófilos, células de Paneth y en general por la mayoría de células epiteliales del intestino. Su actividad antimicrobiana parece ser debida a la formación de poros en la membrana bacteriana que provoca su lisis. Existen 2 tipos, α -defensinas y β -defensinas. Las α -defensinas incluyen las defensinas neutrofílicas humanas, las defensinas humanas y las criptidinas murinas. Son activas frente a bacterias Gram positivas y negativas. Las β -defensinas han desarrollado cierta especificidad, algunas son activas frente a Gram positivas y otras frente a Gram negativas específicamente.

La producción de las defensinas puede ser constitutiva o inducida por medio de la activación de "Nuclear Factor-kappa B" (NF κ B). Pueden almacenarse con una conformación activa o inactiva. Éstas últimas se activan por la acción de tripsina en el caso de las humanas y metaloproteasas en las murinas. Estudios recientes demuestran que las defensinas no sólo participan en la inmunidad innata actuando como péptidos antimicrobianos sino que también actúan sobre el huésped. Inducen la proliferación celular en epitelios, actúan como quimioatrayentes de linfocitos T *naïve*, de monocitos, de células dendríticas inmaduras, de neutrófilos y de mastocitos, utilizando distintos receptores. Estudios con animales deficientes para α -defensinas muestran que la ausencia de éstas provoca un descontrol en la producción de IL1 β que induce una inflamación incontrolada que remite cuando se administran α -defensinas.³²

-Angiogeninas: familia de proteínas antimicrobianas y fungicidas endógenas sintetizadas por las células de Paneth y liberadas tras la activación de "Toll like

Receptors" (TLR), receptores que reconocen fragmentos microbianos conservados.³³

2.2.3. Flora intestinal

Todos los individuos nacemos con la luz intestinal estéril, sin colonizar. Durante los 2-3 primeros años de vida mediante la lactancia materna y la introducción de los alimentos sólidos, se va colonizando el intestino, configurándose un complejo ecosistema donde conviven bacterias, nutrientes y el sistema inmune que compone la mucosa intestinal. Primero se establecen las bacterias aeróbicas y después las anaeróbicas. La conformación de dicho ecosistema depende de distintos factores como el tipo de parto, de si hay lactancia materna o no y del ambiente donde se incluye el grado de higiene.³⁴

La flora comensal modula la expresión de genes involucrados en distintas funciones, como la absorción de nutrientes, el mantenimiento y fortalecimiento de la barrera intestinal, la maduración inmunológica postnatal así como confiere resistencia a la colonización por otras bacterias.³⁵ Durante esta colonización se da la maduración inmunológica y se establece la tolerancia. Los mecanismos que establecen y mantienen la tolerancia no están totalmente definidos pero está claro que intervienen la estructura anatómica de la mucosa, el conjunto celular y factores humorales.

En la vida adulta, nuestro intestino contiene unas 10^{13} - 10^{14} bacterias representadas por 15000-36000 especies distintas.³⁶ Esta gran biodiversidad favorece la vida y el desarrollo del conjunto biótico y del huésped. Los animales mantenidos en condiciones de estricta asepsia, "Germ free" (GF), no desarrollan flora intestinal, manifiestan un desarrollo anormal del intestino (pared intestinal atrófica, motilidad alterada, sistema inmune intestinal inmaduro, etc.). Además en los estudios con modelos experimentales mantenidos en condiciones "Germ free" (GF), los animales necesitan aumentar la ingesta para alcanzar el mismo peso que los animales en condiciones convencionales, lo que sugiere el importante papel nutricional de la microflora.³⁷

Homeostasis intestinal

La flora bacteriana aporta nutrientes, como vitamina K, ácido fólico, ácidos grasos de cadena corta, etc., como resultado de procesos de fermentación que aportan al huésped suplementos nutricionales y energía. Pero además puede modificar algunas funciones del huésped como la motilidad intestinal y el metabolismo de distintas sustancias entre ellas componentes de la dieta y medicamentos. Para ello modifica la expresión génica del huésped para que produzca enzimas, proteínas, etc., que le permitan metabolizar, absorber o eliminar distintos elementos.³⁸

El huésped dispone de una serie de biosensores capaces de reconocer bacterias, su estado ecológico en cada momento y actuar en consecuencia. El reconocimiento de la flora mediante los TLR pone en alerta al sistema inmune para luchar contra patógenos y activa la expresión de distintos factores (COX2, KGF-1, TGFβ1, angiogengina4, etc.) implicados en la citoprotección, reparación tisular, angiogénesis, etc.³⁹ Por lo tanto, la microflora también actúa sobre la estabilidad de la función barrera. En este sentido la activación de algunos TLR aumenta la activación de las proteínas que forman las uniones de las células epiteliales.⁴⁰

Se habla de ecosistema bacteriano, flora intestinal o biofilms bacterianos para definir la comunidad bacteriana intestinal estructurada y englobada en una matriz polimérica. Estudios con modelos murinos han esclarecido la localización y diversidad bacteriana del intestino. Mediante fluorescencia *in situ* y el uso de dos modelos animales de colitis experimental, uno inducido y el otro espontáneo, se ha observado que la flora intestinal es prácticamente inapreciable en el intestino delgado y que se organiza en tres compartimientos cólicos cada uno con distinta composición: las criptas, la capa entrelazada y la masa fecal.⁴¹ El compartimiento fecal, que se extiende a lo largo de todo el colon, en animales sanos está formado por un grupo homogéneo de bacterias que contactan directamente con las paredes del ciego pero están separadas de las paredes del colon proximal mediante la capa entrelazada. A partir del colon medio la capa entrelazada va desapareciendo y aparece el moco intestinal que separa las bacterias de la masa fecal del epitelio intestinal. En animales sanos las

bacterias que ocupan criptas se observan en el ciego y el colon proximal. La composición bacteriana de la capa entrelazada y de las criptas es similar y diferente de la de la masa fecal. Esta organización diferencial de la flora en los 3

compartimientos mencionados, permite el desarrollo de distintas actividades, (fermentación y muestreo del ecosistema intestinal). La capa entrelazada representa una banda, situada en la zona de transición del ciego al colon distal, compuesta por un grupo selecto de microorganismos entre la masa fecal y la mucosa impenetrable para muchos microorganismos de la masa fecal.

En animales colícticos se observó en el compartimento fecal una disminución de las bacterias de la masa fecal y una reducción del área de contacto entre el compartimento fecal y la pared intestinal. La capa entrelazada se observó disminuida en grosor y acompañada de una reducción del moco intestinal y un aumento masivo de bacterias en las criptas y la capa entrelazada. Además la composición bacteriana también se vio modificada en los animales colícticos, dominando las bacterias adherentes e invasivas de la mucosa como *Bacteroides*.⁴¹

2.3. Compartimento epitelial

El peristaltismo activo del intestino, el moco intestinal, las sustancias antimicrobianas secretadas a la luz intestinal y la barrera física creada por la monocapa epitelial configuran lo que se conoce como función barrera.

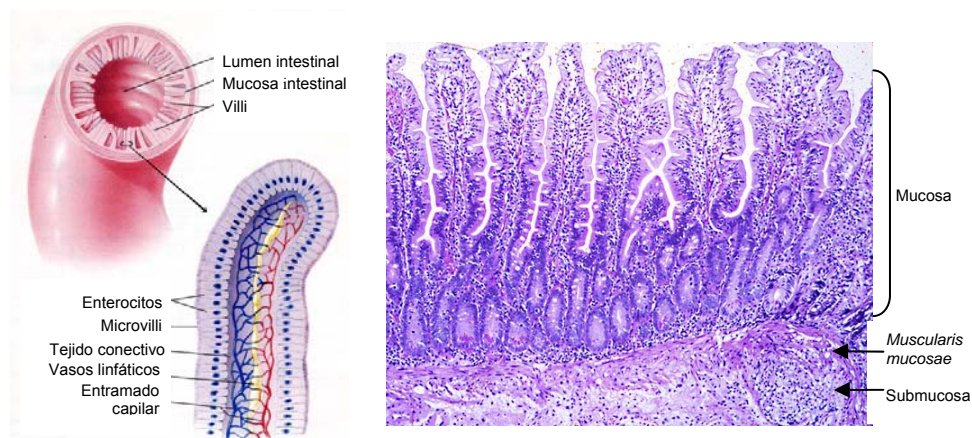


Figura 3. A. Corte transversal del colon en el que se observan microvellosidades intestinales. B. Biopsia de la mucosa normal. Se observan las microvellosidades, la mucosa, la *muscularis mucosae* y la submucosa.

Fuente: <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit6/peptidases.7.html>

El epitelio que separa a la mucosa de la luz intestinal está formado por células polarizadas y adheridas entre sí, formando las vellosidades intestinales, de 0.5-1.5 mm, con forma de hoja en el duodeno y digitiformes en el colon. En la base de dichas vellosidades se encuentran las criptas de Lieberkühn, formadas por células con una alta tasa de replicación (renovación cada 2-5 días) que se desplazan por la vellosidad proporcionando una continua renovación de las células que la forman. (Figura 3).

La capa epitelial crea una lámina con permeabilidad selectiva gracias a los distintos tipos de uniones que conforman el epitelio intestinal. Esta permeabilidad selectiva permite aislar el contenido fecal de la luz intestinal mientras se bombean nutrientes selectivamente desde la cara apical hacia la mucosa para ser drenados hacia los capilares sanguíneos. La capa epitelial mantiene en su zona apical una serie de uniones paracelulares entre células adyacentes denominadas "Tight junction" (TJ) o uniones estrechas formadas por tres familias de proteínas transmembranales: ocludinas, claudinas y "Junction Adhesion Molecules" (JAMs). Estas proteínas interactúan con proteínas análogas de la célula adyacente fusionando las membranas y creando una unión impermeable a lo largo del perímetro apical. La porción citosólica de estas proteínas interactúa con proteínas de la zónula ocludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) que a su vez interactúan con proteínas del citoesqueleto. (Figura 4).

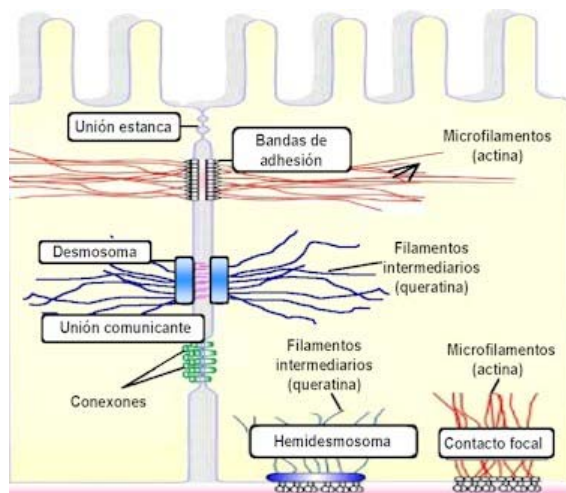


Figura 4. Por debajo de la zona apical se localizan las bandas adherentes y desmosomas, que permiten la interacción con las células vecinas, y en las que participan filamentos de actina e intermedios. En la membrana basal se encuentran las adhesiones o contactos focales y hemidesmosomas. En estas uniones participan filamentos de actina y intermedios respectivamente. Anclan el epitelio a la lámina propia mediante interacción de la membrana citoplasmática basal con la matriz de la lámina propia. Fuente: www.javeriana.edu.co/.../citoesqueleto.html

2.3.1. Células del epitelio intestinal

Las células epiteliales intestinales están altamente especializadas. Entre ellas podemos diferenciar:²⁹ (Figura 5)

- Células progenitoras situadas lateralmente en las zonas basales de las criptas que dan lugar al resto de células que forman los epitelios intestinales.
- Enterocitos que absorben nutrientes y actúan como "Antigen Presenting Cells" (APC) ya que expresan en su superficie el "Major Histocompatibility Complex" (MHC). Secretan también quimioquinas para el reclutamiento de otras APC así como de células de la inmunidad adaptativa.⁴²

| Conceptos inmunológicos |
|---|
| <p>MHC: Comprende una serie de genes con distinto nombre según la especie, HLA en humanos, H-2 en ratón. Las moléculas para las que codifican se expresan en las membranas de APC, pudiendo diferenciarse 2 tipos:</p> |
| <p>MHCI: expresado en todas las APC. Reconocen antígenos citosólicos e interacciona con el receptor de los linfocitos T, "T Cell Receptor" (TCR) de CD8+.</p> |
| <p>MHCII: expresado en células dendríticas, B presentadoras y macrófagos. Reconocen antígenos extracitosólicos e interaccionan con el TCR de CD4+.</p> |
| <p>En humano hay 3 tipos de MHC I: HLAI-A, HLAI-B y HLAI-C y 3 tipos de MHC II: HLAII-DP, HLAII-DQ y HLAII-DR.</p> |

- Células M son células epiteliales especializadas que se localizan en el epitelio intestinal y en la lámina propia. Secretan una gran cantidad de moléculas como citoquinas, quimioquinas, leucotrienos, prostaglandinas, enzimas, heparina, histamina, etc. Estas células disponen de distintos receptores capaces de reconocer bacterias o partes de ellas, así como otros antígenos lumbinales que procesan, para presentarlos mediante MHC a las células de la inmunidad adquirida o adaptativa.⁴³ La desregulación de estas células puede provocar alteraciones en la permeabilidad intestinal y en la redistribución de las TJ durante una infección o por estrés.⁴³

- Células caliciformes que producen las mucinas del moco intestinal.

Homeostasis intestinal

- Células de Paneth con forma piramidal, se localizan en la base de las criptas y están especializadas en la producción, almacenamiento en gránulos y posterior secreción de péptidos antimicrobianos como lisozimas, fosfolipasa A2, defensinas para la regulación microbiana, y angiogensinas para el control microbiano y fúngico. También producen sustancias inmunoregulatoras como prostaglandinas, ácido araquidónico, etc. Cada cripta contiene unas 5-12 células de Paneth con una tasa de renovación de unos 20 días.²⁹

Conceptos inmunológicos

Inmunidad innata, también conocida como natural o inespecífica, la conforman distintos mecanismos de defensa, TLR, complemento, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, etc. Estos elementos no aumentan por exposiciones repetitivas y no discriminan individualmente a los patógenos o sustancias extrañas.

Inmunidad adquirida, adaptativa o específica se induce por la exposición repetida a sustancias extrañas. La forman los linfocitos principalmente.

Respuesta humoral forma parte de la inmunidad adquirida y la llevan a cabo los linfocitos B que producen Ig específicas para la eliminación de antígenos.

Respuesta celular también forma parte de la inmunidad específica y la llevan a cabo los linfocitos T citotóxicos (Tc) CD8⁺ y los linfocitos T colaboradores o "helpers" (Th) CD4⁺.

- Células enteroendocrinas cuya principal función es secretar hormonas a los capilares en el tejido conectivo en respuesta a cambios en el ambiente externo.²⁹

- Linfocitos intraepiteliales (IEL) están ubicados en la cara basal del epitelio. Por cada 100 enterocitos hay entre unos 10-30 IEL, aunque este número puede verse incrementado hasta 80 IEL por 100 enterocitos e incluso superar al número de enterocitos en procesos inflamatorios. Los IEL son linfocitos T y como tales presentan el receptor TCR para el reconocimiento de antígenos. Existen distintos tipos, $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que se expresan en el epitelio un 70-90% y 30-10% respectivamente en IEL.⁴⁴ El receptor TCR está formado por una serie de correceptores, CD3 presente en todos los linfocitos T y los correceptores CD4, CD8. En el epitelio existe una polarización de la población T hacia CD8+ respecto CD4+ (85% vs 15%).

Los IEL son células T memoria que llegan al epitelio siguiendo un gradiente de quimioquinas, tras ser estimulados en los órganos linfoides secundarios. La función que se ha asociado a los IEL es la de supresores y vigilancia inmunológica frente a células infectadas o tumorales.⁴⁵ Además algunos subtipos parecen estar involucrados en la homeostasis y reparación del epitelio. Se ha visto que los IEL $\gamma\delta$ producen "Keratinocyte Growth Factor" (KGF), factor de crecimiento queratinocítico que induce la proliferación y diferenciación de células reparando el tejido lesionado.⁴⁶

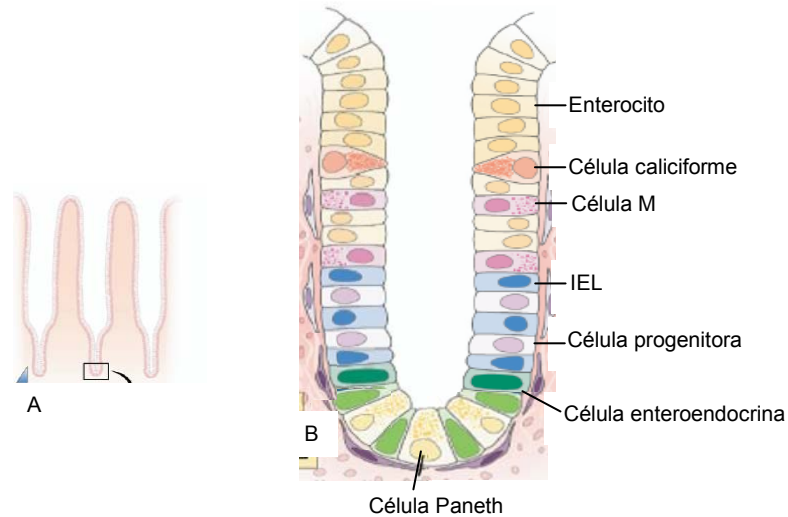


Figura 5. A. Microvellosidades intestinales. B Cripta de Lieberkühn y los distintos tipos celulares que la integran. Las células progenitoras se diferencian a enterocitos o a células caliciformes que migran hacia la parte apical de la cripta. Si se diferencian a células de Paneth o a células enteroendocrinas migran hacia la parte basal de la cripta. Los enterocitos son células columnares altamente polarizadas caracterizadas por el ribete en cepillo o microvilli en contacto con la luz intestinal y recubierto por el moco intestinal. La polarización de estas células permite el transporte transcelular, de la luz intestinal al interior celular, y paracelular, entre células vecinas. Las células de Paneth se consideran importantes elementos de la inmunidad innata ya que protegen a las células madre de las criptas y controlan la densidad microbiana del lumen mediante la secreción del contenido de sus gránulos. Las células M sirven de nexo entre la inmunidad innata y la adquirida, regulan la migración, maduración, y activación de células dendríticas secretando $TNF\alpha$, $IL1\beta$ tras la estimulación de TLR. Fuente: David H. Scoville et al. *Gastroenterology* 2008;134:849-64.

Estos linfocitos también expresan en sus membranas proteínas con distintas funciones, los llamados "cluster de diferenciación" (CD). (Tabla 3).

Las células que conforman el epitelio tienen una serie de receptores para el reconocimiento de las bacterias que llegan al lumen intestinal, ya sean de la

flora autóctona o patógenos. Si forman parte de la flora autóctona se dará una respuesta de tolerancia dirigida a su inactivación pero si se reconoce como patógeno se pondrá en marcha la respuesta inmune.

Tabla 3. Moléculas de membrana presentes en IEL

| Molécula | Función |
|---|---|
| CD2 | Característico de IEL |
| CD3 | Común para todos los linfocitos T. Correceptor de TCR |
| CD4 | Correceptor 15% IEL |
| CD8 | Correceptor 85% IEL |
| CD28 | Coestimulador (ligando CD80 presente en APC) |
| CD44 | Receptor de adhesión |
| CD25 | Marcador de activación y receptor de IL2 (cadena α) |
| CD69 | Marcador de activación. |
| CD122 | Receptor de IL2 (cadena β) |
| CD103 ($\alpha_E\beta_7$) | Ubicación en epitelio |
| CD49 ($\alpha_4\beta_7$) | Rodamiento linfocitario |
| Receptores quimioquinas | Ubicación |

El sistema inmune innato comprende una serie de elementos humorales y celulares que tienen como función detectar y responder de forma rápida a una infección. Para ello existen una serie de receptores, entre ellos los TLR, que inducen distintas cascadas de activación extracelular, como la activación del complemento, así como distintas cascadas de activación intracelular que provocan una respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria es imprescindible para eliminar el patógeno, pero en exceso puede dañar el tejido o incluso provocar una sepsis, para evitarlo existen distintos mecanismos de control. De esta manera la respuesta innata inicia y marca la magnitud de la respuesta adaptativa que acontecerá, y ésta a su vez puede limitar o regular la respuesta innata.⁴⁷ Recientemente algunos de estos receptores se han asociado con la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias crónicas.

Conceptos inmunológicos

Los linfocitos reconocen antígenos mediante receptores de membrana, TCR en linfocitos T, y BCR, en linfocitos B. El BCR está formado por inmunoglobulinas unidas a membrana y moléculas coestimuladoras. El TCR está compuesto por una estructura similar a las inmunoglobulinas y moléculas coestimuladoras. Estos receptores reconocen antígenos unidos al MHC de las APC y se activan. Para que la activación sea completa, en el caso de los linfocitos T es necesaria la interacción del antígeno-TCR y de las moléculas coestimuladoras (CD3, CD28), mientras que los linfocitos B necesitan adicionalmente interactuar con los linfocitos T a través de la coestimulación de B7-CD28, presentes en linfocitos B y T respectivamente. Recientemente se ha descrito en ratón una activación total de células B *naive* a B plasmáticas independientemente de linfocitos T, a través de TLR presente en B.⁴⁸ La activación de los linfocitos desencadena un proceso de expansión clonal por el que proliferan los clones específicos para ese antígeno. Este proceso de expansión clonal dura entre 3 y 5 días.

2.3.2. Receptores "Toll like"

Los TLR fueron descritos inicialmente en *Drosophila melanogaster*.⁴⁹ Engloban unas 11 moléculas distintas en mamíferos, 9 completamente caracterizadas en humano. Cada TLR puede reconocer uno o varios ligandos (tabla 4). Para este reconocimiento los TLR funcionan como heterodímeros o como homodímeros. Una vez se une el TLR a su ligando específico adquiere una conformación que le permite reclutar proteínas adaptadoras, como MyD88, mediante los dominios citoplasmáticos TIR presentes en éstas y en los TLR. (Figura 6).

Tabla 4. Receptores "Toll like" y sus ligandos.

| TLR | Ligando | Microorganismo |
|-------|--|--|
| TLR1 | Lipopéptidos triacil de bacterias | <i>Neisseria, Bardia, Mycobacterium</i> |
| TLR2 | Lipoproteína, peptidoglicano, HSP60 | Gram +, <i>Mycobacterium</i> , espiroquetas, micoplasma |
| TLR3 | RNA cadena doble | Virus |
| TLR4 | Endotoxina | Gram negativas, virus sincytial |
| TLR5 | Flagelina | Bacterias |
| TLR6 | Peptidoglicano, zimosan | Hongos |
| TLR7 | Imidazoquinolina <i>in vitro</i> , RNA cadena simple | Virus |
| TLR8 | Imidazoquinolina <i>in vitro</i> , RNA cadena simple | Virus |
| TLR9 | CpG DNA bacteriano | Bacterias y virus |
| TLR10 | DNA procariota | Bacterias |
| TLR11 | Profilina | <i>Toxoplasma gondii, E. coli</i> , bacterias uropatógenas |

Fuente: Myeong Sup Lee y cols. Biochem 2007;76:447-80.

Homeostasis intestinal

Los TLR se encuentran en diversos tipos celulares, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células M, células epiteliales, monocitos, NK, enterocitos, miofibroblastos, linfocitos B y T.⁴⁸

Los TLR presentes en las células del epitelio intestinal constituyen una conexión entre el compartimiento extraepitelial, donde interactúan con sus ligandos; y el intracelular donde desencadenan una cascada de señales provocando una respuesta celular en el compartimiento subepitelial. En condiciones normales, los TLR juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis, la estimulación de TLR2 por la flora autóctona promueve la supervivencia de los enterocitos, activa mecanismos citoprotectores como la secreción de mucinas e induce la secreción de IL10.⁴⁷ Se ha observado que la estimulación de TLR2 provoca la activación y translocación de algunas isoformas de la "Protein Kinase C" (PKC) que activan proteínas de las TJ (ZO-1) y esto hace aumentar la resistencia transepitelial de los enterocitos.⁴⁰ El efecto homeostático de estos receptores queda patente mediante distintos estudios con animales de experimentación que no expresan TLR o MyD88 en los que se ve alterada la función barrera siendo estos animales más susceptibles a infecciones y a la inflamación.⁴⁷

La función de los TLR varía en función de la localización, mientras que en el epitelio intestinal funcionan principalmente regulando la función barrera, además de intervenir en el reconocimiento de la flora autóctona y patológica, en la lámina propia intervienen en la activación y maduración de algunos tipos celulares. En este sentido, se ha podido comprobar que la activación de los TLR desencadena la maduración de las células dendríticas, pasando de un fenotipo inmaduro con secreción de IL10 y capacidad de inducir tolerancia,⁵⁰ a un fenotipo maduro que secreta IL12, expresa moléculas coestimuladoras (CD86, CD80, B7) y MHC, y participa en la presentación antigénica a linfocitos T.⁵¹ Los TLR seleccionan el repertorio de células presentes en la mucosa intestinal,⁵² así como modulan la activación de linfocitos T, la proliferación, la supresión de células T reguladoras y la secreción de citoquinas.⁵³

Se ha observado que la administración de la mayoría de agonistas de TLR, previa inducción de colitis, previene el desarrollo de ésta, mientras que si se administra una vez desarrollada la colitis empeora el proceso inflamatorio. Únicamente ha demostrado propiedades terapéuticas en la evolución de la colitis el agonista de TLR2 (PCSK). Por otro lado la administración continuada de agonista acaba provocando efectos negativos.⁴⁷

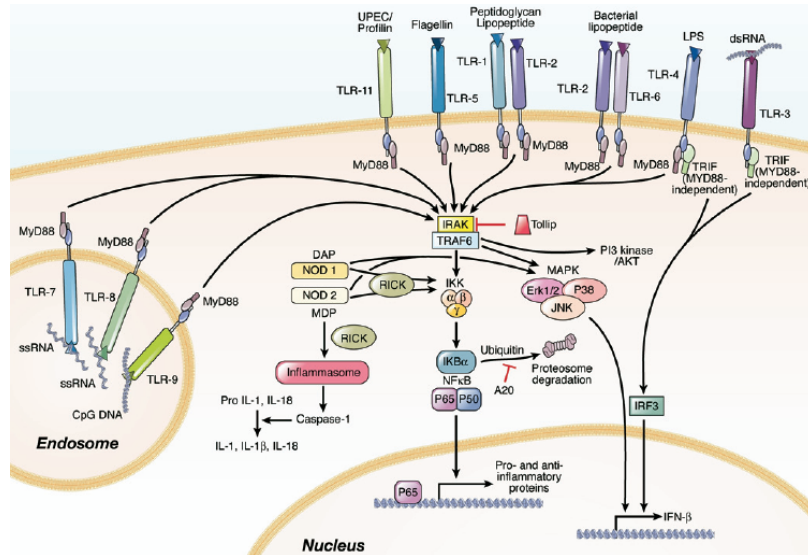


Figura 6. TLR engloban 2 tipos de proteínas, de membrana citoplasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) e intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9). Se caracterizan por tener un dominio de unión a productos bacterianos o virales, “leucine-rich repeats” (LRR) y un dominio “Toll/IL1 receptor domain” (TIR), característico también de receptores de citoquinas y esencial para el funcionamiento de los TLR ya que le sirve para unirse a moléculas adaptadoras. Existen 5 moléculas adaptadoras, MyD88, Tirap, Trif, Tram y SARM. Existen 2 vías de señalización, la MyD88 dependiente, utilizada por todos los TLR, excepto TLR3, y la MyD88 independiente a través de la cual señaliza TLR3 y que también puede utilizar TLR4. Las proteínas adaptadoras reclutan y activan MAPK (ERK, p38, JNK, etc.) que activan factores de transcripción como AP-1, IRF3/5/7 o NFκB. “Nucleotide-binding Oligomerization Domain” (NOD) es otro tipo de receptor intracelular compuesto por un dominio C-terminal, LRR de interacción bacteriana y un dominio N-terminal de interacción con otras proteínas, “Caspase Activation and Recruitment Domain” (CARD). Estas proteínas reconocen peptidoglicano que contenga ácido meso-diaminopimelico (NOD1) y dipeptido murmil (NOD2). Fuente: R. Balfour Sartor y cols.³⁶

Una excesiva activación de los TLR se ha asociado a patologías como arteroesclerosis, LUPUS o sepsis. La función de control de los TLR se lleva a cabo mediante un proceso de “feed back” negativo,⁵⁴ en el que se ha descrito la participación de ciertas citoquinas (IL10, TGFβ) producidas por distintos tipos celulares y algunos miRNA.⁵⁵

2.3.3. "Nucleotide-binding Oligomerization Domain"

NOD son proteínas citosólicas que reconoce elementos microbianos tras la invasión de la célula. Se expresan en células epiteliales presentadoras de antígeno, células dendríticas, macrófagos y en las células de Paneth. (Figura 6).

En condiciones normales se expresan niveles bajos de estas proteínas. Su expresión se ve aumentada en respuesta a procesos inflamatorios y frente a citoquinas inflamatorias. Igual que sucedía con los TLR, los receptores NOD al activarse por unión específica a ligando desencadenan la activación de "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK) y del factor de transcripción NFκB, generando la consiguiente inflamación.⁵⁶

Aunque no se conocen los mecanismos moleculares concretos, recientemente se ha descrito la regulación negativa que ejerce NOD2 sobre TLR2, con lo cual su ausencia desencadena una respuesta Th₁ masiva por parte de TLR2. También se ha descrito la relación entre NOD2 y defensinas, la expresión de estas requiere de la activación de NOD2 y/o NOD1.⁵⁷

En definitiva, el epitelio intestinal mantiene un aislamiento selectivo pero además es capaz de participar activamente en la regulación de la tolerancia y en la inmunidad innata.

2.4. Compartimiento subepitelial

El compartimiento subepitelial está formado por la lámina propia, la *muscularis mucosae* y la submucosa. La lámina propia está formada por una monocapa de miofibroblastos,⁵⁸ linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T NK, células NK, células dendríticas, monocitos y macrófagos. La *muscularis mucosae* separa la lámina propia de la submucosa en la que encontramos terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos a través de los cuales llegan nutrientes, oxígeno y linfocitos inactivos.

En el compartimiento subepitelial se localizan estructuras organizadas del GALT: Placas de Peyer, folículos linfoides, ganglios linfáticos mesentéricos y el

epitelio asociado a tejido linfoide. Estas estructuras difieren en localización, estructura tisular y función específica. Los distintos tipos celulares que encontramos en estas estructuras tienen funciones inmunológicas diferentes, armonizando las señales activadoras y supresoras a través de acciones coordinadas desde la inmunidad innata hasta la adquirida.

2.4.1. GALT

El sistema GALT es un componente asociado al sistema inmunológico central, médula ósea y Timo de donde provienen y maduran los linfocitos T y B. Además de GALT existen órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, el bazo, el sistema inmunológico asociado al respiratorio, el sistema inmunológico cutáneo, etc. Los conductos linfáticos unen y comunican todos estos órganos linfoides mediante vasos que se unen en el ducto torácico para desembocar en la vena cava superior. En las distintas estructuras de GALT (placas de Peyer, folículos linfoides, ganglios linfáticos mesentéricos y el epitelio asociado a tejido linfoide) se orquestan toda una serie de acciones inmunológicas por parte de una amplia variedad celular.

2.4.2. Células del compartimiento subepitelial.

La lámina propia forma parte del tejido linfoide asociado a GALT. No obstante, el componente celular que lo compone no se halla organizado en estructuras foliculares, sino más bien ejerce una labor de vigilancia inmunológica continua con una amplia variedad efectora. Entre las células que la componen destacan: (Figura 7)

- Células M que también se encuentran en el compartimiento epitelial. Son APC que captan, procesan y presentan antígenos a linfocitos.
- Macrófagos, provienen de los monocitos sanguíneos que se activan y convierten en macrófagos. Su principal función es la de fagocitar patógenos, producir citoquinas y quimioquinas que activan y atraen neutrófilos y desencadenar la activación y proliferación de linfocitos efectores. A su vez, los linfocitos activados producen citoquinas que refuerzan la activación de

macrófagos convirtiéndolos en potentes fagocitos. Los macrófagos son APC que, además, secretan factores de crecimiento para fibroblastos encargados de la reparación del tejido dañado durante el proceso inflamatorio.

- Células dendríticas son APC que se caracterizan por una alta plasticidad, pueden abrirse paso a través de las uniones de las células epiteliales, sin alterar la barrera intestinal, y "lanzar" sus dendritas fuera del epitelio para captar antígenos. Existen 2 tipos de células dendríticas, las mieloides que provienen de precursores mieloides, y las plasmocitoides de origen desconocido.⁵⁹ Ambas poblaciones presentan un estado inmaduro en el que se dedican a testar antígenos propios y de la flora intestinal, confiriendo tolerancia mediante la generación de T reguladoras; y un estado de madurez en el que expresan MHC y moléculas coestimuladoras para poder interactuar con linfocitos T polarizando la respuesta inmunológica.⁶⁰ Se ha determinado que para la maduración plena de las APC tienen que activarse los TLR que presentan, vía MyD88 dependiente o independiente. El proceso de maduración conlleva la mejora de la expresión de MHC, la expresión de moléculas coestimuladoras que interaccionaran con los linfocitos T y la expresión de quimioquinas.⁶¹

- Linfocitos T de lámina propia (LPL) pueden ser *naïve*, efectores, reguladores o de memoria. Todas las subpoblaciones se encuentran aumentadas en la EII.^{62,63} Los LPL expresan distintas moléculas coestimuladoras, receptores de quimioquinas y de citoquinas. Inversamente a lo que sucede con los IEL los LPL expresan mayoritariamente CD4⁺, respecto CD8⁺, (60% frente al 40%). Pero continua predominando el TCRαβ respecto TCRγδ.

- Linfocitos B activos se convierten en células plasmáticas responsables de la secreción de IgA, IgG e IGM así como de los anticuerpos específicos contra los antígenos invasores. La IgA, la cual se secreta inespecíficamente, es un elemento importante en la estabilidad de la función barrera como reguladora de la flora. En este sentido se ha podido constatar que cuando no se secreta IgA se da un cambio en la población anaerobia del intestino.⁶⁴

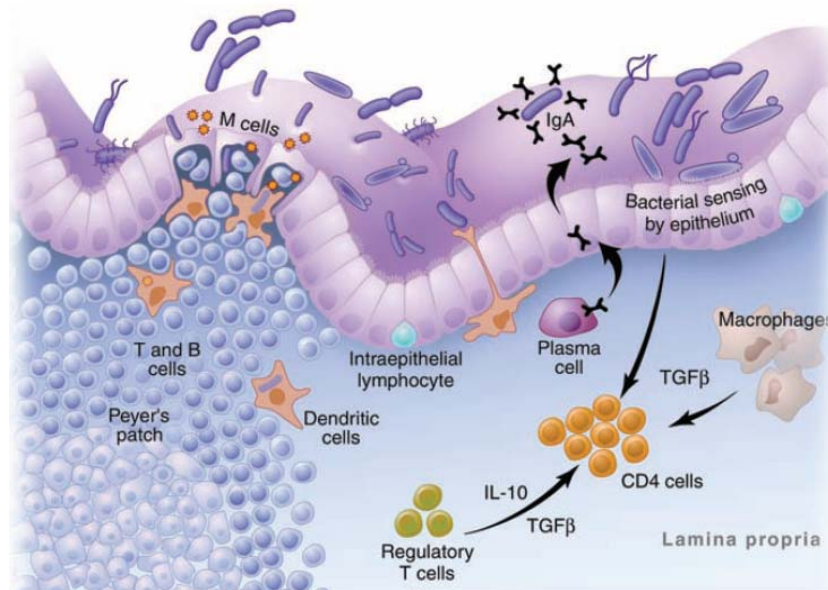


Figura 7. Tipos celulares del compartimiento subepitelial. Fuente. MacDonald TT y cols. Science 2005;370:1920-5.

- Células "Natural Killer" (NK) forman parte del sistema inmune innato. Son linfocitos granulares (contienen perforina y granzima) provenientes de la médula ósea y cuyo lugar de maduración no está totalmente definido. Parece ser que la maduración se da en los tejidos linfoides secundarios donde interacciona con células dendríticas participando recíprocamente en su maduración en la adquisición de la tolerancia.⁶⁵

Las NK no expresa TCR, CD3 ni BCR, expresan CD56 y una serie de receptores activadores (CD16, CD80, CD43, NCK) e inhibidores (KIR, ILT, CD94/NKG2) que reconocen a las células dianas y activan la función NK.⁶⁵ Estas células tienen dos funciones básicas, una función citotóxica mediante la secreción de sus gránulos en el citoplasma de las células diana o iniciando la apoptosis mediante la activación de receptores de muerte (Fas, TRAIL); y una función secretora de citoquinas ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL3, GM-CSF, M-CSF) y quimioquinas.⁶⁶ Lisan células infectadas por virus, por parásitos intracelulares, opsonizados por anticuerpos o células tumorigénicas que no expresan el MHC I.⁶⁵

Se ha descrito la existencia de NK en el compartimiento intraepitelial de un modelo experimental de colitis.⁶⁷

- Linfocitos T NK (NKT) son una población linfocitaria particular ya que expresan un TCR poco frecuente que interactuará con MHC atípicos (CD1d, MR1). Además estas células expresan receptores característicos de las células NK, CD161. Las células NKT se dividen en cuatro subpoblaciones, dos de las cuales se encuentran en la mucosa intestinal, las iNKT y las mNKT. Estas células tienen capacidad efectora citotóxica y son capaces de activar a otras células por la producción de citoquinas.⁶⁸ Las células iNKT reconocen lípidos endógenos y exógenos unidos a CD1d expresado en células dendríticas, linfocitos B y T, así como en enterocitos. Producen IL4 e INF γ . Su función principal es antitumoral y reguladora. Se ha descrito la existencia de iNKT en el compartimiento intraepitelial.⁶⁹ Las mNKT reconocen péptidos presentados por MR1 y secreta INF γ y TGF β . Su función principal es participar en la tolerancia oral y estimular la secreción de IgA, aunque su interacción con otras células inmunes puede resultar en la polarización de respuestas inmunes Th₁, Th₂ y Th₃. Las células NKT son prácticamente indetectables en animales GF por lo que la presencia de la flora bacteriana parece ser indispensable para la expansión de este tipo celular.⁷⁰

- Fibroblastos, células que residen en el tejido conectivo. Sintetizan fibras de colágeno y mucopolisacáridos que mantienen la matriz extracelular de la lámina propia proporcionando una estructura de entramado. Cuando se activan a través de TLR se transforman en miofibroblastos, expresan miofibrillas y secretan colágeno. En el intestino coexisten dos tipos, células intestinales de Cajal, situadas entre la mucosa y la *muscularis mucosae* e implicadas en la motilidad intestinal; y los miofibroblastos subepiteliales intestinales que regulan la proliferación y diferenciación de células epiteliales. Están implicados en la protección de la mucosa, reparación tisular, transporte de agua y electrolitos y en el metabolismo de los componentes de la matriz extracelular. Recientemente, los miofibroblastos subepiteliales intestinales se han relacionado con la EII ya que pueden ser estimulados por IL17, IL22 e IL31 e inducen la expresión de otras citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas.⁷¹ Además, el carácter inflamatorio crónico de la EII se ha asociado a la

sobreproducción de colágeno, lo que provoca fibrosis complicando la curación de las lesiones intestinales.⁷²

2.5. Interacción huésped-ambiente

El tracto intestinal está en continuo contacto con múltiples y variados antígenos provenientes de la comida y de la flora intestinal. Esta interacción es indispensable para una correcta y óptima respuesta inmunológica. La mucosa intestinal tiene que ser capaz de configurar distintas respuestas, desde la tolerancia frente a antígenos inoctrinos y comensales, hasta la respuesta inmunológica frente a antígenos patológicos para eliminarlos.

2.5.1. Tolerancia e inflamación constitutiva.

En la adquisición de la tolerancia a bacterias comensales juegan un papel clave las células dendríticas. Células dendríticas inmaduras interactúan con la flora intestinal mediante TLR y producen citoquinas antiinflamatorias como IL10 y TGF β generando tolerancia. Mediante este proceso de interacción vía TLR se desencadena el proceso de maduración de las células dendríticas que migran hacia órganos linfoides secundarios, como las Placas de Peyer o los ganglios linfáticos mesentéricos, donde interactúan con linfocitos T generando una respuesta T reguladora o con B induciendo la producción de inmunoglobulinas, IgA, IgM o IgG.

Cuando las células dendríticas detectan un patógeno se desencadena la misma señal intrínseca, pero las citoquinas que secretan son proinflamatorias, además se envía otra señal por parte de enterocitos, productores de un gradiente de quimioquinas para el reclutamiento de células de la inmunidad innata (macrófagos y neutrófilos) y de la respuesta adaptativa, (linfocitos).⁴³ Como consecuencia de esta doble señal las células dendríticas quedan altamente activadas generando T efectoras o "helpers" tipo 1 (Th₁) e induciendo la secreción de anticuerpos específicos para el antígeno por parte de las células B en los órganos linfoides secundarios.⁷³ Además, la activación de los linfocitos por las células dendríticas comporta la expresión de integrinas en los linfocitos T para su ubicación.⁷⁴

Por lo tanto el tipo de activación en las células T (respuesta efectora, capacidad de memoria, isotipo antigénico, etc.) que induzca las células dendríticas dependerá del proceso previo de maduración y del contexto celular inmunológico en el intestino.

En condiciones normales la mucosa intestinal contiene células memoria y algunas células efectoras, creando lo que se conoce como "inflamación fisiológica". Esta inflamación tolera la presencia de antígenos de la microflora comensal y de los alimentos. Cuando se desregula este equilibrio pueden aparecer procesos inflamatorios incontrolables como el que sucede en las EII, caracterizado, entre otras cosas, por un gran número de células linfocitarias en el intestino.

| Conceptos inmunológicos |
|--|
| Tolerancia central: proceso que se da en el timo y medula ósea para la eliminación de clones de linfocitos T y B autorreactivos. |
| Tolerancia periférica: falta de respuesta frente a un antígeno por baja densidad de éste; por falta de moléculas coestimuladoras provocando un estado de anergia; por incapacidad de provocar una respuesta efectora o supresión/regulación llevada a cabo por distintas células reguladoras. |
| Tolerancia oral: tipo de tolerancia periférica caracterizada por la ausencia de respuesta frente a antígenos que se han administrado previamente por vía oral. |

2.5.2. Activación de la respuesta inmune.

Cuando se detecta un patógeno mediante TLR o NOD se desencadena una cascada de señalizaciones intracelulares que activan la expresión de genes que codifican para citoquinas. Las citoquinas activan macrófagos, células T *naïve*, células B y T memoria, etc. Los macrófagos, las células dendríticas y las células M secretan prostaglandinas, leucotrienos y otras sustancias que provocan la quimiotaxis de neutrófilos componentes de la respuesta innata, que fagocitan patógenos o antígenos opsonizados por el complemento o por inmunoglobulinas. De esta manera se lucha frente a los patógenos de forma inmediata, mientras se prepara la inmunidad adquirida. Las APC captan

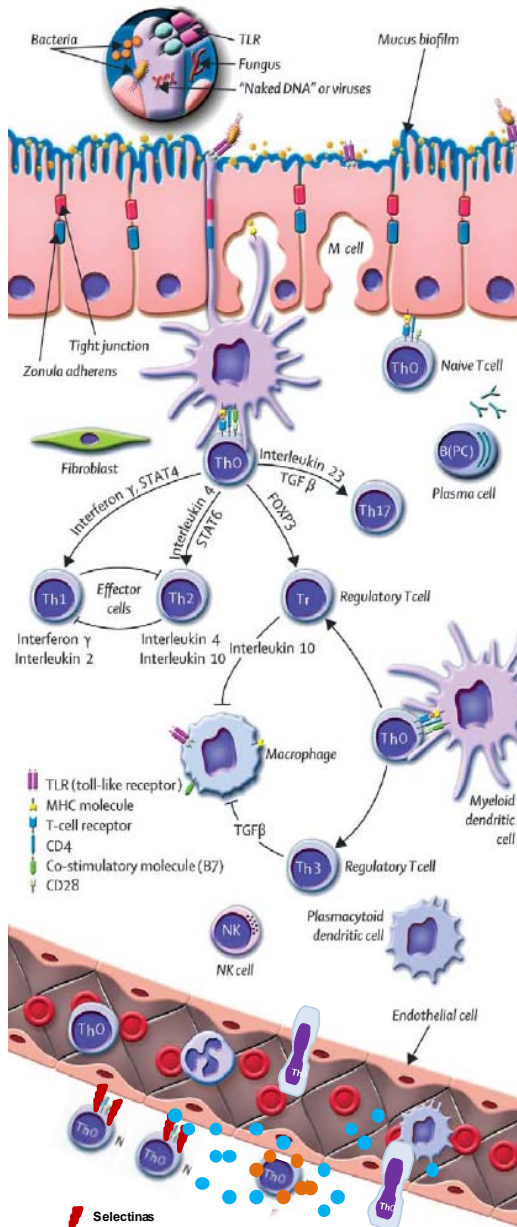


Figura 8. Activación y reclutamiento celular. Fuente: Baumgart DC y cols.²

patógenos, los procesan y exponen los antígenos de éstos en sus MHC para presentarlos a las células T y B, activando la inmunidad adquirida.

La presentación antigénica en los órganos linfoides secundarios comporta la polarización hacia linfocitos T efector (Th, Tc, T reguladores y/o T memoria). Mientras que las células B generan una población efectora (células B plasmáticas) productoras de anticuerpos específicos y de memoria.⁶² Sea cual sea su diferenciación abandonan los lugares de inducción (órganos linfoides secundarios) mediante el sistema linfático. Los conductos linfáticos unen y comunican todos los órganos linfoides, donde se da la presentación antigénica, mediante vasos que se unen en el ducto torácico que desemboca en la vena cava superior.

El reclutamiento celular desde el sistema circulatorio a los lugares de inflamación sigue un proceso ordenado de distintas interacciones.

Las células endoteliales de las vénulas en los órganos linfoides expresan moléculas de adhesión y selectinas como resultado de su activación por citoquinas proinflamatorias. Las selectinas se unen a moléculas tipo mucina que expresan los leucocitos. Esta interacción provoca una unión débil que el flujo sanguíneo transforma en rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio

vascular. Los leucocitos migran a través de las células endoteliales interactuando con integrinas y moléculas de adhesión. Además, las células endoteliales, los enterocitos y los macrófagos del tejido inflamado secretan un gradiente de quimioquinas que se unen a los receptores expresados en los leucocitos, de manera que los leucocitos con distintas funciones (efectora, memoria o reguladora) llegan selectivamente al lugar donde se produce el proceso inflamatorio. (Figura 8).

| Conceptos inmunológicos |
|---|
| Quimioquinas: proteínas expresadas por células endoteliales que participan en el reclutamiento celular en procesos inflamatorios. Se unen a receptores que se expresan sobre la superficie celular de células dendríticas y leucocitos. Las quimioquinas tienen funciones redundantes y a su vez los receptores no son específicos de una única quimioquina, asegurando el desarrollo de su función. |
| Integrinas: superfamilia de glicoproteínas que participan en la unión de las células con la matriz extracelular, en las uniones célula-célula y en el reclutamiento leucocitario. Algunas de estas integrinas pueden ser específicas para una sola molécula. |
| Selectina: proteína de adhesión a oligosacáridos de proteínas transmembranales. Se expresan en granulocitos, monocitos, linfocitos, plaquetas y células endoteliales. |

A. Respuesta efectora.

Linfocitos T "helpers"

Los linfocitos Th, mayoritariamente CD4⁺, se caracterizan por la secreción de distintas citoquinas que promueven la proliferación y diferenciación de linfocitos B, linfocitos T y macrófagos. Además las citoquinas atraen y activan macrófagos y neutrófilos para la fagocitosis del antígeno. La expansión clonal inducida por las APC sobre los linfocitos T puede dar lugar a distintos fenotipos efectores Th₁, Th₂ y Th₁₇. Estos fenotipos efectores se diferencian por el patrón de citoquinas que secretan. (Figura 9).

Las células Th₁ son el resultado de la estimulación de células T *naïve* en un entorno donde predomina IL12. Producen entre otras, IL2, IFN γ y TNF α y TNF β debido a la activación del factor de transcripción T-bet.⁷⁰ Son responsables de la activación de linfocitos T y del desarrollo de la hipersensibilidad de tipo retardado. Su función inmunológica va dirigida contra parásitos intracelulares, virus, protozoos y bacterias.

Por su parte, las células Th₂ producen IL4, IL5, IL10 e IL13 tras la activación del factor de transcripción GATA-3 inducido por IL4. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B, responden a bacterias extracelulares y a helmintos, y están implicadas en reacciones alérgicas, ya que la IL4 activa la producción de IgE y la IL5 activa a los eosinófilos.

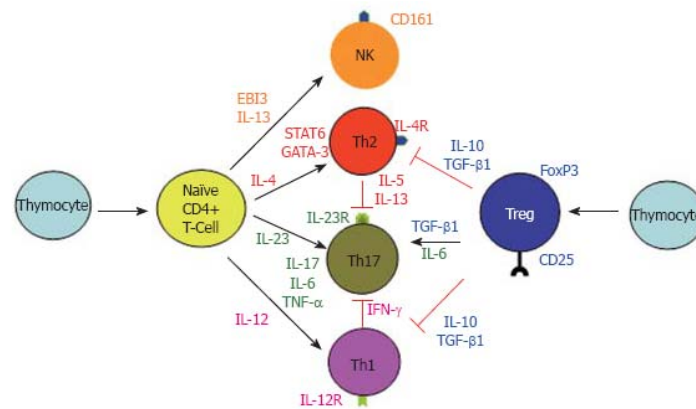


Figura 9. Células T efectoras. Las células Th₁ y Th₂ no solamente reciben las señales del otro tipo efector sino que además los linfocitos reguladores, los macrófagos y otras APC producen citoquinas que actúan sobre los linfocitos efectoras y las citoquinas de éstos sobre los macrófagos y las APC. Fuente: Shih DQ y cols.⁹¹

El tándem Th₁-Th₂ tiene una regulación cruzada. IFN_γ secretado por la Th₁ inhibe la proliferación de las células efectoras Th₂ y éstas, a su vez, secretan IL10 la cual inhibe indirectamente la secreción de IL2 e IFN_γ. Las Th₂ inhiben también la producción de óxido nítrico y otros bactericidas producidos por macrófagos, así como la secreción de IL1, IL6, IL8 y otras citoquinas proinflamatorias.

Th₁₇ se caracteriza por la secreción de IL17, IL21 e IL22, recientemente se ha descrito dos subpoblaciones capaces de secretar adicionalmente a IL17, IFN_γ⁷⁵ o IL10,⁷¹ respectivamente. Estudios recientes han determinado que la formación del granuloma característico de la EC lo forman una subpoblación de macrófagos que expresan el marcador F4/80 y que producen grandes cantidades de IL23. Esta citoquina, producida también por una subpoblación de células dendríticas, está implicada en la diferenciación de Th₁₇. La diferenciación

de esta subpoblación se debe a la activación del factor de transcripción RORC (ROR δ t homólogo murino) o inducido sinérgicamente por TGF β e IL6.⁷⁰

La sobreexpresión de IL17 e IL23, igual que sucede con las citoquinas Th₁ y Th₂, provoca efectos deletéreos con el agravante de que la subpoblación Th₁₇ tiene un mayor poder patogénico que Th₁. El bloqueo de IL23 en animales colíticos por DSS provoca una mejora de la inflamación, mientras que el desarrollo de la colitis en animales "Knock out" (KO) para IL10 queda totalmente inhibido. En contrapartida se ha observado en modelos animales que el déficit de IL23 provoca un incorrecto funcionamiento de la inmunidad innata, desarrollándose una mayor susceptibilidad a infecciones y apareciendo una mayor mortalidad. Por su parte IL17 fortalece las TJ y constituye un potente agente quimiotáctico de Th₁.⁷⁶ El bloqueo de IL17 en modelos experimentales de EII provoca una colitis más grave, mientras que en KO IL10 no tiene un impacto sobre la colitis a no ser que se bloquee simultáneamente la IL6 (citoquina implicada en el desarrollo de la subpoblación Th₁₇).⁷⁷

| Conceptos inmunológicos |
|-------------------------|
|-------------------------|

| |
|---|
| <p>La IL10 está producida mayoritariamente por Th₂ pero también por otros tipos celulares como células B, mastocitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, CD8+, CD25+FoxP3+, Th1, Th17 y Tr1. La IL10 induce la diferenciación de Tr1. La IL10 es una citoquina reguladora o inmunosupresora con un amplio espectro de propiedades antiinflamatorias. Particularmente inhibe la función de macrófagos y células dendríticas, incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias (IL1β, TNFα, IL12p40 e IL17) y moléculas coestimuladoras, MHCII, etc. La IL10 también induce la producción de IgA por parte de las células plasmáticas.</p> <p>El tratamiento con IL10 suprime el proceso inflamatorio en diversos modelos experimentales de EII. En humanos, la acción de IL10 es algo más modesta debido en parte a diferencias experimentales del estudio.</p> |
|---|

Tradicionalmente se hablaba de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, aunque en la actualidad se ha redefinido esta clasificación. Mientras que algunas citoquinas sí que son claramente proinflamatorias (TNF α), otras pueden desempeñar funciones antiinflamatorias o reguladoras en función del contexto intestinal (TGF β). Por lo tanto lo que determinará la respuesta inmune global dependerá en buena medida de los niveles relativos de células Th₁/Th₂/Th₁₇ pero también de la población de células T reguladoras.

Linfocitos T citotóxicos

Los Tc lisan células que producen o contienen antígenos extraños, o células infectadas por microorganismos intracelulares o virus. Mayoritariamente son CD8⁺. Tras la activación antigénica siguen un programa de proliferación y diferenciación a células Tc, que se caracterizan por sintetizar sustancias para la eliminación de patógenos (perforina y granzima A y B), y para la modulación de la apoptosis vía ligando de Fas (FasL).⁷⁸

B. Regulación celularLinfocitos B reguladores

Tanto en ratón como en humanos se ha observado que en procesos inflamatorios no inducidos por LPS las células B pueden secretar IL10. Ésta subpoblación se denomina células B reguladoras. La producción de IL10 es inducida por linfocitos efectores Th₂ en los ganglios linfáticos mesentéricos y vía TLR de estos linfocitos B.⁷⁹ Estas células regulan la evolución de la inflamación pero no la iniciación de ésta. En modelos animales experimentales de colitis tipo Th₂ se ha demostrado un efecto regulador de las células B que suprimen la inflamación cooperando con linfocitos T CD8⁺ y NKT; además de colaborar de forma directa o indirecta con células T reguladoras.⁴⁸

Linfocitos T reguladores

Las células T reguladoras constituyen un papel fundamental en la configuración de la tolerancia y de la homeostasis mediante la segregación de citoquinas antiinflamatorias frente a antígenos comensales. Regulan la activación de las células *naïve* y la actividad de las células efectoras. Existen distintos fenotipos de células reguladoras como Treg, Ti-Treg, Th3, Tr1 y otras menos caracterizadas como NKT, CD4⁻CD8⁻, CD8⁺CD28⁻, CD8⁺α supresoras y TCRγδ.

Las células Treg, CD4⁺CD25⁺, son originadas en el timo durante los primeros días de vida pasando posteriormente a la circulación periférica. También pueden generarse en periferia mediante TGFβ a partir de células *naïve*, Ti-Treg. Las células CD4⁺CD25⁺ se encuentran en un estado de anergia ya que no

responden a estímulos mitogénicos y secretan niveles bajos de IL2. El CD25 no es exclusivo de células reguladoras sino que se expresa también en células activadas, pero la activación del factor de transcripción FoxP3 induce la programación de un patrón genético específico y responsable del fenotipo regulador. FoxP3 puede inducirse en células *naive* por TGF β , hecho que encaja con la formación de Ti-Treg.⁸⁰ La función reguladora se puede llevar a cabo por contacto, por secreción de citoquinas reguladoras (TGF β , IL10) y por competencia de factores de crecimiento.⁸¹ (Figura 10).

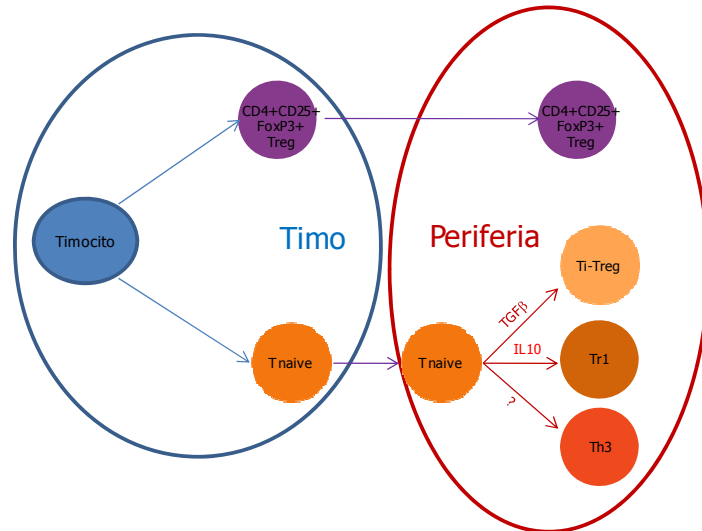


Figura 10. Células T reguladoras.

Las subpoblación Th3, descritas a raíz de las investigaciones sobre la tolerancia oral,⁸² pueden ser tanto CD4⁺ como CD8⁺, produce citoquinas inmunosupresoras (TGF β) y citoquinas Th₂ (IL4 e IL10). A partir de antígenos administrados de forma oral las células T se transforman en Th₃ implicadas en la adquisición de la tolerancia. Lo que no está claro es en donde ocurre en el intestino. Las Placas de Peyer parecen ser un lugar de presentación de antígenos orales y adquisición de tolerancia en modelos animales pero en cambio, en estudios en humanos, en placas de Peyer existe una elevada producción de IFN γ y una respuesta Th₁ que es característica de un ambiente inflamatorio más que de generación de células reguladoras.⁸³

Las células Tr_1 fueron identificados inicialmente en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada. Este tipo celular produce niveles elevados de TGF β , IL10 e IL5 pero no de IL4, citoquina característica de Th_2 . Parece ser que este tipo celular está controlado por el fenotipo celular regulador, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Una hipótesis probable es que las células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ originadas en el timo interaccionaran con células *naïve* dando lugar a la inducción y/o expansión de celular Tr_1 y/o Th_3 de forma dependiente de contacto pero independiente de citoquinas.⁸⁰

C. Linfocitos de memoria

Tanto los linfocitos T como los B efectores una vez se elimina el patógeno deben disminuir. Este proceso de control de la población se realiza mediante la activación de la apoptosis, muerte celular programada, quedando las poblaciones de linfocitos T y B memoria inactivos.

Las células B memoria no tienen capacidad efectora pero en un momento de alerta pueden reactivarse y pasar a ser células secretoras transitorias en respuesta a la activación antigénica de los linfocitos T, a citoquinas o a la activación de sus TLR presentes únicamente en B memoria, no en B *naïve*.⁸⁴ Su función es la de vigilancia, pueden circular entre los órganos linfoides durante largos periodos, hasta 20-30 años.

La población T memoria es mayoritariamente $CD8^+$. La principal función de esta población cuando es reactivada, es proliferar y producir citoquinas como IL2 e IFN γ en respuesta a la estimulación antigénica, pero sin capacidad directa de eliminar el antígeno. Las células $CD4^+$ memoria mantienen un repertorio policlonal variado pero de clones poco numerosos. Su principal función es facilitar la respuesta efectora por otras células, linfocitos B y linfocitos Tc. Aunque la activación de estos no es dependiente de células $CD4^+$ memoria se observa una respuesta de mayor magnitud cuando participan $CD4^+$ memoria. La homeostasis entre células T *naïve* y memoria está controlada en parte por IL7 que se secreta constitutivamente.⁸³

2.5.3. Control de la inflamación, balance entre proliferación y apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada constituye un mecanismo de homeostasis en muchos procesos biológicos tan dispares como la formación de los espacios interdigitales durante la vida embrionaria, la destrucción del endometrio durante la menstruación o la eliminación del elevado número de células efectoras tras la expansión clónica una vez que se activa la respuesta inmunológica.

En el intestino la apoptosis está presente en procesos como la renovación de las células que forman la monocapa epitelial para la eliminación de las células que quedan dañadas o que llegan a su ciclo final. En cambio, en las células inmunes la apoptosis juega un papel importante para evitar la acumulación de células efectoras que acabarían dañando el tejido.

La apoptosis constituye un tipo de muerte celular ordenada frente a la necrosis. En la necrosis la célula se ve dañada por causas externas alterando las mitocondrias. Los iones y el agua entran en la célula, ésta se hincha y acaba por romperse liberando su contenido. De esta manera, quedan en el medio distintas proteínas bioactivas que atraen células del sistema inmunitario provocando una reacción inflamatoria en la zona.

En cambio la apoptosis se caracteriza por un conjunto de cambios que ocurren sucesivamente de forma ordenada con el resultado final de la desaparición de la célula sin provocar un proceso inflamatorio. Durante la apoptosis disminuye el tamaño de la célula, se modifica el citoesqueleto, la membrana se arruga y la célula se encoge. La cromatina se condensa y el ADN acaba fragmentándose debido a la acción de las nucleasas que lo rompen en fragmentos múltiples de 200 pares de bases (pb). El núcleo se fragmenta y la célula se descompone en distintos trozos, los cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos y los neutrófilos.⁸⁵ (Figura 11)

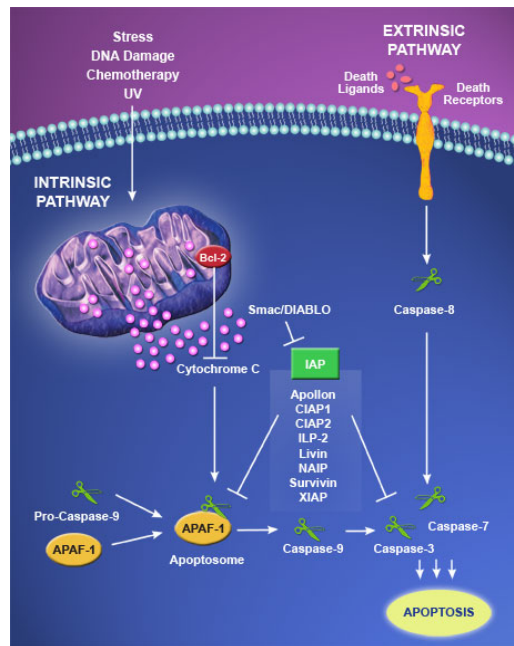


Figura 11. Apoptosis. Vía clásica o extrínseca, desencadenada por señales externas que interaccionan con Fas y el receptor de TNF provocando la activación de la caspasa 8 que inicia la apoptosis. Vía alternativa o intrínseca causada por señales internas. Están implicadas las membranas mitocondriales, del retículo endoplasmático y la envoltura nuclear. Se trata de un balance de las proteínas antiapoptótica y proapoptótica. Bax induce la apoptosis aumentando la permeabilidad de la membrana mitocondrial al citocromo C. Bcl-2 impide la activación de las caspasas por unión con el citocromo C reduciendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Fuente: www.imgenex.com/.../apoptosis-pathway6.jpg

3. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal

La teoría más consolidada de las causas de la enfermedad inflamatoria intestinal es el reconocimiento anómalo de la flora comensal por parte del sistema inmune de la mucosa intestinal, provocando una inflamación descontrolada y crónica en individuos con predisposición genética. Por lo tanto, aunque los factores causantes de la enfermedad inflamatoria intestinal no se conocen, si están bien delimitados los factores implicado; la dotación génica del individuo y la funcionalidad de los compartimientos de la mucosa cólica (epitelio y lámina propia) todo ello modulado por el ambiente, serán los determinantes del desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Tanto la Enfermedad de Crohn como la Colitis Ulcerosa presentan un patrón inmunológico característico y específico, y aunque comparten características son patologías distintas como consecuencia de diferentes alteraciones.

3. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal

3.1. Factores implicados en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal

En los últimos 50 años se ha observado un aumento de la EII pero también de otras enfermedades inflamatorias autoinmunes/crónicas como el asma, la esclerosis múltiple, etc. Mientras que enfermedades infecciosas como el sarampión, la tuberculosis, la fiebre reumática, etc., se han estabilizado o han disminuido. Estos cambios están relacionados con la mejora en la calidad de vida en general, una mejor nutrición, un mayor grado de higiene, un mejor control sanitario, además de la inmunización y el uso de antibióticos generalizados.

Esto configura lo que se conoce como la "hipótesis de la higiene".⁸⁶ Un estilo de vida "limpio" y por lo tanto con exposición a pocos y menos variados antígenos conllevaría una estimulación débil con una tolerancia más limitada que predispondría a alergias y atopias. Mientras que un estilo de vida "menos limpio" y por lo tanto con la exposición a un elevado y variado número de antígenos proporcionaría al organismo una mejor defensa.

Pero la EII no se debe exclusivamente a un mal funcionamiento del sistema inmune sino que existen diversos factores implicados que además interactúan entre sí. Cada individuo nace con una dotación de genes que determinará su genotipo tanto de su sistema inmune como de su sistema gastrointestinal. El genotipo gastrointestinal determinará la funcionalidad de elementos como la barrera intestinal, el sistema GALT y de la interacción de ambos la organización de su flora intestinal. Los elementos que conforman el panorama gastrointestinal de un individuo están afectados o modificados por factores ambientales como la dieta. De la interacción de estos elementos se obtendrá una determinada respuesta o fenotipo. (Figura 12)

La teoría más aceptada en la actualidad sobre la etiopatología de la EII es la desregulación de la respuesta inmunitaria frente a la flora intestinal propia y a

otros antígenos intraluminales en sujetos con susceptibilidad génica. Esta alteración de la homeostasis por la rotura del equilibrio del sistema inmune y la flora intestinal provoca el daño tisular con características radiológicas y endoscópicas particulares para cada entidad fenotípica de EII.

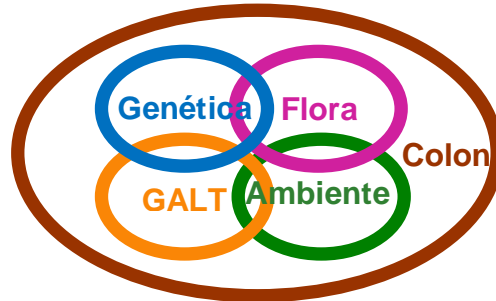


Figura 12. Factores implicados en el desarrollo de la EII.

Las EII se consideran enfermedades poligénicas complejas, la afectación de un conjunto de genes concretos combinada con factores ambientales conforma el fenotipo de cada una de estas entidades. Aunque deben existir genes específicos para cada una de ellas ya que las distintas entidades tienen características diferentes.

Los estudios en gemelos y en familiares de pacientes con EII muestran datos clave sobre la base genética de las EII. En gemelos monocigóticos existe un 37% de concordancia en el desarrollo de EC y un 7% en los dicigóticos, mientras que estos porcentajes son del 10% y del 3% respectivamente para la CU.⁸⁷

Entre el 5 y el 16% de los pacientes con EII tiene algún pariente de primer grado afectado de esta misma enfermedad. Respecto la concordancia parenteral del fenotipo de la enfermedad, del patrón patológico y de la presencia de manifestaciones extraintestinales de la EII es del 75%, 64% y 70% respectivamente.⁸⁷

Hasta la actualidad se han descrito 7 *loci* de susceptibilidad y unos 11 genes asociados al desarrollo o fenotipo de la EII. En las regiones de susceptibilidad existen numerosos genes candidatos a estar asociados a la EII. Debido a la

heterogeneidad fenotípica de la EII, no se ha conseguido determinar con exactitud el grado de implicación de los distintos genes. Los genes cuya alteración se ha asociado al desarrollo de EII, aunque no se muestran alterados en todas las poblaciones mundiales estudiadas, comprometen la correcta funcionalidad de la homeostasis intestinal.

3.2. Alteraciones de la flora intestinal

El hecho de que la flora intestinal de cada individuo sea distinta, que cambie a lo largo de la vida, con la dieta y con las medicaciones ha dificultado su estudio. Además, el uso de distintos procedimientos para la recogida y lavado de la biopsias así como el uso de técnicas para el análisis bacteriano con bajo rendimiento y la dificultad en el cultivo de algunas bacterias han dado lugar a observaciones en muchos casos discrepantes. Sin embargo, es evidente que las bacterias son un elemento imprescindible en el buen desarrollo de la homeostasis colónica pero también son un elemento sin el cual no se produciría la inflamación en la EII.

Diversos modelos en animales han demostrado que "sin bacterias no hay colitis". Todos los modelos experimentales fracasan en el desarrollo de la inflamación si los animales son mantenidos en un ambiente GF.⁸⁸ Las bacterias no sólo están implicadas en la instauración de los procesos inflamatorios sino que además son elementos imprescindibles en la perpetuación de la inflamación, a mayor densidad bacteriana mayor intensidad de la inflamación.⁸⁹ Por otro lado, el uso de antibióticos de amplio espectro, los cuales mejoran la inflamación del intestino, también relacionan a la microflora intestinal con la EII.⁹⁰

Los modelos animales han permitido conocer datos de la distribución bacteriana a lo largo del tracto digestivo. Un estudio con 2 modelos animales de colitis muestra como la relación bacterias-epitelio intestinal se define en función del tipo de interacción de las bacterias con el intestino.⁴¹ Esta relación configura una respuesta de tolerancia o de inflamación. Los animales que desarrollan colitis muestran una capa densa y gruesa de moco intestinal en el ciego la cual impide la fermentación pero también la adquisición de tolerancia frente a las

bacterias fermentadoras. Se observa una disminución de las bacterias fecales y un aumento de las bacterias que forman la capa entrelazada. Concretamente, ésta última presenta un aumento de densidad, grosor y extensión, desde el ciego hasta el colon medio. A pesar del aumento de la barrera física se observa un aumento de las bacterias invasivas adherentes que aparecen incluso en las criptas del colon distal. En resumen, en los animales que presentan el colon inflamado se invierte la relación bacterias-epitelio que se observa en animales sanos, predominando la adhesión, el aislamiento y la disminución de la fermentación.

Los distintos estudios de la flora colónica humana han descrito diferencias entre individuos sanos y afectados de EI. Estos últimos muestran una diversidad disminuida y un descenso en el número de bacterias anaeróbicas comensales como *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*. El hecho de que distintas especies tengan funciones redundantes asegura al huésped que se mantengan dichas funciones si se dan cambios en la comunidad. Algunos estudios señalan como cambios importantes la disminución de determinadas especies beneficiosas y el aumento de otras patógenas. En controles sanos se han observado 43 especies distintas de *Firmicutes* mientras que pacientes con EI solo presentan 13. Estos pacientes además presentaron más patógenos, *Pectinatus*, *Sutterella*, *Fusobacterium*, *Verrucomicrobium*, *Clostridia*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *M. paramyxovirus*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter hepaticus*.⁹¹

Contrariamente, otros estudios observaron un aumento de bacterias en EI respecto a los controles sanos. Pacientes con CU mostraron el doble de bacterias respecto los pacientes de EC. Seguramente esta diferencia refleja la alteración del moco intestinal que presentan los enfermos de CU, el cual es más delgado y menos sulfatado que el de los controles. El menor grosor del moco intestinal confiere un hábitat más seguro para la proliferación bacteriana, además, al ser menos sulfatado será más fácilmente degradado por las bacterias y les proporcionará un suplemento nutricional. Los pacientes con EC presentan una cantidad bacteriana similar a los controles pero muestran un predominio de la especie *Bacteroidetes* respecto a éstos, pero también respecto

a CU. Esta bacteria se presenta en estos pacientes en distintas localizaciones del colon estén o no inflamadas.⁹²

En línea con la idea de la importancia de la densidad bacteriana y de las distintas especies que se encuentran, Swidniski y cols.⁹³ observaron que los pacientes con EI muestran unos biofilms más gruesos, densos y adherentes que los controles. El 65% de los pacientes presentan más de 10^{11} bacterias/ml frente a una 35% de los controles que presentan más de 10^9 bacterias/ml. La presencia de bacterias en las criptas o intracelularmente fue escaso y se limitó a zonas no inflamadas. En pacientes que recibían tratamiento antibiótico se observó que algunas bacterias adherentes sobrevivían manteniendo su metabolismo silenciado. Los biofilms de los pacientes con EI presentan una baja diversidad en comparación con la composición de la masa fecal. De seis bacterias adherentes que se estudiaron cuatro se encontraron en el 10-50% de los biofilms de los pacientes, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, *Eubacterium rectale*, *Fusobacterium prausnitzii*, siendo *Bacteroides* la representante de las 2/5 partes del total de bacterias.

Otro hecho a tener en cuenta son los metabolitos que produce la microflora, que suponen el aporte de vitaminas, ácido fólico, ácidos grasos de cadena corta (butirato principalmente). Se ha observado que la microflora de pacientes con EI produce más cantidad de butirato y amonio y hasta un 25% más de ácidos grasos ramificados que la flora de controles sanos. El butirato es la fuente de energía más importante para las células epiteliales intestinales, si esta fuente disminuye pierde consistencia la función barrera y aumenta la susceptibilidad a la inflamación. El desarrollo de CU podría estar asociado a un defecto en la producción de butirato.⁹⁴ Por otro lado, los ácidos grasos ramificados y el amonio son tóxicos para los colonocitos pero se desconoce lo que sucede *in vivo* con estos elementos. En resumen los distintos metabolitos afectan por si mismos a la integridad del epitelio pero además, la presentación continua de antígenos al sistema inmune puede afectar al mantenimiento de la actividad inflamatoria.⁹⁵

La idea principal a tener en cuenta sobre la flora bacteriana es que actúa como una comunidad. Esta organización está alterada en los pacientes con EII provocando una disbiosis, lo que desconocemos es si esta disbiosis es causa o efecto de la EII. El conocimiento de la distribución de los microorganismos no sólo es importante para el descubrimiento de las causas de la inflamación sino también para el uso de nuevas dianas antibióticas o de estrategias alternativas como la manipulación de la flora mediante probióticos o prebióticos.

| Conceptos nutrición funcional |
|--|
| Prebiótico: elementos no digeribles que benefician al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado grupo de bacterias del colon. |
| Probiótico: microorganismos vivos que producen un efecto beneficioso en la salud del huésped al ser ingeridos. |

3.3. Alteraciones del reconocimiento y procesamiento bacteriano

Debido a la dualidad de las bacterias, flora autóctona-patógenos, el huésped tiene distintos mecanismos para su reconocimiento, TLR y NOD entre otros. Estos receptores desencadenan procesos de respuesta inflamatoria pero también de tolerancia. Parece ser que los pacientes con EII tienen disminuida la tolerancia frente a su flora autóctona. Este hecho se ha demostrado en estudios donde se ha visto que los linfocitos de la mucosa de pacientes con EII activa proliferan *ex vivo* cuando se ponen en contacto con su flora microbiana autóloga cosa que no ocurre en pacientes con enfermedad inactiva o en los controles.⁹⁶ Todo esto sugiere que la inflamación fisiológica normal se ve truncada en la EII ya que se pierde la tolerancia y se da una respuesta inflamatoria patológica frente a la flora autóloga.

Los mecanismos que establecen y mantienen la tolerancia no están totalmente definidos pero lo que está claro es que comprenden características anatómicas particulares de la mucosa, el conjunto celular y la flora intestinal. La adquisición de la tolerancia se establece durante la colonización del colon por parte de la microbiota en los primeros años de vida. La falta de tolerancia frente a antígenos comensales podría deberse a alteraciones de los TLR, entre otros sistemas. TLR4 está regulado positivamente en EC y CU mientras que el TLR3 lo

está negativamente en células epiteliales de EC activa. Mientras que el TLR5 que se expresa basolateralmente en individuos sanos desaparece en ambas enfermedades.⁹⁷

Los estudios genéticos han mostrado una asociación entre la EII y distintos polimorfismos de TLR4, TLR5 y TLR9 en distintas poblaciones.⁹⁸ Estudios de los polimorfismos de TLR1, TLR2 y TLR6 no han mostrado una clara relación con el desarrollo de EII pero sí con fenotipos concretos como la extensión colónica, la severidad o la edad de aparición.⁹⁸

La alteración genética más estudiada y asociada al desarrollo de EC es la alteración del gen CARD15, el cual codifica para NOD2. NOD2, como se ha comentado, reconoce patrones bacterianos conservados y activa NFκB y MAPK. Se han descrito 3 polimorfismos, 2 mutaciones que provocan un cambio en la secuencia aminoacídica y una tercera que provoca la síntesis de una proteína NOD2 mutada de menor tamaño.⁹⁹ Estas 3 mutaciones afectan a la región encargada de reconocer las secuencias bacterianas frente a las que actúan. Cabría esperar entonces que una incorrecta conformación de NOD2 conllevaría una disminución de la activación de NFκB. Contrariamente, los pacientes con EC se caracterizan por una actividad de NFκB aumentada respecto los controles sanos, por lo tanto, queda por determinar la función patológica exacta de NOD2. Lo que sí se ha determinado mediante el uso de distintos modelos experimentales con NOD2 mutado o que no lo expresan, es que NOD2 está relacionado con la regulación de TLR2, lo regula negativamente.¹⁰⁰ También se ha observado en estos modelos experimentales que existe una relación entre NOD2 y la expresión de criptidinas, homólogas murinas de las defensinas humanas, las cuales se ven disminuidas al estar mutado NOD2.¹⁰¹ La alteración de NOD2 por lo tanto conlleva alteraciones de las funciones fisiológicas del intestino como la función barrera, en la que juegan un papel importante las defensinas como parte del control de la flora autóctona a través de los TLR, así como en la respuesta adaptativa por la expresión de un patrón de citoquinas alterado por parte de algunos tipos celulares.

Aproximadamente entre el 35-45% de los pacientes con EC caucásicos, a excepción de pacientes escandinavos, irlandeses y escoceses, presentan alguna de las 3 mutaciones de NOD2. En los pacientes japoneses, chinos y en la población afroamericana no se han identificado variantes de CARD15. Se cree que CARD15 explica alrededor del 20% de la predisposición genética a la EC.¹⁰²

Otros defectos en el reconocimiento y eliminación de bacterias se han asociado genéticamente con la EII. NOD1 se expresa en el epitelio intestinal y al igual que NOD2 reconoce patrones de expresión bacterianos conservados, activa NFκB y facilita la apoptosis de células infectadas. Anteriores estudios lo descartaron en la asociación con la EII pero en la actualidad se ha asociado su alteración con la aparición temprana de EII y con manifestaciones extraintestinales.¹⁰⁰

Las defensinas, péptidos antimicrobianos, concretamente la β-defensinas 2 (HBD2) se ha asociado con determinadas formas de EC colónica. Un polimorfismo en el gen que codifica para esta defensinas provoca la disminución del número de copias de ésta, lo que conlleva una menor expresión y el consiguiente déficit en la neutralización de patógenos.¹⁰³

Otro ejemplo de la importancia de la inmunidad innata, es la rápida y eficiente eliminación de patógenos intracelulares mediante autofagocitosis. Se ha asociado la EC a un polimorfismo del gen ATG16L, el cual codifica para una proteína implicada en la fagocitosis de bacterias intracelulares, que se expresa en células epiteliales y en linfocitos T y B. Su déficit provocaría una ineficaz eliminación de algunas bacterias lo que vuelve a relacionar el desarrollo de EC con una alteración de la respuesta frente a la microflora.⁷⁵

3.4. Alteraciones de la barrera intestinal

La importancia del mantenimiento de la barrera intestinal está documentada en varios modelos animales.¹⁰⁴ En pacientes de EC se ha observado que la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) coincide con la aparición de brotes debido a que estos compuestos incrementan la permeabilidad intestinal.¹⁰⁵ Además se ha observado que los pacientes con EC y

CU, así como parientes de éstos, muestran alteraciones en la permeabilidad intestinal que se relaciona directamente con un componente genético.¹⁰⁶

La mutación de NOD2 implicada en el reconocimiento anómalo de bacterias también está implicada en la alteración de la función barrera. Los pacientes con NOD2 mutado presentan una mayor activación de NFκB que conlleva la expresión de un patrón alterado de citoquinas. Éstas alteran la expresión de proteínas que configuran las TJ, actúan sobre la apoptosis y la renovación del epitelio, comprometiendo el buen funcionamiento de la permeabilidad intestinal.⁹⁸

El locus IBD5 contiene genes que regulan la función barrera y que se han asociado a EII. Concretamente se han asociado dos genes localizados en este locus que codifican para transportadores catiónicos orgánicos, OCTN1 y OCTN2, y que están relacionados con el transporte de la carnitina implicada en el metabolismo de los lípidos.¹⁰⁰ Se ha detectado un polimorfismo en cada uno de estos genes, el conjunto de los dos polimorfismos forman un haplotipo de riesgo asociado a EC. Queda por determinar si estos polimorfismos son los causantes del desarrollo de EC o forman parte de un complejo génico más importante.

DLG5 es otro gen recientemente asociado al desarrollo de EC e implicado en la función barrera. Se trata de un elemento importante en el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales del colon. Variantes genéticas de este elemento pueden alterar la permeabilidad intestinal. Se ha asociado el desarrollo de EC a un polimorfismo que provoca una sustitución aminoacídica, mientras que otro polimorfismo se ha descrito como protector.¹⁰⁰

Otro componente que se ha visto alterado en pacientes con EII es el moco intestinal. Las mucinas configuran las características viscoelásticas del moco intestinal, anomalías en éstas harán al epitelio más vulnerable a una posible infección.¹⁰⁷ Los pacientes con EII presentan una disminución de la secreción de mucinas y presentan una mayor adhesión de las bacterias, que podría deberse a los cambios en el moco intestinal pero también a un cambio en el ecosistema

bacteriano de estos pacientes. Las mucinas además contribuyen en la reparación del tejido dañado, proceso que se ve comprometido en los pacientes con EII.¹⁰⁸

“MultiDrug Resistance gen” (MDR1), inicialmente relacionado con el desarrollo de cáncer, codifica para un componente de un transportador de ATP. Está altamente expresado en intestino e interviene en la interacción huésped-flora y en el mantenimiento de la homeostasis. Se ha observado en modelos experimentales que su deficiencia provoca el desarrollo de una colitis similar a la CU humana. En esta línea, recientemente se han asociado dos polimorfismos exónicos (C3435T y G2677T/A) de MDR1 al desarrollo de CU.⁹⁵

3.5. Alteraciones inmunológicas

3.5.1. Inmunidad celular

Una de las características de las EII es el aumento del infiltrado inflamatorio en la mucosa intestinal. Se ha observado que los pacientes de EII presentan mayor cantidad de linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células M que los controles sanos.⁵⁸ En el inicio de la inflamación se dan un gran reclutamiento de células involucradas en la respuesta innata, como neutrófilos y macrófagos.¹⁰⁹ Estas células secretan proteasas, histamina, quimioquinas y citoquinas para, entre otras cosas, reclutar células de la inmunidad adquirida y combatir al intruso. Pero estas sustancias, en exceso, acaban dañando la mucosa, alteran la permeabilidad intestinal y cronifican el proceso inflamatorio.⁴³ El reclutamiento de todas estas células está aumentado y se debe en parte a la expresión diferencial y aumentada de quimioquinas en el tejido inflamado así como de sus receptores en los linfocitos de los pacientes con EII respecto a los controles inflamatorios.¹¹⁰

Los linfocitos de los pacientes, además de estar aumentados, están activados y proliferan más activamente que los linfocitos de los controles sanos que presentan el fenotipo *naïve* predominantemente.⁶³ Una novedosa técnica, MELC “Multi-Epitope-Ligand Cartographie”, que permite el análisis múltiple y simultáneo de distintos marcadores proteicos que coexpresan o no en un

mismo tipo celular, ha dado nuevas claves de las diferencias celulares de los pacientes con EII respecto a los controles así como entre EC y CU,¹¹¹ determinando que los pacientes con EC presentan un aumento de linfocitos T activados respecto a los pacientes con CU y a los controles. Otro importante estudio ha observado resultados similares y ha concretado uno de los fenotipos de las poblaciones que están alteradas en EII. Tessa ten Hove y cols.,⁶³ han observado que los linfocitos T CD4⁺ presentan dos subpoblaciones, CD45RB^{high} y CD45RB^{low}, que se expresan de forma diferencial en la mucosa de pacientes con EII y controles sanos, mientras en sangre no se observan diferencias. La subpoblación CD45RB^{low}, mayoritariamente de memoria, no muestra diferencias entre controles sanos y pacientes con IBD, en cambio estos pacientes muestran un aumento de las células activas, CD45RB^{high}, respecto a las células memoria. También valoraron la producción de citoquinas tras activar las células de estos pacientes. Las células CD45RB^{low} y CD45RB^{high} de los pacientes con EII conjuntamente expresaron niveles bajos de IL10 y altos de TNF α respecto a los controles. El papel de estas subpoblaciones en la inflamación y en procesos de tolerancia ya se había descrito en modelos experimentales. La transferencia de CD45RB^{high} a animales inmunodeprimidos provoca una inflamación crónica mientras que si se cotransfiere la población CD45RB^{low} esta protege del proceso inflamatorio o lo retardada.¹¹²

Además de los fenotipos efectores clásicos, Th₁ y Th₂, de la EC y la CU, los cuales están aumentados, se ha observado una mayor secreción de IL17, característica del fenotipo efector Th₁₇, en la EII.¹¹³ Otras citoquinas recientemente descritas IL21, IL22 e IL23 están también aumentadas en EII, concretamente la IL23 se observa aumenta en zonas inflamadas y no en zonas inactivas.⁷⁷ En este sentido, recientemente se han asociado polimorfismos del IL23R con EC, concretamente alguno de estos polimorfismos parece proteger contra el desarrollo de EC.¹¹⁴ Este receptor se expresa en la población Th₁₇ caracterizada por expresar IL23R, IL17, IL21 e IL22. IL23 está formada por 2 subunidades p40 y p19, la expresión de esta última citoquina es inducida por TLR en APC. Esto sugiere que la flora autóctona provocaría un aumento de IL23

que prepararía un linaje para el muestreo de la luz intestinal en estado de inflamación fisiológica.⁷⁵

La población de células T reguladoras, el estudio de las cuales se basa mayoritariamente en el análisis del fenotipo CD4⁺CD25⁺, también está alterada en la EII. Los estudios que no diferencian entre EC y CU observan niveles y funcionalidad de CD4⁺CD25⁺ sin diferencias entre controles sanos y pacientes. En el estudio realizado mediante la técnica de MELC se ha observado que la población reguladora CD4⁺CD25⁺ se encuentra aumentada en la CU y no la en EC.¹¹¹ En cambio cuando se analiza la población FoxP3⁺ se observa una disminución respecto a los controles no inflamados. Esta disminución de T_H-Treg y Treg podría deberse a un fallo en la vía de señalización del TGFβ el cual se encuentra regulado negativamente por Smad7, molécula que se ha detectado elevada en la mucosa de pacientes con EII.⁸⁰

La funcionalidad de linfocitos T reguladores puede verse alterada por una incorrecta activación de las APC (células M, células dendríticas y macrófagos). De forma anómala puede inducirse la maduración de células dendríticas por un mal funcionamiento de los TLR y de esta manera inducirse la secreción de IL6 e IL23, las cuales bloquean la diferenciación del fenotipo T regulador e inducen el fenotipo Th₁₇.¹¹⁵ Esto podría justificar la acumulación de células T reguladoras en la lámina propia de pacientes con CU incapaces de suprimir la inflamación.¹¹¹ Pero además implica a los TLR los cuales están alterados en estos pacientes con EII así como sus células APC. En esta línea se ha observado en modelos animales e *in vitro* que las células dendríticas de pacientes con EII reconocen incorrectamente a las bacterias comensales e inducen una respuesta Th₁ y posiblemente Th₁₇, respuestas proinflamatorias normalmente dirigidas a patógenos.¹⁰⁹

No solamente existe un fallo en el reconocimiento y procesamiento de los antígenos por parte de las células dendríticas sino que además esta población celular está aumentada y se encuentra activada en pacientes con inflamación activa.¹¹⁶ El aumento de la activación de las células dendríticas se debe al

aumento de los macrófagos los cuales pueden activar la maduración de las células dendríticas.¹⁰⁹ Este aumento de células APC activas provoca una excesiva activación de linfocitos T que todavía se verá más reforzada por la activación que se inducen desde los enterocitos. En este sentido, se ha observado que las células epiteliales de pacientes con EII expresan moléculas coestimuladoras alternativas (B7h, B7-H1) que no expresan controles sanos y que activan o inhiben la proliferación de celular.¹¹⁷

No existen estudios recientes de la implicación de las células NK en el desarrollo de la EII, y entre los escasos estudios que existen se observan resultados opuestos. Mientras en CU se observa una actividad citotóxica de NK normal, en EC se han descritos aumentos de esta actividad¹¹⁸ y decrementos¹¹⁹ en mucosa. Por otra parte, se ha descrito una disminución de la actividad citotóxica natural de las células NK en circulación que parece estar debida a la secreción de citoquinas por otros tipos celulares.¹²⁰

Las células NKT y más concretamente las subpoblaciones iNKT y mNKT presentes en el intestino son un elemento importante en la respuesta innata. Esta población celular muestra una dualidad funcional ya que por una parte participa en la adquisición de la tolerancia oral y por otra elimina patógenos. La alteración de estas células, documentada en varias enfermedades como diabetes y esclerosis múltiple,¹²¹ provoca la secreción de importantes cantidades de citoquinas (IL13, INF γ , IL, GMCSF, TNF α , IL17)¹²² que pueden provocar daño tisular y alteración de las células dendríticas y macrófagos con las que interactúan a través de la interacción CD1d-TCR. A través de CD1d también interactúan con las células epiteliales intestinales induciendo su eliminación por apoptosis. Mientras en algunos estudios se ha observado que CD1d está sobreexpresado en la CU, otros no observan diferencias. Un aumento de la expresión de CD1d en los enterocitos provocaría la activación de NKT con la consecuente lisis de estos enterocitos y el aumento de la expresión de IL13. La suma de estos dos efectos provoca una importante permeabilización del epitelio intestinal. Por otro lado, la ausencia de CD1d provocaría el déficit de NKT y por lo tanto no se generaría tolerancia.¹²³

Respecto a las moléculas que presentan antígenos, los *loci* de los genes que codifican para HLA se ha asociado a la EII. Se han asociado distintos haplotipos de HLA a fenotipos particularmente agresivos de CU y de EC que necesitan cirugía.⁷⁵ Además, el subtipo HLA-DR⁺ en células CD4⁺CD25⁺ está aumentado en EC.¹¹¹

3.5.2. Inmunidad humoral

En la EII se da una producción exagerada de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en mucosa siendo más importante en la CU que en la EC. Los pacientes muestran títulos elevados de anticuerpos séricos contra antígenos de distinto origen. Estos anticuerpos facilitan el diagnóstico en algunos casos de colitis indeterminadas proporcionando inmunofenotipos de CU y EC. Por ejemplo, pacientes con EC que muestran valores elevados de IgG e IgA, ASCA y la ausencia de pANCA padecen brotes más agresivos, fistulizantes y fibrosos.⁹¹ (Tabla5).

Tabla 5. Anticuerpos presentes en la enfermedad inflamatoria intestinal

| Anticuerpo | Reconoce |
|-------------------|--|
| ECAC, hTM5 | Antígenos de células epiteliales de colon |
| Anti-tropomiosina | Proteínas del citoesqueleto |
| ASCA | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| pANCA | Antígenos nucleares bacterianos |
| Anti- + OmpC | <i>E.Coli</i> y <i>Pseudomonas fluorescencas</i> |
| CBir1 | Flagelina |

3.6. Alteración de la apoptosis

Las distintas subpoblaciones efectoras muestran distinta susceptibilidad a la apoptosis a través de CD95 (FasL), y cuya unión desencadena el proceso apoptótico. Las células Th₁ son menos susceptibles a la apoptosis que las Th₂, las células B *naïve* que no se activan mueren por apoptosis en unos días, mientras que las NK inducen la apoptosis en células infectadas por virus o de células tumorales. Citoquinas proinflamatorias como INF γ e IL2 activan la expresión de Fas en células T *naïve* y activadas *in vitro* mientras que el aporte *in vivo* de IL10 disminuye la expresión de Fas inducida por INF γ . En CU activa se ha observado que el infiltrado inflamatorio de células T expresa más FasL que en controles y EC. Estos linfocitos pueden interactuar con Fas expresado en los

enterocitos, induciéndoles la apoptosis y por lo tanto debilitando la función barrera.¹²⁴

Otras moléculas implicadas en el proceso apoptótico también están alteradas a distintos niveles en la EI. La relación Bcl2/Bax, proteína antiapoptótica y proapoptótica respectivamente, está elevada en pacientes con EI, en CU se ha visto que se debe a una disminución en la expresión de Bax, mientras que en EC se observa un aumento de Bcl2.¹²⁴

Mediante la técnica de MELC se obtienen observaciones complementarias.¹¹¹ Los linfocitos T de memoria de los pacientes con EI presentaron una baja expresión de proteínas involucradas en la apoptosis (Bax, caspasa 3 y caspasa 8) así como un aumento del NFκB activo, lo que confirma la resistencia a la apoptosis de estas células en pacientes con EC. Otra observación novedosa de este estudio es la regulación del proceso apoptótico diferencial entre células T *naïve* y memoria, estas poblaciones muestran distinta modulación en proteínas implicadas en la apoptosis, las células T memoria presentan una disminución de Bax, caspasa 3 y 8 respecto las T *naïve*.¹¹¹

Otra molécula implicada en la inducción de la apoptosis es el TNF. Diversos estudios han asociado distintos polimorfismos del gen del TNFα tanto a complicaciones de la EC, como la respuesta al tratamiento con anti-TNFα.⁷⁵ Otra proteína de la superfamilia del TNF, TNFSF15, se ha asociado a la EI, aunque la función de esta proteína está sin determinar parece ser que está implicada en la activación de NFκB.⁷⁵

3.7. Patrón inmunológico de la EC

La EC se caracteriza por una respuesta inmunológica polarizada hacia Th₁ y Th₁₇, con sobreexpresión de IFNγ, TNFα, IL12, IL18, IL17, IL23 e IL21. En lámina propia estos pacientes presentan niveles elevados de T-bet, receptor de la familia de T-box, implicado en la diferenciación de T *naïve* a Th₁.⁸⁰

La respuesta inmune Th₁ comienza con la activación de células T por células APC. Las células APC exponen los antígenos para presentarlos a los linfocitos T *naïve* y secretan IL12, la cual interacciona con su receptor localizado en las células T *naïve*. La interacción IL12/receptor provoca la activación del factor de transcripción STAT-1 y la expresión de T-bet que encamina la diferenciación hacia Th₁. Las células Th₁ diferenciadas expresan IFN γ que aumenta la sensibilidad de Th₁ a IL12 y promueve la activación de macrófagos y la secreción de TNF α . En este mecanismo también intervienen citoquinas descritas más recientemente como la IL17, IL18, IL21, IL22 y la IL23 de las cuales sólo se han descritos parcialmente los mecanismos de actuación.¹²⁵ (Figura 13).

El TNF α favorece el desarrollo y mantenimiento de la inflamación.⁸⁰ En este sentido uno de los principales avances terapéuticos en el tratamiento de algunas complicaciones de las EII ha consistido en el bloqueo de esta citoquina mediante un anticuerpo anti-TNF.¹²⁶

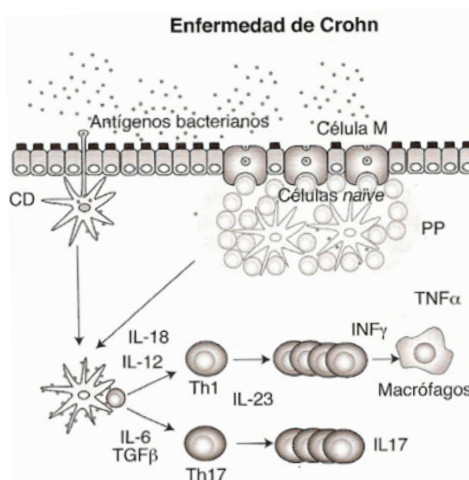


Figura 13. Modelo de la dinámica celular de la EC. Fuente: Fantini MC y cols.⁸⁰

Las células APC parecen ser básicas en el equilibrio que ha de darse en el intestino, tolerando a los antígenos comensales o inocuos y respondiendo inmunológicamente a aquellos patológicos. Estas células activas producen IL23 e IL6 las cuales están ampliamente expresadas en EC. La IL6 bloquea la actividad

de las células T reguladoras de manera que se bloquea la tolerancia y se favorece la respuesta inmunológica activa frente a un antígeno específico. La IL6 junto al TGF β , que en solitario promueve la diferenciación de células T reguladoras, promueven la secreción de IL21. Esta citoquina activa la expresión del IL23R que al recibir el estímulo de IL23 culmina la diferenciación de Th₁₇.¹²⁷ Th₁₇ se caracteriza por expresar IL17, IL21 e IL22. Los niveles de IL17 se encuentran elevados en EC y en modelos animales de colitis. La IL21 bloquea la expresión de FoxP3¹²⁸ y participa en el mantenimiento de la inflamación, lo que queda corroborado por estar altamente expresada en linfocitos T activados de lámina propia en pacientes con EC.⁸⁰ No está claro el papel de Th₁₇ en la EC pero lo que parece ser importante es el control de la IL6 en el proceso de equilibrio entre tolerancia/inmunidad.

Otra citoquina clave producida por las células APC es la IL12 la cual comparte con IL23 una subunidad, IL12 está formada por p35 y p40 mientras que IL23 está conformada por p40 y p19. La IL12 se expresa altamente en EC.⁸⁰ Induce la diferenciación de T *naïve* a Th₁, regula positivamente la mayoría de modelos experimentales de colitis, mientras que su neutralización mediante anticuerpos antiIL12p40, previene el desarrollo de colitis en modelos animales así como tiene efectos terapéuticos en humanos.¹²⁹

TL1A es una molécula regulada positivamente en EC y que se localiza en los macrófagos de lámina propia. La interacción de TL1A con su ligando, DR3, presente en linfocitos T, provoca el aumento en la expresión de IFN γ .⁸⁰ La producción de IFN γ también se ve aumentada por IL12, IL23, IL6, IL27 e IL18.⁷⁶ IL18 es secretada por células epiteliales y macrófagos. Distintos estudios muestran niveles elevados de esta citoquina en macrófagos y células epiteliales de pacientes con EC respecto a la CU y a los obtenidos en controles sanos.⁸⁰

3.8. Patrón inmunológico de la CU

La CU se caracteriza por una respuesta inmune Th₂ atípica mediada por NKT.⁹¹ Existe una sobreexpresión de IL5, IL13, entre otras, pero no se observan valores

aumentados de IL4. Además se expresan autoanticuerpos como pANCA y anti-tropomiosina en el 70% de pacientes con CU.⁸⁰

La patogenia de la CU se vincula a la penetración de antígenos a través de la barrera intestinal, que en individuos susceptibles genéticamente, son presentados por células APC generándose una respuesta Th₂ que incluye células T y NKT. Estas células activadas secretan IL13 e IL5 que provocarán inflamación y daño tisular típico de la CU. (Figura 14).

La gran producción de autoanticuerpos no los implica de forma primaria en la etiología de la CU, pero su producción es paralela a la sensibilización progresiva del sistema inmune contra autoantígenos.

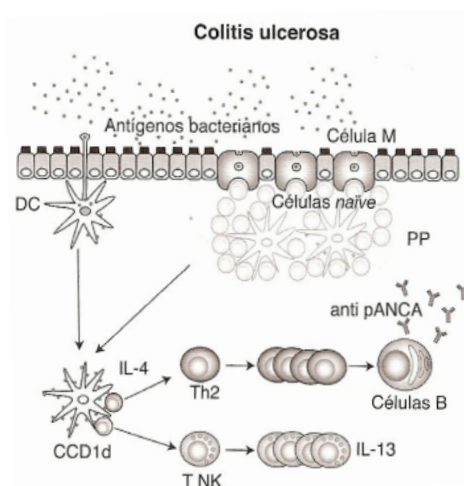


Figura 14. Modelo de la dinámica celular de la CU. Fuente: Fantini MC y cols.⁸⁰

4. Factores ambientales relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal. La grasa dietética.

La aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal ha ido acompañada del desarrollo de la población mundial. A medida que se ha mejorado el grado de higiene, la alimentación, la sanidad, etc., se han erradicado enfermedades infecciosas y han aparecido enfermedades inflamatorias autoinmunes, quedando patente la implicación del factor ambiental sobre el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal, y especialmente de la dieta. Cuando se analiza con detenimiento la evolución epidemiológica de esta enfermedad y los hábitos alimenticios de las poblaciones con mayores índices de incidencia se observa un aumento del consumo de grasas de la familia n_6 respecto a las poblaciones que presentan índices de incidencia bajos.

4. Factores ambientales relacionados con la EII. La grasa dietética.

4.1. Incremento de la calidad de vida

Los factores ambientales juegan un papel importante en la EII tal y como indican los estudios epidemiológicos. En el inicio de la caracterización de estas enfermedades parecían tener mayor incidencia sobre la etnia blanca de países industrializados, pero se ha visto en los últimos años que más que ir unidas a una etnia o región geográfica van unidas a un estilo de vida. Un estilo de vida occidental que incluye un grado de higiene alto, urbanización, cambios alimenticios y mayor sedentarismo, factores todos ellos que afectan a la configuración del sistema inmune. Los cambios alimenticios se basan en un aumento de la ingesta de azúcares, de hidratos de carbono y de grasas así como la disminución del consumo de frutas, verduras y fibra.

El tabaquismo parece ser un factor de riesgo para la EC pero supone un factor protector para la CU. Seis estudios sugieren que la apendicetomía es un factor protector frente a la CU, mientras que tan solo 2 estudios lo describen como un factor de riesgo para la EC. El uso de anticonceptivos orales muestra resultados también discordantes en distintos estudios. Mientras unos describen un discreto aumento de riesgo en el desarrollo de la EC y no en la CU, otros describen aumentos de riesgo en la CU. También existen resultados controvertidos en los estudios con AINE. Algunos muestran una clara relación entre consumo AINE y aparición EII, mientras que otros no.⁷⁶

La dieta parece ser un factor clave. Grupos étnicos asiáticos y africanos que presentaban bajas o nulas incidencias de EII han visto aumentadas éstas al emigrar a países occidentales y modificar sus hábitos alimentarios. También ha aumentado la incidencia en países que han desarrollado una mejora en la calidad de vida, caracterizada por la urbanización, un mayor grado de higiene y por la globalización de los modelos alimentarios occidentales.

4.2. Influencia de la dieta

La dieta ha sido desde hace más de 5000 años el agente terapéutico por antonomasia. Culturas milenarias como la india, china y japonesa ya utilizaban especias y otros nutrientes para tratar y curar enfermedades. En la actualidad la medicina alternativa basada en estas culturas tiene mucho peso en el tratamiento de enfermedades crónicas como la EII. Solo hay que hacer una búsqueda en el pubmed para ver la cantidad de publicaciones que aparecen de estudios con sustancias como el té verde, los polifenoles, boswellia, las cuales ejercen efectos positivos sobre el tratamiento de distintas dolencias.¹³⁰

Dietas como la japonesa, la esquimal y la mediterránea, consideradas dietas saludables, están basadas en el consumo de frutas, verduras y pescado, el cual muestra una buena correlación con una incidencia baja de EII.¹³¹ Estas dietas se caracterizan por una baja ingesta de grasas saturadas, alta en grasas monoinsaturadas y balanceada en ácidos grasos de las familias n6 y n3, a diferencia de las dietas occidentales actuales que se caracterizan por ser pobres en frutas, verduras, legumbres y ricas en grasas saturadas y azúcares. La relación n6/n3 que la "Food and Agriculture Organization" (FAO) recomienda que sea 5-10:1 en las dietas occidentales es de 15-20:1. Las poblaciones con estas dietas presentan incidencias altas de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y cáncer.¹³²

4.2.1. Componentes dietéticos

Los hidratos de carbono proporcionan principalmente energía. Además a partir de ellos se sintetizan ácidos grasos y colesterol y por lo tanto están involucrados en el metabolismo lipídico.

Las proteínas constituyen el 75% del peso seco de un organismo, aportan la base para la "construcción" y reparación de nuestros tejidos. Además son esenciales para el metabolismo. Están formadas por 20 aminoácidos, 8 de los cuales son esenciales, tienen que ser adquiridos mediante la dieta.

Algunos micronutrientes, las vitaminas y los minerales, confieren efectos antioxidantes, participan en procesos celulares de sinapsis, de transporte, de catálisis, etc.

La fibra por su parte agrupa elementos no digeribles por los enzimas digestivos humanos pero si por los de la microflora produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como propionato, acetato y butirato.⁸⁶ Existen dos tipos de fibras: solubles, totalmente fermentables por el colon, e insolubles, degradadas mínimamente por el colon. Entre las solubles se encuentran aquellas capaces de inducir el crecimiento de poblaciones bacterianas específicas y beneficiosas. Estas fibras se conocen como prebióticos. Sus efectos positivos consisten en retrasar el vaciamiento gástrico y disminuir el tiempo de tránsito intestinal. Las fibras solubles tienen la capacidad de secuestrar sales biliares afectando a la absorción de lípidos. La fibra, además, aumenta el peristaltismo intestinal, mecanismo que mejora la función barrera, y disminuye el pH por la fermentación. Todo ello provoca el aumento de especies como *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, bacterias beneficiosas, mientras disminuyen *Clostridium*.¹³³

Las grasas dietéticas y sus componentes, los ácidos grasos (AG), forman las membranas celulares y se utilizan como fuente energética del organismo. En exceso se almacenan y causan distintas alteraciones cardiovasculares, obesidad, etc. Los lípidos, además del aporte energético, constituyen membranas celulares, son precursores de hormonas, ácidos biliares y vitaminas (D), aportan ácidos grasos esenciales, etc.

4.3. Terapias de base dietética

Las dietas enterales, alimentación vía gástrica, y parenterales, vía intravenosa, son un tratamiento de elección en determinadas situaciones. El uso de dietas parenterales y enterales persigue la restauración de las condiciones no inflamatorias del colon ya que este tipo de tratamiento permite la disminución de antígenos presentes en el colon, la no alteración de la flora autóctona, la reducción de la secreción pancreática y biliar, el descanso cólico y la mejora del estado nutricional. Tras el tratamiento se observa una mejora de los parámetros

clínicos inflamatorios, de la histología y de la actividad de la enfermedad.¹³⁴ La principal desventaja es la invasividad del tratamiento, pero además en el caso de la dieta parenteral, se ha observado en modelos animales a los que se administró este tratamiento durante largos periodos, atrofia del intestino delgado.¹³⁵

Las dietas parenterales, sin ser una primera opción de tratamiento, en algunos casos concretos como EC refractaria a esteroides puede alcanzar porcentajes de remisión similares a los de pacientes tratados con esteroides. En la CU no hay evidencias de su efectividad.¹³¹

Las dietas enterales pueden ser de dos tipos, elementales y poliméricas. Las primeras contienen los componentes básicos de la dieta, aminoácidos, glucosa y triglicéridos de cadena corta. Las poliméricas contienen proteínas, polímeros de glucosa y triglicéridos de cadena larga. Se han realizado múltiples estudios para distintas enfermedades, variando los distintos componentes de las dietas enterales (exceso proteico, exceso lipídico, distintos AG, etc.) mostrando resultados controvertidos. Algunas de las dietas complementadas como las poliméricas con fibra, TGFβ o AGCC han resultado tener efectos positivos sobre la homeostasis colónica en la EII.⁵³ Respecto a los AG hay múltiples estudios donde se observan distintos efectos que comentaremos en los siguientes apartados.

| Conceptos nutrición |
|---------------------|
|---------------------|

| |
|--|
| <p>Lípidos: conjunto de moléculas orgánicas heterogéneas química y fisiológicamente. Están compuestas principalmente por carbono, hidrogeno y oxígeno. Como única característica común baja solubilidad como consecuencia de su hidrofobicidad.</p> |
|--|

| |
|--|
| <p>Grasas: Subclase de lípidos aunque en la práctica los términos lípido y grasa se utilizan como sinónimos. Grasa se utiliza generalmente para referirse al componente mayoritario de los lípidos, los triglicéridos que forman el 95% de éstos.</p> |
|--|

| |
|--|
| <p>Aceites: se diferencian de las grasas por el punto de fusión. Los aceites son productos grasos líquidos a 20°C, mientras que las grasas a esa temperatura son sólidos o semisólidos.</p> |
|--|

4.4. La grasa dietética

Los AG están formados por una cadena hidrocarbonada de 4 a 24 átomos de carbono y un grupo carboxil terminal. Pueden existir en forma libre pero suelen estar esterificados con glicerol (triglicéridos y fosfolípidos), colesterol o con otros alcoholes. (Figura 15).

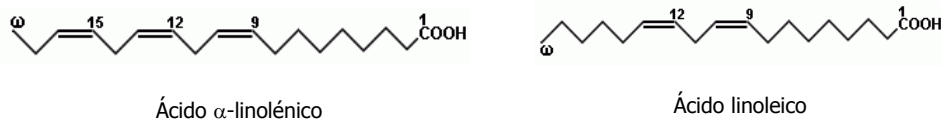


Figura 15. Estructura química ácidos grasos

En función de si tienen o no dobles enlaces se clasifican en saturados (AGS), sin dobles enlaces, e insaturados (AGI) con dobles enlaces. Estos últimos en función del número de enlaces pueden ser monoinsaturados (AGMI) o poliinsaturados (AGPI). En función de la longitud de la cadena hidrocarbonada se clasifican:

- AG cadena corta (AGCC): 4-6 átomos de C
- AG cadena media (AGCM): 8-12 átomos de C
- AG cadena larga (AGCL): 14 o más átomos de C

La nomenclatura de los ácidos grasos sigue la siguiente norma: CX:YnZ, donde X es el número de carbonos, Y el número de dobles enlaces y Z la posición del primer doble enlace.

Tras la ingestión de estos alimentos comienza la digestión mediante distintas lipasas, sales biliares y jugos pancreáticos, que culmina en la formación de los quilomicrones en el duodeno, susceptibles de ser asimilados por los enterocitos, desde donde pasan al sistema linfático y de aquí a la circulación.

Además del aporte de los AG de la dieta, a excepción de los esenciales, el resto de AG se sintetiza en el citoplasma de las células del hígado y el tejido adiposo mayoritariamente, a partir de precursores con la participación de desaturasas y

elongasas. El déficit de micronutrientes como vitaminas y minerales puede afectar a estos enzimas y por lo tanto a la síntesis de los AG. Por otro lado la biosíntesis de ácidos grasos a partir de otros no es siempre eficaz lo que supone que deben adquirirse a través de la dieta. (Figura 16).

Tabla 6. Ácidos grasos de la dieta

| Estructura | Nombre común | Fuente |
|--------------------------------------|-------------------------|---|
| Ácidos grasos saturados | | |
| C4:0 | Butírico | Leche de rumiantes |
| C6:0 | Caproico | Leche de rumiantes |
| C8:0 | Caprílico | Leche de rumiantes y aceite de coco |
| C10:0 | Caprílico | Leche de rumiantes y aceite de coco |
| C12:0 | Laúrico | Aceite de coco y aceite de nuez de palma |
| C14:0 | Mirístico | Aceite de coco, nuez de palma y otros vegetales |
| C16:0 | Palmítico | Abundante en todas las grasas |
| C18:0 | Estearico | Grasas animales, cacao |
| C20:0 | Aráquico | Aceite de cacahuete |
| C22:0 | Behénico | Ceras |
| Ácidos grasos monoinsaturados | | |
| C10:1n1 | Caproleico | Leche de rumiantes |
| C12:1n3 | Lauroleico | Leche de vaca |
| C16:1n7 | Palmitoleico | Nuez de macadamia y aceite de pescado |
| C18:1n7 | Vaccénico | Grasas de rumiantes |
| C16:1n9 | Oleico | Aceites vegetales |
| C22:1n9 | Erúcico | Aceite de Colza |
| C20:1n11 | Gadoleico | Aceite de pescado |
| C22:1n11 | Cetoléico | Aceite de pescado |
| Ácidos grasos poliinsaturados | | |
| C18:3n3 | α Linolénico | Soja y otros aceites vegetales |
| C18:4n3 | Estearidónico | Aceite de pescado, borraja y onagra |
| C20:5n3 | Eicosapentaenoico (EPA) | Aceites de pescado |
| C22:5n3 | Clupanodónico | Aceites de pescado |
| C22:6n3 | Docosahexaenoico (DHA) | Araquidónico |
| C18:2n6 | Linoleico | Aceites vegetales |
| C18:3n6 | γ Linolénico | Aceites de pescado |
| C20:4n6 | Araquidónico | Aceite de onagra y borraja |
| C22:4n6 | Adrénico | Aceites de pescado |
| C22:5n6 | Docosapentaenoico | Aceites pescado |
| C20:3n9 | Eicosatrienoico | Aceites pescado |

4.4.1. Funciones de los ácidos grasos

Los AG son importantes principalmente a dos niveles, aportan energía y son constituyentes de las membranas. Por lo tanto, la dieta tendrá una repercusión inmediata sobre la composición y fluidez de las membranas, lo que provoca cambios en la organización de éstas y de proteínas que se encuentran embebidas en ellas como receptores. Por ejemplo, una asociación combinatoria de distintos AG puede generar microheterogeneidades en las membranas creando microdominios, "Rafts" lipídicos. Diferencias en la composición y en la

organización de los "Rafts" se han asociado con diferencias en la señalización de linfocitos T y en la interacción con APC. Se han observado diferencias en los "Rafts" de Th₁ y Th₂, así como modulaciones de la activación de linfocitos T por la incorporación de AG de la familia n3 a las membranas.⁵³

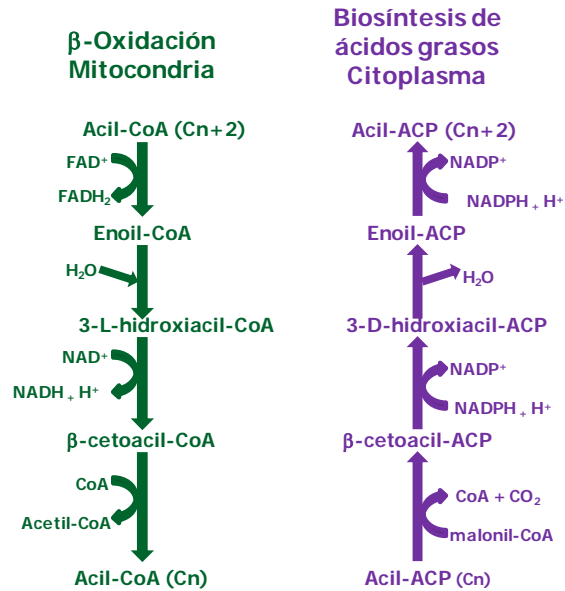


Figura 16. Síntesis y degradación de ácidos grasos

Los AG son precursores de mensajeros celulares, como las prostaglandinas y leucotrienos implicados en la inflamación.¹³⁶ Según deriven de los ácidos grasos n3 o n6 presentarán propiedades diferentes, los primeros son menos potentes biológicamente. (Figura 17).

Si consideramos la influencia de la dieta sobre el sistema inmune, se ha descrito que dietas altas en AGS pueden provocar la depresión de las competencias innata y adquirida, afectando a la actividad de células como macrófagos, células dendríticas o linfocitos T y aumentando la posibilidad de infección.¹³² En modelos experimentales de colitis inducida por Dextran Sulfato de Sodio (DSS), los animales alimentados con una dieta de alto contenido en grasas presentaban mayor susceptibilidad a la colitis además de modificaciones de su población IEL. Se observó un aumento de las células NKT y una disminución de las células T reguladoras, desarrollándose un patrón inflamatorio Th₁. Como se

ha comentado las células NKT contribuyen al desarrollo de la CU, paralelamente dietas con altos contenidos en grasa se han asociado a riesgo de desarrollo de CU,⁵³ lo que encaja con las observaciones obtenidas de estudios con animales de experimentación.

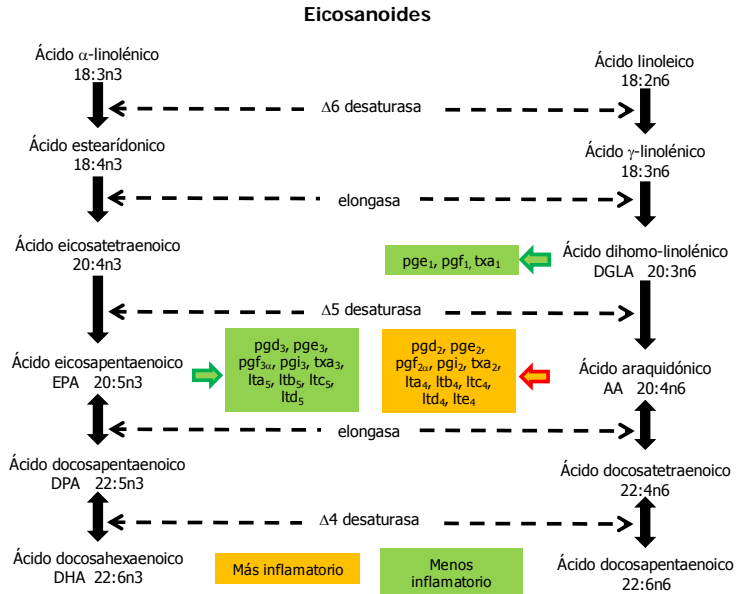


Figura 17. Síntesis de eicosanoides

A nivel de la inmunidad mediada por TLR se ha observado que determinados lípidos pueden actuar como agonistas o antagonistas de los TLR. Distintos estudios han demostrado que los AGS pueden activar TLR2, TLR4, tanto vía MyD88 dependiente como independiente, mientras que insaturados inhiben la señalización de TLR.¹³⁷ Por ejemplo, AGS vía TLR4 provocan el aumento de la expresión *in vitro* de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86, MHCII y citoquinas (IL6, IL12) en células dendríticas, que ven de esta manera aumentada su capacidad de activar células T. Otro ejemplo de la mediación de los ácidos grasos en la señalización de los TLR, es la formación de "Raft" lipídicos por parte de TLR2 en regiones celulares donde también se expresa CD36, receptor y transportador celular de ácidos grasos.

Por otro lado los AGPI son indispensables para la respuesta inmunitaria. Se observa que cuando hay déficit de una de las familias n3 o n6 se alteran las

poblaciones linfocitarias. Cuando se suministra n3 o se añade a cultivos celulares estos ácidos grasos se incorporan en membrana en detrimento de n6.

Los ácidos grasos también actúan sobre vías de señalización como la vía NFκB. Distintos estudios muestran evidencia de la capacidad de n3 para inactivar la vía NFκB inhibiendo la fosforilación de IκB, inhibidor de NFκB.¹³⁸ Otro nivel de regulación de NFκB lo realizan los "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors" (PPAR). Concretamente PPARγ reconoce AGPI, heterodimeriza con el receptor del ácido retinoico y se unen a regiones del promotor de determinados genes. Estos receptores se expresan en el colon y regulan la inflamación a través NFκB. La expresión de PPARγ se muestra disminuida en biopsias de pacientes con CU,⁵³ y los animales que no expresan estos receptores muestran mayor susceptibilidad a desarrollar colitis tras la administración de dextran sulfato de sodio (DSS).¹³⁹ En la misma línea, mediante un modelo animal KO para PPARγ se ha observado que estos animales desarrollan una colitis más agresiva cuando se le induce por DSS. Los neutrófilos y macrófagos muestran más receptores de quimioquinas así como más expresión de iNOS, IL1β, es decir una respuesta inflamatoria superior a los animales que expresan PPARγ.¹⁴⁰ La inducción de estos genes, iNOS e IL1β, también se inducen con administración de n3 vía PPARγ.¹⁴¹ *In vitro*, en una línea celular de colon, Caco-2, se ha observado que n6 induce la activación de NFκB así como ICAM-1, quimioquina que facilita la ubicación de macrófagos en el intestino. La activación de NFκB por parte de n6 podría darse vía PPARγ.¹⁴²

4.4.2. Ácidos grasos saturados y la inflamación intestinal

Los AGCC se obtienen como resultado de la fermentación de la fibra soluble y constituyen la principal fuente de energía para los enterocitos. Además de los efectos positivos conferidos por la ingesta de la fibra, regulación de la maduración, motilidad y función intestinal, los AG reducen el pH intestinal aumentando así la absorción de minerales y dificultando el crecimiento de enterobacterias y otros patógenos además de intervenir en el metabolismo lipídico y glucídico. Se han demostrado los efectos antiinflamatorios tanto del butirato como del propionato y acetato.¹⁴³ *In vitro* se ha visto que aumentan la

diferenciación y la apoptosis así como disminuyen la proliferación celular.⁹⁴ En los escasos estudios clínicos realizados se ha observado que la administración de enemas rectales de AGCC a pacientes con CU provoca una mejora del estado inflamatorio.¹⁴⁴ En modelos experimentales se observa que la administración intracólica de butirato estimula la reparación tisular, se evidencia la recuperación clínica, disminuye la inflamación y se restablece la absorción de electrolitos.¹⁴⁵

Los "Medium Chain Triglycerides" (MCT) son triglicéridos esterificados con ácidos grasos de cadena media. Estos ácidos grasos proporcionan fácilmente energía a los enterocitos pero también modulan la respuesta inmunitaria. En modelos animales de endotoxemia se ha observado que disminuyen la mortalidad, protegen la mucosa intestinal, disminuyen la actividad mieloperoxidasa, evitan hemorragias, aumentan la IgA tanto en suero como en intestino, disminuyen citoquinas proinflamatorias y aumenta la IL10.¹⁴⁶ Estudios con modelos experimentales de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) muestran valores menos inflamatorios en los animales a los que se les administra MCT frente a AGCL.¹⁴⁷ Además los animales que reciben MCT muestran un mejor estado nutricional.¹⁴⁸ En nuestro laboratorio pudimos comprobar en un modelo experimental de colitis por TNBS, como una dieta con MCT exclusivamente en la fracción lipídica era capaz de disminuir la producción de distintos mediadores inflamatorios, de forma similar a como lo lograba la dieta con ácidos grasos n3 y distinta a la dieta con ácidos grasos n6.

In vitro se han realizado escasos estudios con la utilización de MCT pero se ha observado que inhiben la producción de IL8, quimioquina implicada en el reclutamiento celular.¹⁴⁹

4.4.3. Ácidos grasos monoinsaturados

Los AGMI tienen procedencia tanto endógena como exógena. Son sintetizados principalmente por el tejido adiposo a partir de ácido esteárico (C18:0) y ácido palmítico (C16:0), formando ácido oleico (C18:1n9) y ácido palmitoleico (C16:1n7).

La evaluación de los AGMI n9 sugiere un efecto similar al de los n3. Sin embargo, en los estudios que se han realizado no queda claro si el efecto de los n9 se debe a la disminución de los AGPI n6 o al efecto positivo de los AGMI n9.¹⁵⁰ En modelos experimentales modulan la respuesta inmune provocando un descenso de la mortalidad en modelos de endotoxemia o disminuyen el rechazo de trasplante.^{151,152} En estudios con humanos no se observan los mismos resultados posiblemente debido a la diferencias de dosis, en humanos la ingestión de AGMI n9 nunca alcanzan los niveles de las dietas experimentales. No obstante, una elevada ingesta de AGMI n9 provoca una cierta tendencia a la disminución de la proliferación de linfocitos y de la actividad de células NK y un descenso en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos.¹⁵³

4.4.4. Ácidos grasos poliinsaturados

Por su parte los AGCL han sido durante mucho tiempo la fuente lipídica principal de las dietas parenterales, proveían una fuente calórica segura de AG esenciales necesarios para el mantenimiento de la función inmune. En la actualidad estas dietas están configuradas por distintos AG, AGCL cuyo principal componente es n6, y por otros AG como los n3 cuyos efectos positivos se han estudiado ampliamente.¹⁵⁴

Dos de los AGPI, α -linolénico (n3) y linoleico (n6), son esenciales ya que el organismo no puede sintetizarlos. Los AGPI tienen importantes funciones biológicas, constituyen membranas, participan en síntesis de leucotrienos, prostaglandinas, etc. El déficit de AGPI compromete la integridad celular y provoca alteraciones como retraso en el crecimiento, dermatitis, hipopigmentación, etc. Su déficit puede ser secundario a la desnutrición energético-proteínica asociada a la EII. Mediante un modelo animal que desarrolla desnutrición energético-proteica, se ha determinado que la disminución de los niveles enzimáticos antioxidantes, implicados en la neutralización de productos oxidantes que provocan daño tisular, puede ser revertida con la administración de una dieta rica en AG n3 y n6.¹⁵⁵

Se han realizado estudios clínicos con dietas enterales con distintas fuentes de AG grasos y distintas proporciones. Aunque todos los estudios no obtienen las mismas tasas de remisión ni los mismos resultados para EC y CU, en general se observa que el balance n3/n6 a favor de n3 provoca la disminución de citoquinas proinflamatorias así como de leucotrienos proinflamatorios, mientras que un balance dietético a favor de n6 supone riesgo de desarrollar EC.¹²⁶ Además la administración duodenal de n3 provoca una mejora clínica en los pacientes.¹⁵⁶ Estos resultados también se han observado en modelos animales de experimentación y en cultivos *in vitro*.¹⁵⁷ La administración de n3 en modelos animales de colitis, TNBS, reduce el daño tisular.¹⁵⁸

La mayoría de estudios realizados atribuyen a los AG de la familia n3 cualidades antiinflamatorias. Inhiben la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de NK, disminuyen la quimiotaxis y la fagocitosis.¹⁵⁹ Además, distintos estudios asocian a los AGPI n3 la función inhibitoria de la proliferación de linfocitos unida a la capacidad de inducir apoptosis.¹⁶⁰

Por su parte, a los AGPI de la familia n6 se les ha atribuido un papel inflamatorio por distintos motivos ya que su alto consumo está asociado al incremento en la incidencia de ciertas enfermedades autoinmunes. En el transcurso de determinadas enfermedades inflamatorias se detectan niveles elevados de n6 en plasma y la consecuente síntesis de mediadores con potentes propiedades vasoactivas, quimiotácticas e inflamatorias.¹⁶¹ Sin embargo, ciertos estudios parecen demostrar que bajas concentraciones de AGPI n6 incrementan determinadas funciones inmunológicas como la linfoproliferación o la respuesta de hipersensibilidad retardada mientras que altas concentraciones inhiben estas funciones.¹⁶² El conjunto de estos datos indica que no se puede atribuir, exclusivamente, una función inflamatoria a la familia de AGPI n6 sino que las concentraciones y los distintos componentes de esta familia n6 pueden desencadenar distintas funciones.

5. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Frente a la complejidad del estudio de los factores implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal los modelos experimentales suponen la posibilidad de recrear situaciones ambientales controladas, de testar el beneficio o detrimento de distintos elementos nutricionales, farmacológicos, etc. y poder estudiar los efectos sobre el órgano afectado. Por consiguiente los modelos experimentales suponen una importante herramienta para el estudio de estas enfermedades siempre siendo conscientes de la limitación implícita de éstos, se trata de modelos.

5. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Los modelos experimentales representan una aproximación para el estudio de la EII ya que recrean una organización completa y compleja como la del ser humano. Actualmente se dispone de una gran variedad de modelos de inflamación intestinal que han contribuido al conocimiento global de estas enfermedades. No obstante no hay que olvidar que ninguno es ideal reproduciendo, cada uno de ellos, algunas particularidades de la EII humana.

Los modelos existentes pueden clasificarse en inducidos por agentes exógenos y modelos endógenos que engloban animales que espontáneamente desarrollan colitis, ratones transgénicos, modelos de transferencia celular en ratones inmunodeficientes y ratones deficientes en un gen o KO.

5.1. Modelos de colitis experimental inducidos por agentes exógenos

Los agentes exógenos utilizados (haptenos y ácidos orgánicos) pueden administrarse de forma oral, mediante una inyección transmural, por vía subcutánea o intrarrectalmente. El proceso inflamatorio intestinal en los modelos inducidos evoluciona sin aparición de nuevos brotes, característicos de la EII.

El estudio de estos modelos se ha basado en el análisis de los mecanismos implicados en la inmunidad innata (APC, neutrófilos, moléculas del complemento y citotoxicidad), en la inflamación inespecífica (eicosanoides, mieloperoxidasa, citoquinas y radicales libres de oxígeno) y en mecanismos de reparación (fibrosis y factores de crecimiento). Estos modelos suelen ser altamente reproducibles e influenciados por la flora intestinal y por componentes dietéticos.¹⁶³

Los modelos de inducción más utilizados son la inducción por TNBS o por DSS ya que permiten estudiar tanto la inflamación aguda como procesos inflamatorios más crónicos.

En el caso del TNBS en función del animal, rata o ratón, y de la cepa, se generan colitis variables pero con lesión continua, restringida al colón distal, con importantes áreas de necrosis y de afectación transmural. La consecución de este modelo se debe a la administración de un enema de TNBS disuelto en una proporción variable de etanol/agua. El mecanismo patogénico de esta sustancia se basa en la capacidad del etanol en debilitar la barrera mucosa, lo que conlleva el contacto entre antígenos luminales cólicos y la lámina propia. Además, el TNBS puede modificar la estructura de proteínas de la superficie celular uniéndose covalentemente a residuos de lisina y tirosina. Esto provoca una inmunorreactivación por parte de macrófagos y linfocitos T semejante a una reacción de hipersensibilidad retardada por alérgeno. La colitis inducida por TNBS se asemeja a la EC debido al carácter transmural de las lesiones intestinales y por la aparición de granulomas en las zonas de lesión.¹⁶⁴

El DSS es un polímero sulfatado con capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos, que se administra a los animales de experimentación diluido en el agua de beber. La colitis inducida por DSS causa lesiones cólicas similares a la CU. Estas lesiones afectan a la mucosa y submucosa intestinal con presencia de ulceraciones, más evidentes en el colon izquierdo, y que progresan distalmente. Si la administración oral es cíclica los ratones llegan a desarrollar una colitis crónica que se puede prolongar varias semanas después del cese de la administración. El DSS enteral favorece el aumento de bacterias anaeróbicas Gram negativas, lo que junto con el potencial erosivo sobre la barrera intestinal y la inapropiada respuesta de los macrófagos propicia la aparición de las lesiones intestinales.¹⁶³

La flora intestinal tiene una gran influencia en el establecimiento de las lesiones intestinales en el modelo de DSS y en la cronificación de la inflamación intestinal en el caso del TNBS.¹⁶⁵ En general, los tratamientos con antibióticos, prebióticos y probióticos consiguen mitigar la capacidad lesiva del TNBS y DSS.¹⁶⁶ La administración dietética de sustancias antioxidantes como vitaminas o incluso AGPI n3 disminuyen la lesión colónica paralelamente con un descenso en la producción local de Leucotrieno B₄, óxido nítrico y de citoquinas

proinflamatorias.¹⁶⁷ Además, numerosos estudios han evaluado en los modelos inducidos de colitis diversas terapias farmacológicas en fases experimentales y preclínicas.¹⁶⁸

5.2. Modelos endógenos de colitis experimental.

Los modelos endógenos son portadores de distintas alteraciones genéticas que predisponen al animal a padecer un proceso inflamatorio intestinal espontáneo de manifestaciones fenotípicas diversas. Con el desarrollo de técnicas de manipulación genética ha habido un aumento exponencial en la aparición de estos modelos ya que las posibilidades son numerosas en cuanto a genes dianas candidatos o implicados en el desarrollo de EII.

5.2.1. Modelos espontáneos

El ejemplo clásico es el Tití de cabeza de algodón (*Sanguinus oedipus*) que desarrolla una colitis crónica, recurrente e influenciada por el estrés que padecen en cautividad. Como causas de esta patología se han señalado alteraciones del MHC y en genes relacionados con la producción de mucinas.¹⁶⁹

La cepa C3H/HeJ*Bir*, producto de cruzamientos selectivos de ratones C3H/HeJ, desarrolla un proceso inflamatorio espontáneo en el colon derecho, con ulceraciones perianales y en paralelo con la colonización bacteriana del intestino. Se han caracterizado algunos genes (cd14, gbp1, pla2g2a) candidatos a determinar la susceptibilidad a padecer colitis en los animales C3H/HeJ*Bir*.¹⁷⁰

Los ratones SAMP1/Yit presentan de forma espontánea una lesión íleo-cecal de características comunes a la EC. Esta línea de ratones son el resultado del cruce entre hermanos durante más de 20 generaciones de la cepa AKR/J. SAMP1/Yit desarrollan una inflamación intestinal discontinua transmural y con presencia de granulomas y que aparece en el 100% de los animales de 30 semanas de vida.¹⁶³

Los animales C3H/HeJ*Bir* ni los animales SAMP1/Yit GF desarrollan inflamación intestinal.¹⁷¹

5.2.2. Modelos transgénicos

Las ratas transgénicas que sobreexpresan HLA-B27/ β 2m muestran un proceso inflamatorio sistémico de colitis y artritis, principalmente. Además, este modelo es susceptible a los cambios en la ecología bacteriana del intestino y demuestra la implicación del sistema de presentación antigénica en el desarrollo de colitis.⁸⁸

Más recientemente se ha creado un ratón que sobreexpresa IL7, la cual provoca una colitis aguda que evoluciona hacia la cronicidad entre las semanas 4 y 12 de edad en el 65% de los animales.⁸⁸ Se ha demostrado la participación de las células epiteliales intestinales productoras de IL7 en la aparición de la colitis en este modelo.

El ratón transgénico STAT4 intenta recrear la activación de este factor de transcripción que de forma fisiológica se da por acción de la IL12 y que polariza el proceso inflamatorio hacia el tipo Th₁ provocando una grave inflamación ileo colónica en el animal. El STAT4 se sobreexpresa en las células T CD4⁺ del infiltrado inflamatorio intestinal de estos ratones.¹⁶³

El ratón transgénico de la forma mutada del receptor II del TGF β desarrolla una colitis espontánea sólo si los animales son mantenidos en condiciones convencionales de estabulación debido al bloqueo de la vía de señalización del TGF β .¹⁶⁹

5.2.3. Colitis inducida mediante transferencia de linfocitos.

Existen una serie de animales que carecen de células inmunocompetentes como los ratones inmunodeficientes SCID y deficientes para Rag2 (Rag2(-/-)), portadores de mutaciones que conllevan la ausencia de células T y B maduras.¹⁶⁹ Estos modelos, completos y complejos, admiten la xeno o alotransferencia de diversas poblaciones linfocitarias que provocan o regulan la inflamación intestinal. La colitis inducida en ratones SCID al reconstituirlos con células T CD4⁺RB^{high} no se produce si se coadministran con células T CD4RB^{low} o CD8⁺ o si se inoculan células productoras de IL10 y TGF β . Además si se les trata

con anti-TNF o anti-IFN a los animales inmunodeprimidos a los que se les ha transferidos CD4RB^{high} se da una reducción en la colitis. Los linfocitos de la lámina propia CD4TCR $\alpha\beta$ ⁺ se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad inflamatoria en ratones KO para IL10 y en humanos por inducir un proceso inflamatorio intestinal de tipo Th₁ en ratones Rag2(-/-) y SCID.¹⁶² En cualquier caso, en estos animales atímicos es imprescindible la presencia de la flora intestinal para activar el proceso inflamatorio.¹⁶⁹

5.2.4. Modelos "Knock out"

Delecciones en genes clave del sistema inmune provocan la aparición de diversas formas de enterocolitis espontáneas. Este es el caso de los ratones KO portadores de mutaciones homocigotas en genes que codifican para receptores de células T (TCR α , TCR β , TCR $\beta\delta$) y MHCII. Estos ratones desarrollan una inflamación cólica hacia el tercer o cuarto mes de vida con ausencia de ulceraciones y frecuentemente prolapsos anorectales y diarrea no sanguinolenta. El mecanismo patogénico sugerido podría estar basado en el descenso en la tolerancia a antígenos dietéticos o microbianos debido a la incapacidad de las células CD4TCR α (-/-) o CD4TCR β (-/-) de suprimir la actividad de las células B productoras de inmunoglobulinas que, eventualmente, producirían un ataque de características autoinmunes contra el propio epitelio colónico.¹⁶³

De forma similar, los ratones KO de G α_{i2} desarrollan una pancolitis entre las semanas 8 y 12 de vida. Las lesiones intestinales son más graves en el colon distal y en las etapas más avanzadas pueden aparecer perforaciones y adenocarcinomas intestinales. La familia de proteínas G es esencial en la transmisión citoplasmática de señales extracelulares que regulan la maduración de células T y la producción de TNF. En el colon de ratones KO para G α_{i2} se ha observado un aumento de células CD4⁺ y una elevada producción de IgG e IgM.¹⁶⁹

Se han generado varios modelos de ratones con mutaciones en genes de citoquinas para conocer sus funciones biológicas *in vivo*. Entre estos modelos

de ratones KO destacan los deficientes para la IL2 y para la IL10 por desarrollar una enterocolitis espontánea altamente reproducible e influenciada por el ambiente. Asimismo, ratones portadores de mutaciones que afectan a moléculas de la vía de señalización de la IL10 (STAT3 y CRF2-4) o a la producción de TGFβ₁ o TNFα también cursan con inflamación intestinal. En los primeros, existe un cierto grado de similitud fenotípica con la enterocolitis de los ratones deficientes para IL10, mientras que las mutaciones en TGFβ₁ o TNFα acaban produciendo un proceso inflamatorio multiorgánico.¹⁶⁹

Los ratones IL2 (-/-) sufren un progresivo proceso inflamatorio intestinal con una elevada mortalidad entre los dos y los tres meses de vida. La colitis se desarrolla con diarrea crónica, intermitentemente sanguinolenta, y con prolapso rectal. Las lesiones se distribuyen de forma continua principalmente en el colon distal, afectando a la mucosa y submucosa. Histológicamente, presentan importantes áreas de ulceración, depleción de células mucilaginosas, hiperplasia y abscesos en las criptas intestinales. La etiología de la inflamación intestinal en ratones IL2 (-/-) es similar a la de los ratones con mutaciones en TCR. En los ratones IL2 (-/-) la estimulación antigénica por parte de la flora intestinal no patógena es esencial para la aparición de colitis. Los animales deficientes para la IL2 muestran similitudes patológicas con la CU ya que presentan una respuesta inflamatoria de tipo Th₂. En ambas patologías, la mucosa colónica contiene un elevado número de células T y B activadas y un patrón similar de citoquinas.¹⁶⁹

Recientemente se han generado dos modelos de colitis espontánea en ratones KO en los que la alteración genética no involucra a genes relacionados con el sistema inmune. Se trata de los modelos de ratón *mdr1a* (-/-) y *K8* (-/-).¹⁶² En el primero, la delección bialélica del gen *MDR1* inactiva el sistema de detoxificación natural de las células epiteliales intestinales provocando el acumulo de componentes alimentarios y bacterianos en el epitelio intestinal que acaba provocando la pérdida de solidez de la barrera intestinal. La inflamación puede llegar a extenderse desde el ciego hasta el recto afectando al 100% de los animales entre la semana 6 y 11 de vida. Algo similar ocurre en el ratón *K8* (-/-), las cepas viables son extremadamente susceptibles a la atrofia

epitelial al no expresar queratina 8. En este caso, la lesión colónica se puede evidenciar hacia las dos semanas de vida de los animales y adquirir signos de cronicidad a partir de la cuarta semana de vida. El perfil de citoquinas y la histología de las lesiones aproxima al KO *mdr1a* a la EC y el ratón K8 (-/-) a la CU. En ambos modelos la flora bacteriana tiene un papel fundamental en el proceso inflamatorio.

En ratones IL10 (-/-) aparece una inflamación intestinal hacia las 12 semanas de vida, siendo de mayor gravedad en condiciones convencionales, leve en condiciones "Specific Pathogen Free" (SPF) e inexistente en condiciones GF.¹⁷² Esta patología es especialmente intensa si los animales están en contacto con potenciales enteropatógenos.¹⁷³ Además del ambiente, el "background" genético de la cepa también determina el desarrollo de una colitis más o menos grave.¹⁷² Las cepas más sensibles de ratones deficientes para IL10 pueden desarrollar una pancolitis acompañada de anemia y una significativa pérdida de peso corporal. Histológicamente destaca la presencia de lesiones transmurales y la pérdida de la función barrera intestinal. Los ratones KO para IL10 son incapaces de atenuar la respuesta Th₁, con niveles cólicos elevados de IL1, IL6, INF γ , TNF α e IL12, que la relaciona con la EC. Se ha sugerido que macrófagos y linfocitos T CD4⁺ activados por diferentes componentes luminales son los principales causantes de la colitis en los ratones deficientes para IL10. Además, el 60 % de los ratones adultos IL10 (-/-) mantenidos en condiciones convencionales desarrollan tumores cólicos. Por otra parte, diferentes aproximaciones terapéuticas se están llevando a cabo en este modelo de colitis experimental espontánea. Tanto el bloqueo de la IL12 como la administración de *Lactobacillus sp.* se han mostrado eficaces en el tratamiento de la colitis en los ratones IL10 (-/-). Contrariamente, los antiinflamatorios no esteroideos contribuyen a exacerbar la inflamación intestinal en estos ratones deficientes para IL10.¹⁶⁹

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

7.1. Justificación estudio 1: Evaluación de los cambios inmunológicos a nivel intestinal en ratones IL10(-/-) mantenidos en dos condiciones ambientales distintas.

El epitelio cólico constituye la primera línea de interacción y defensa del colon frente al medio exterior. Formado por una capa unicelular constituye una barrera selectiva para potenciales patógenos. En este compartimento cólico coexisten distintos tipos celulares con funciones específicas e interrelacionadas. Este es el caso de los IEL que ejercen una función de vigilancia y de promoción del crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales.⁴⁶ Por lo tanto, esta primera línea defensiva es crucial en el mantenimiento de la homeostasis y en la transmisión de las señales desde el lumen hacia la lámina propia. En este proceso las células epiteliales son claves por la presencia de mecanismos de reconocimiento de la flora intestinal como los TLR.³⁶

En el contexto intestinal los TLR juegan un papel fundamental en la adquisición de la tolerancia y en la maduración de la respuesta inflamatoria.^{174,51} Dentro del conjunto de TLR, el TLR9 reconoce CpG bacteriano y el TLR2 péptidos procedentes de bacterias Gram positivas mayoritariamente. Una vez activados, ambos TLR transmiten señales citoplasmáticas mediante la molécula adaptadora MyD88 desencadenando la activación final del NFκB.³⁶ Tanto el TLR2 como la molécula adaptadora MyD88 están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal como se ha demostrado en diferentes modelos experimentales con ratones deficientes para TLR2 o MyD88 que muestran lesiones más graves al ser tratados con DSS.⁴⁷ Además, se ha comprobado el efecto beneficioso de la activación de TLR mediante agonistas que desencadenan efectos antiinflamatorios y de reforzamiento de las TJ en el epitelio intestinal, mientras que a nivel de lámina propia refuerzan la respuesta inmune proinflamatoria.⁴⁰

La apoptosis constituye un mecanismo clave en la regulación de la inflamación por el control que ejerce sobre las células inflamatorias evitando la acumulación de células activas que podría llegar a lesionar el tejido intestinal.^{175, 176} No obstante, una excesiva apoptosis puede constituir la rotura del epitelio intestinal alterando la función barrera y permitiendo la entrada de antígenos

diversos. Fang Y y cols. han demostrado como el perfil de citoquinas que acompaña al proceso inflamatorio regula la apoptosis, especialmente la IL10 que fue capaz de facilitar la resolución de un proceso inflamatorio aumentando la apoptosis de células inflamatorias y disminuyéndola en las células epiteliales en un modelo experimental de tiroiditis granulomatosa autoinmune.¹⁷⁶ Además, alteraciones en la apoptosis se han asociado a un descontrol de la inflamación en pacientes con EII activa.¹⁷⁷

Un ambiente SPF permite una situación estable sobre la flora intestinal autóctona que permite el estudio del colon en una situación basal con una baja activación del sistema inmune.¹⁷⁸ El paso de un ambiente SPF a uno convencional recrearía una alteración similar a lo que sugiere la "hipótesis de la higiene". Un sistema inmune sometido a una estimulación débil por un espectro antigénico con escasa variabilidad induce una tolerancia limitada.¹⁷⁸ Al enfrentarse a un ambiente con mayor variabilidad antigénica desarrolla un proceso inflamatorio frente a antígenos no patológicos lo que en individuos con predisposición genética puede provocar lesiones intestinales tal y como sucede en la EII. En este sentido, el modelo de ratones deficientes para IL10 constituye un modelo genético altamente sensible a los cambios ambientales.¹⁷⁹ Mientras en condiciones GF no muestra inflamación, en SPF muestra una inflamación leve que se agrava en condiciones convencionales.^{172, 179.}

Objetivos:

1. Describir los cambios inmunológicos que aparecen en ratones IL10 (-/-) trasladados de un ambiente SPF a ambiente convencional:
 - 1.1. Evaluar la actividad de células inmunológicas a nivel del compartimiento intraepitelial y de lámina propia.
 - 1.2. Caracterizar la expresión de TLR en la mucosa intestinal de estos ratones.

7.2. Justificación estudio 2: Efecto de la substitución del 50% de la fracción de grasa de la dieta con MCT sobre el desarrollo de colitis en el modelo IL10 (-/-).

En las últimas dos décadas, la nutrición enteral se ha utilizado como tratamiento primario en la EC activa. A pesar de que estudios recientes demuestran que la nutrición enteral no es mejor que el tratamiento convencional con esteroides, la tasa de remisión es elevada, alrededor del 60%, siendo tratamiento de elección en algunos subgrupos de pacientes.¹⁹

Los elementos concretos implicados en esta acción inmunomoduladora de las dietas enterales no se conocen, pero parece ser que la cantidad y tipo de grasa son factores determinantes.¹⁸⁰ Dietas con un bajo contenido en grasas parecen ser especialmente útiles, mientras que grandes cantidades de ácidos grasos no se han asociado en general a respuesta antiinflamatorias pobres.¹⁸¹ Además, los cambios alimenticios que se han dado en los últimos años hacia un mayor consumo de ácidos grasos se han asociado al aumento del riesgo de padecer EC en países donde se tenían índices de incidencia bajos o inexistentes.^{182,183} Por otro lado, los MCT tradicionalmente considerados como una fuente de energía, han demostrado tener propiedad inmunomoduladoras en estudios recientes.^{184, 146} Algunos estudios clínicos en EC sugieren que la substitución de parte de los ácidos grasos con MCT puede ayudar a la remisión.^{185, 186} Además, estudios anteriores en nuestro laboratorio mostraron que la alimentación mediante MCT de ratas colíticas por TNBS disminuía la producción de eicosanoides proinflamatorios.¹³³

Objetivos:

1. Evaluar el efecto de la substitución parcial de la fracción de grasa de la dieta con MCT sobre la incidencia y gravedad de la colitis en un modelo experimental de colitis, IL10 (-/-) en condiciones "Specific pathogen free" (SPF).
2. Estudiar los posibles cambios celulares y moleculares relacionados con el efecto de la dieta en este modelo experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

7. Material y métodos

7.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos “wild type” (WT) de la cepa C57BL/6J y deficientes para IL10 suministrados por Charles River (Santa Perpetua de la Mogoda, Barcelona, España). Todos los animales llegaron al estabulario del Instituto de Investigación en Ciencias de Salud “Germans Trias i Pujol” con 4 semanas de vida y se mantuvieron durante 8 semanas en distintas condiciones ambientales, condiciones convencionales o en SPF mediante el uso de un aislador (Harlam Ibérica, Sant Feliu de Codines, Barcelona, España). Las condiciones ambientales fueron constantes, temperatura se mantuvo a 23°C, la humedad relativa del 50% y los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12 horas. Los animales tuvieron libre acceso a la comida y al agua.

Se hizo un seguimiento semanal del peso así como un control diario del estado de los animales con la ayuda de un baremo de supervisión para evaluar la aparición y evolución de la enfermedad durante todo el estudio.

Tabla 7. Baremo de supervisión

| Estado del animal | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Ojos | 0. Estado normal |
| | 1. Presenta secreciones |
| Pelaje | 0. Estado normal |
| | 1. Piloerección |
| Heces | 0. Color y consistencia normal |
| | 1. Color y consistencia alterada |
| | 2. Presencia de sangre |
| Movilidad | 0. Normal |
| | 1. Disminuida |
| | 2. Inmovilidad |
| Arqueamiento y “Twitching” | 0. Ausencia |
| | 1. Presencia |
| “Barbering” | 0. Ausencia |
| | 1. Presencia |

Se siguió la norma reguladora de la Unión Europea para modelos de experimentación animal (Directiva 86/609/EC) y los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de experimentación animal del “Institut d’Investigació Germans Trias i Pujol”

7.2. Dietas

Se utilizaron 2 dietas isocalóricas y normolipídicas con idéntico porcentaje de todos los componentes (20% proteína, 60% carbohidratos, 4% fibra, 6% minerales y vitaminas y 10% de grasa). La única diferencia radicaba en la fuente de grasa: para la dieta n6 fue el aceite de girasol y para la dieta n6/MCT 50% aceite de girasol y 50% aceite de coco.

Tabla 8. Componentes de la dieta y porcentaje de ácidos grasos

| % del peso | n6/MCT | n6 |
|------------------------------|--|--------------------------------|
| Proteínas | 20 | 20 |
| Carbohidratos | 60 | 60 |
| Fibra | 4 | 4 |
| Vitaminas y minerales | 6 | 6 |
| Grasa | 10 (50% aceite de girasol/ 50% aceite de coco) | 10 (100% aceite de girasol) |
| AG (%) | | |
| C8:0 | - | - |
| C10:0 | 0,5 | - |
| C12:0 | 28,1 | - |
| 14:0 | 15,3 | - |
| 16:0 | 14,0 | 19,8 |
| 16:1n7 | 0,1 | 0,2 |
| 18:0 | 3,8 | 2,8 |
| 18:1n9 | 12,7 | 24,1 |
| 18:2n6 | 22,6 | 46,7 |
| 18:3n6 | 0,7 | 0,9 |
| 18:3n3 | 1,3 | 1,6 |
| C20:3n9 | 0,6 | - |
| C20:3n6 | 0,3 | 0,8 |
| 20:4n6 | - | - |
| 20:5n3 | - | - |
| 24:0 | 0,1 | - |
| AGS total | 62 | 22,6 |
| AGMI total | 12,8 | 24,3 |
| AGPI total | 24,9 | 50 |

7.3. Reactivos y kits

El percoll, Hepes, EDTA, DTT, hialuronidasa, colagenasa, deoxirribonucleasa y etanol fueron suministrados por Sigma-Aldrich (JL, USA). FBS, antibióticos, RPMI, HBSS sin Ca²⁺/Mg²⁺ de Invitrogen (CA, USA). Los anticuerpos para citometría de flujo, el kit de apoptosis Anexina V-PE y el buffer de lisis "FACSlysing solutions X10" se adquirieron de BD Pharmigen (NJ, USA). Para los análisis complementarios de apoptosis en muestras incluidas en parafina se utilizó ApopTag® "Peroxidasa In Situ OligoLigation Apoptosis Detection Kit" (Chemicon International, US). Para la detección de IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10,

IL12, IFN γ y TNF α en supernadante de explantes se utilizó el Kit "SearchLightTM Mouse inflammatory cytokine Array 1" (Pierce, IL, USA). Los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica se obtuvieron de Dako (CA, USA) para anti-CD3, de Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA) para anti-TLR2 y de ProSci (CA, USA) para anti-MyD88. Los reactivos utilizados para la cuantificación mediante PCR en tiempo real se obtuvieron de: Termi-DNA-tor (Biotools, España), Kit extracción RNA (QIAgen, Alemania), kit retrotranscripción (Promega, Alemania), marcador intensidad t \times 174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen, USA), el kit para la Real time "Fast Start Taq DNA polimerasa SYBR green", los primers, nucleótidos, la Taq DNA polimerasa y los capilares se adquirieron de Roche (Suiza). Los reactivos utilizados para la cromatografía de gases se adquirieron en Sigma-Aldrich (JL, USA) y las columnas SGE en CromLab (Barcelona, España).

7.4. Diseño experimental

7.4.1. Estudio 1: Evaluación de los cambios inmunológicos a nivel intestinal en ratones IL10(-/-) mantenidos en dos condiciones ambientales distintas.

En este estudio 24 KO y 12 WT se dividieron en 2 grupos. El primer grupo se mantuvo las 8 semanas que duró el estudio en condiciones SPF. El otro grupo se mantuvo en condiciones SPF durante 4 semanas, hasta alcanzar las 8 semanas de vida, y a continuación se trasladó a condiciones convencionales. Durante el periodo de estabulación en condiciones SPF el agua fue autoclavada y la comida irradiada, mientras que en la estabulación convencional no se autoclavó el agua y la comida dejó de ser estéril. (Figura 18).

7.4.2. Estudio 2: Efecto de la substitución del 50% de la fracción de grasa de la dieta con MCT sobre el desarrollo de colitis en el modelo IL10 (-/-).

Para este estudio se mantuvieron los animales, 24 KO y 12 WT, en condiciones SPF durante 8 semanas. Se dividieron en 2 grupos a los que se les administró cada una de las dietas experimentales, n6 o n6/MCT, desde el momento de su llegada hasta las 12 semanas de vida. El agua y el resto de material que se introdujo en el aislador fueron autoclavados y la comida irradiada. (Figura 18)

Material y métodos

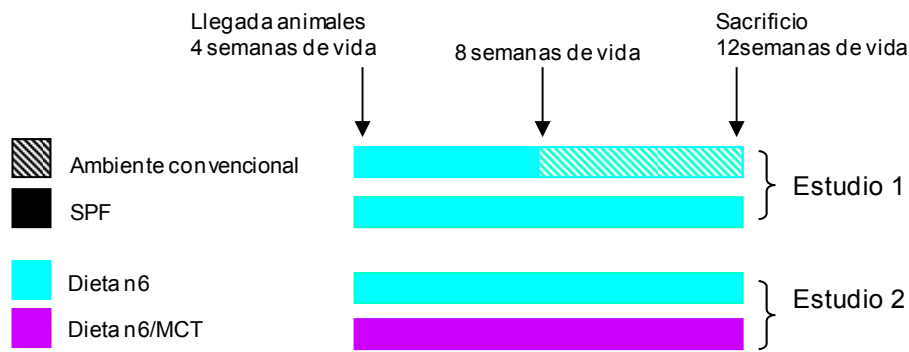


Figura 18. Diseño experimental

7.5. Sacrificio y recogida de muestras

En el momento del sacrificio se pesaron los animales. A continuación se sometieron a una sobredosis de ketamina (Fluotane®) inhalada que nos permitió realizar una punción cardíaca para la obtención de sangre. Con estas muestras se realizaron hemogramas de rutina mediante "Coulter MaxM Analyzer with autoloader" (Izasa, España) para determinar la presencia de anemia. También se utilizó la sangre de algunos animales para determinar el perfil de ácidos grasos en las membranas eritrocitarias mediante cromatografía de gases (CG).

Una vez extraída la muestra sanguínea se realizó una laparotomía media para la extracción del colon y los ganglios mesentéricos. Estos últimos se emplearon como controles positivos en distintas determinaciones de la apoptosis e inmunohistoquímicas.

El colon se lavó mediante infusión con la ayuda de una jeringa con 20 ml de solución A a 4°C (Tabla 9). Después de este primer lavado cada colon fue llenado con la solución B (Tabla 9) y, a continuación, se alojaron en un baño con hielo durante 10 minutos. Se extrajeron las placas de Peyer así como el tejido mesentérico que hubiera podido quedar, se abrieron longitudinalmente, se midieron y se pesaron los intestinos.

Tabla 9. Composición soluciones A, B y C estériles y pH 7.2

| Composición solución A (1L) | Composición solución B (1L) | Composición solución C |
|--|--|---|
| 100 ml HEPES 100mM 100 ml HBSS 10X sin Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 20 ml FBS Penicilina 100U/ml Estreptomina 0,1mg/ml | 90 ml 10XHBSS sin Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 100 ml FBS 15 ml HEPES 1M 0,37 mg/ml EDTA 0,15 mg/ml DTT Penicilina 100U/ml Estreptomina 0,1mg/ml | 1 µg/ml colagenasa V 400 1 µg/ml Deoxiribonucleasa 1 µg/ml Hyaluronidasa Penicilina 100U/ml Estreptomina 0.1mg/ml En RPMI 1640 |

El colon abierto longitudinalmente se dividió en 3 secciones longitudinales. La primera sección se fijó con formol al 4% para la evaluación microscópica de la lesión y para inmunohistoquímica. El segundo corte se dividió en 6 fragmentos; cuatro de ellos se congelaron en nitrógeno líquido para los estudios de expresión génica (2 secciones) y para la determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía (2 secciones), las 2 secciones restantes se cultivaron durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂ en una microplaca estéril para la posterior determinación de las citoquinas en el sobrenadante. La tercera sección longitudinal se destino a la extracción de IEL y LPL.

7.6. Determinación de parámetros en muestras biológicas

A continuación se detalla el procesamiento de las muestras para la evaluación de los distintos parámetros que estudiamos. (Tabla 10).

7.6.1. Análisis histológico

A partir de la sección longitudinal fijada en formol al 4% y posteriormente incluida en parafina, se realizaron cortes de 5µm que fueron teñidos con H&E para la valoración de la lesión mediante un baremo que representa la suma numérica de 6 criterios (Tabla 11 y 12). Esta valoración la realizó un patólogo (I.O) desconocedor de los tratamientos dietéticos, del "background" genético de los animales y de las condiciones de estabulación. Este baremo es una modificación del previamente empleado y descrito por Madsen KL. y cols.^{187,188}

Tabla 10. Recogida de las muestras biológicas

| Muestra | | Tratamiento | Determinación | Técnica | Estudio | |
|---------|-----------------------------|---|--|---|--------------------------------|-------|
| Sangre | | Heparina | Hemograma | "Coulter MaxM Analyzer with autoloader" | 1 y 2 | |
| | | | Perfil ácidos grasos membranas eritrocitos | Cromatografía gases | 2 | |
| Colon | Sección 1 | Fijación en formol 4% e inclusión en parafina | Evaluación microscópica | Baremo de lesión | 1 y 2 | |
| | | | TLR2 y MyD88 | Inmunohistoquímica | 1 | |
| | | | CD3+ | Inmunohistoquímica | 2 | |
| | Sección 2 (6 fragmentos) | Congelación nitrógeno líquido | Cuantificación TLR | PCR en tiempo real | 1 y 2 | |
| | | | Cultivo 48 horas | Cuantificación producción citoquinas | Array ELISA-quimioluminiscente | 1 y 2 |
| | | | Congelación -80°C | Perfil ácidos grasos | Cromatografía gases | 2 |
| | Sección 3 | Agitación en medio de cultivo + DTT | Estudio apoptótico y poblacional de IEL | Citometría de flujo | 1 y 2 | |
| | | | Incubación "overnight" | Estudio apoptótico y poblacional de LPL | Citometría de flujo | 1 y 2 |

7.6.2. Relación peso/longitud

La relación peso/longitud del colon es un buen indicador del proceso inflamatorio que lo acorta y, a la vez, lo engrosa con motivo de los procesos de infiltración celular y mecanismos de reparación que acontecen en el proceso inflamatorio. Consecuentemente, cuanto más inflamación haya mayor será el peso del colon y menor su longitud, con lo cual la relación peso/longitud cólica aumentará sustancialmente.

7.6.3. Incidencia de colitis

Se consideraron animales colíticos aquellos que cumplieron como mínimo 2 de los 3 criterios siguientes:

- Pérdida de peso superior o igual al 5% del peso inicial
- Baremo de lesión histológica superior o igual a 3
- Anemia (Hemoglobina inferior o igual a 12g/l)

Tabla 11. Baremo de lesión intestinal.

| Baremo histológico de lesión intestinal | |
|--|---|
| Enterocitos | |
| Normal | 0 |
| Pérdida de algunas células | 1 |
| Pérdida de grupos celulares | 2 |
| Ulceración franca | 3 |
| Criptas | |
| Normal | 0 |
| Con algunas células inflamatorias | 1 |
| Criptitis | 2 |
| Abscesos cripticos | 3 |
| Arquitectura glandular | |
| Arquitectura conservada | 0 |
| Alteración media | 1 |
| Profundamente modificada | 2 |
| Lámina propia | 3 |
| Células mononucleares | |
| Normal | 0 |
| Ligero incremento | 1 |
| Incremento moderado | 2 |
| Incremento muy marcado | 3 |
| Neutrófilos | |
| Normal | 0 |
| Ligero incremento | 1 |
| Incremento medio | 2 |
| Incremento muy marcado | 3 |
| Granuloma | |
| Presencia | 0 |
| No presencia | 1 |

Tabla 12. Baremo de ulceración

| Baremo del grado de ulceración | |
|---------------------------------------|---|
| Número de úlceras | |
| Profundidad | |
| Sin úlceras | 0 |
| Submucosa | 1 |
| Muscularis mucosae | 2 |
| Serosa | 3 |

7.6.4. Cuantificación de la producción de citoquinas en sobrenadante de cultivo de explantes.

Dos secciones intestinales se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas en RPMI 1640 con antibióticos. Una vez transcurridas las 48 horas se recuperaron los sobrenadantes y se congelan a -80°C para analizar todas las muestras de manera simultánea.

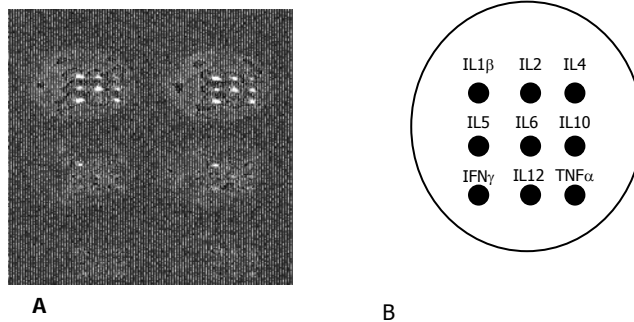


Figura 19. A. Sección de la placa para la valoración de la producción de citoquinas. Pueden verse los pocillos, algunos vacíos y en otros se pueden distinguir hasta 8 puntos positivos para las 9 citoquinas valoradas. B. Esquema de la localización de cada citoquina en un pocillo.

Material y métodos

Se determinaron los niveles de nueve citoquinas mediante "SearchLight Mouse inflammatory cytokine Array". Esta técnica detecta la quimioluminiscencia generada por el sustrato de la peroxidasa en un inmunoensayo tipo ELISA-sándwich en formato de placa de 96 pocillos. En cada pocillo de las placas están adheridos anticuerpos específicos para cada una de las citoquinas a evaluar. (Figura19).

Se construyó una recta patrón y se incubaron las muestras en agitación constante de 200 rpm durante 1 hora en un agitador orbital. Después de realizar 3 lavados para eliminar proteínas que no se hubieran unido, se incubaron las muestras con anticuerpos unidos a biotina durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación de 200 rpm. Estos anticuerpos secundarios se unirán a un segundo epítipo de la proteína unida al anticuerpo fijado en la placa. Con tres lavados posteriores se eliminaron los anticuerpos secundarios no unidos y, a continuación, se añadió el complejo peroxidasa-estreptavidina (SA-HRP). Después de incubar las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante de 200 rpm, realizamos 3 lavados adicionales y añadimos el sustrato. HRP es un enzima que reacciona con un sustrato quimioluminiscente produciendo una señal luminescente que se detecta a los 10 minutos por una cámara de captación de luminiscencia CCD. La cantidad de señal producida fue proporcional a la cantidad de cada citoquina y nos permitió evaluar las muestras problema al comparar la señal con la curva patrón. (Tabla 13).

Tabla 13. Concentraciones de la citoquinas en los estándares

| pg/ml | Estándar 1 | Estándar 2 | Estándar 3 | Estándar 4 | Estándar 5 |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| IL1β | 3200 | 800 | 200 | 50 | 12.5 |
| IL2 | 800 | 200 | 50 | 12.5 | 3.1 |
| IL4 | 800 | 200 | 50 | 12.5 | 3.1 |
| IL5 | 1600 | 400 | 100 | 25 | 6.3 |
| IL6 | 5600 | 1400 | 350 | 87.5 | 21.9 |
| IL10 | 800 | 200 | 50 | 12.5 | 3.1 |
| IL12 | 800 | 200 | 50 | 12.5 | 3.1 |
| IFNγ | 8000 | 2000 | 500 | 125 | 31.3 |
| TNFα | 3200 | 800 | 50 | 12.5 | 3.1 |

7.6.5. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de llama (GC/FID) y cromatografía de gases con detector de masas cuadrupolar (GC-MS).

La cromatografía de gases engloba una serie de técnicas que separan los distintos componentes de una muestra según sus características físico-químicas para posteriormente ser detectadas. La muestra es transportada por la fase móvil (gas portador inerte, helio, nitrógeno, etc.) con la que no interaccionan, a través de una columna (longitud y diámetro específico) que contiene la fase estacionaria. La interacción con la fase estacionaria permite separar los componentes de la muestra. La elección del gas portador depende del detector, el nitrógeno, helio y hidrógeno suele utilizarse con los detectores de ionización de llama (FID). En la cromatografía de gases las moléculas a detectar debe presentar un bajo punto de ebullición y ser termoestables.

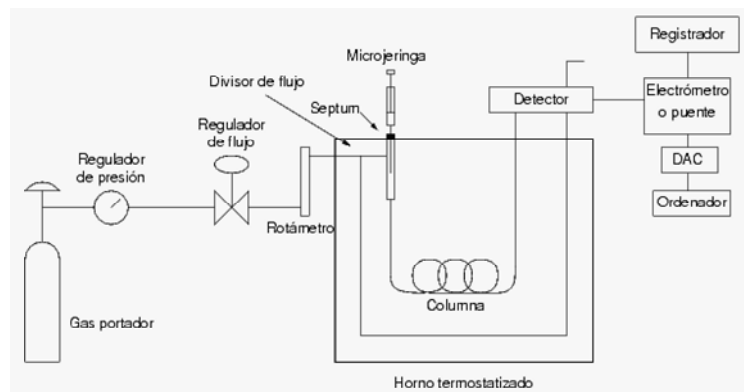


Figura 20. Esquema del cromatógrafo de gases

Un cromatógrafo de gases consta del gas portador, reguladores de presión y flujo, sistema de inyección de muestra, columna que contiene la fase estacionaria y que se encuentra dentro del horno con termostato, el detector (que convierte las moléculas detectadas en señal analógica) y procesador de la señal (PC). (Figura 20).

Material y métodos

La espectrometría de masas es una técnica que permite detectar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). El espectrómetro de masas es un instrumento analítico que puede actuar sólo como analizador o en combinación con sistemas cromatográficos o electroforéticos a modo de detector analizador, que es el caso de nuestro estudio.

En nuestro estudio se hicieron dos valoraciones:

- Determinación de los AG en la mucosa intestinal mediante la técnica híbrida cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-EM).
- Determinación de la composición lipídica de la membrana de eritrocitos de ratón mediante cromatografía de gases (GC) y detector FID.

A. Procesamiento de la muestra para obtener los lisados eritrocitarios

A partir de la sangre obtenida como se ha explicado en el apartado 7.5 separamos el plasma del suero centrifugando durante 10 minutos a 3000xg. Del pellet obtenido recuperamos 150 μ l y le añadimos 1ml de suero fisiológico, centrifugamos 10min a 2600xg a 4°C. Después de repetir este lavado le añadimos al pellet 1ml de buffer de lisis eritrocitario X1 de BD y lo dejamos incubar durante 5min a temperatura ambiente. Centrifugamos 20 min a 16000 xg a 4°C y volvemos a repetir el proceso de lisado y posterior centrifugado a 16000xg. Lavamos con 1ml de PBS para eliminar restos del buffer de lisis a 16000xg 5 min a 4°C. El pellet obtenido era muy denso por lo que se disolvió con 400 μ l de suero fisiológico y se homogeneizó previamente a la medición de la proteína total. Una vez las proteínas totales (Método Bradford) estaban cuantificadas agregamos una cantidad conocida de estándar interno en función del contenido proteico de cada muestra y mantuvimos esta relación para el resto de muestras. El contenido de los diferentes ácidos grasos en los lisados eritrocitarios se expresó en mg por g proteína.

B. Procedimiento precromatográfico para los lisados y mucosas

Tanto los lisados de eritrocitos como las mucosas cólicas fueron derivatizadas (metilación de los ácidos grasos) antes de inyectarse al cromatógrafo mediante el método descrito por Lepage y Roy.¹⁸⁹ Para ello empleamos entre 1,5-3,5 mg de mucosa o 150 μ l de lisado eritrocitario a los que añadimos una cantidad conocida del estándar interno C17:0. A continuación, se homogeneizaron con 2ml de metanol:benceno (4:1) agitando vigorosamente en el vórtex durante unos 30 segundos y seguidamente se colocaron las muestras en un baño de sonicación durante 1 o 2 min. El metanol:benceno nos permitió extraer los ácidos grasos al final del proceso.

Tras la homogeneización se añadieron 200 μ l de cloruro de acetilo (derivatizante) que metiló los ácidos grasos para convertirlos en derivados más volátiles (aumentando la sensibilidad de detección). Finalmente, para neutralizar el efecto del cloruro de acetilo se incubaron (1,5h) las muestras con un tampón de carbonato potásico al 6% (pH \approx 8-9) y agitamos 1 min para neutralizar el efecto ácido del derivatizante.

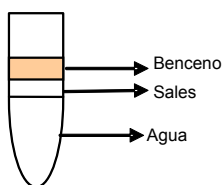


Figura 21. Esquema procedimiento precromatográfico. Obtenemos 3 fases, la fase del benceno contiene los ácidos grasos metilados. Esta fase se puede pinchar directamente para inyectar en el cromatógrafo; se puede evaporar con nitrógeno y reconstituir con 50-100 μ l de hexano o se puede congelar a -80°C .

A continuación, se realiza una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y a 4°C . De los sobrenadantes inyectamos una alícuota de 1-2 μ l en el cromatógrafo de gases Autosystem (Perkin Elmer). (Figura 21).

C. Proceso cromatográfico GC-FID para las membranas

Para la determinación del perfil de ácidos grasos (C12:0-24:0) de la membrana eritrocitaria usamos una columna capilar BPX 90 de naturaleza polar de 30m x 0,25mm ID x 0,25 μ M.

Material y métodos

Se construye una curva de calibración de tres niveles con unas cantidades conocidas de las sustancias que queremos analizar, concretamente metil ésteres de los ácidos grasos de cadena media y larga y una cantidad fija del correspondiente estándar interno para todos los niveles de calibración heptadecanóico (C17:0).

D. Proceso cromatográfico para análisis de las mucosas mediante (CG-EM)

Los metil ésteres obtenidos a partir de las mucosas cólicas se analizaron en un cromatógrafo de gases GC 8000 series Fisons equipado con una columna polar altamente específica BPX70. Esta columna cromatográfica se acopló a un EM cuadrupolar MD800 Thermo Finnigan.

Las muestras se inyectaron en modo "splitless" en la columna para CG en condiciones estándar hasta alcanzar la rampa de 20°C/min y con el Helio como fase móvil. La separación de los derivados de los ácidos grasos fueron finalmente analizados mediante la ionización química positiva con metano como gas reactivo en el MD800 Thermo Finnigan.

Tabla 14. Tiempos retención ácidos grasos

| Channel | m/q/AG/Retention time | Dwell time (sec) | Span | Inter channel delay (sec) | Retention window (min) | |
|---------|---|------------------|------|---------------------------|------------------------|----------|
| | | | | | Start time | End time |
| 1 | 159.11,(C _{8:0}),5.70; 173.14, (C _{9:0}),7.57; 187.16,(C _{10:0}),9.54; 215.22,(C _{12:0}),13.42; 243.24,(C _{14:0}),17.04 | 0,08 | 0,5 | 0,02 | 6,0 | 20,0 |
| 2 | 317.33(C _{20:5w3}),33.32;319.29(C _{20:4n6}),31.80; 321.32 (C _{20:3n6} , C _{20:3n9}),30.65,31.41 | 0,08 | 0,5 | 0,02 | 20,0 | 25,5 |
| 3 | 263.26(C _{18:2w6}),26.46; 293.25(C _{18:3w3} , C _{18:3w6}), 27.99,27.21; 297.30(C _{18:1n9}),25.32; 299.28(C _{18:0}),24.79 | 0,08 | 0,5 | 0,02 | 25,5 | 30,6 |
| 4 | 317.33(C _{20:5w3}),33.32;319.29(C _{20:4n6}),31.80; 321.32 (C _{20:3n6} , C _{20:3n9}),30.65,31.41 | 0,08 | 0,5 | 0,02 | 30,6 | 36,3 |
| 5 | 343.34(C _{22:6n3}),37.86;347.41(C _{22:4w6})36.01; 381.35(C _{24:1n9}),37.31;383.44(C _{24:0}),36.76 | 0,08 | 0,5 | 0,02 | 36,3 | 42 |

La ionización química por transferencia protónica produce casi exclusivamente el ión cuasimolecular $[M+H]^+$ para la mayoría de los metil ésteres.¹⁹⁰ Los tiempos de retención de cada uno de los ácidos grasos analizados junto con sus m/q y los parámetros de adquisición para cada canal figuran en la tabla 14.

Las curvas de calibración se construyeron en base a una solución del estándar en un rango de concentración de 80-200ng/ μ l para los ácidos grasos de cadena media y larga respectivamente.

7.6.6. Aislamiento de IEL

Los IEL se aislaron siguiendo los procedimientos descritos por S. Sugahara y cols.,¹⁹¹ con algunas modificaciones. La sección longitudinal destinada al aislamiento de IEL y LPL se dividió en fragmentos de 0.5 cm aproximadamente. Para obtener un número suficiente de células y poder ser valoradas por citometría de flujo, agrupamos las secciones cólicas de 2 animales del mismo grupo y mismo "background" genético. Se incubaron las secciones con 20 ml de la solución B (Tabla 9) durante 25 min en constante agitación a 4°C. Transcurrido este tiempo se recuperó la solución y volvimos a incubar las secciones de igual forma con 20 ml adicionales de solución B. A continuación se mezclaron las soluciones obtenidas de las 2 incubaciones (volumen final de 40 ml) en las cuales se encontraban los IEL que fueron purificados posteriormente mediante un gradiente de percoll 40/80%, obteniéndose las células de interés en la interfase de dicho gradiente.

Las secciones de tejido desepitelizado se utilizaron posteriormente para el aislamiento de los LPL.

7.6.7. Aislamiento de LPL

El aislamiento de los LPL se realizó a partir de las secciones de colon desepitelizadas empleadas para el aislamiento de IEL. Para ello empleamos el método descrito por Nancy Van Damme y cols.,¹⁹² con algunas modificaciones.

Concretamente, las secciones se incubaron "overnight" a 37°C y en continua agitación con la solución C (Tabla 9). Transcurrido el periodo de incubación, la

Material y métodos

muestra fue filtrada con un filtro de nylon de 40 μm de poro y después de varios lavados los LPL se purificaron mediante un gradiente de percoll 40/100% recuperando los linfocitos en la interfase.

El uso de enzimas nos fue imprescindible para el aislamiento de LPL de la mucosa inmersos en la lámina propia. Para alterar al mínimo la expresión de sus marcadores fenotípicos así como el porcentaje de apoptosis realizamos un proceso de validación previo en el que se valoraron distintas combinaciones enzimáticas, concentraciones y periodos de incubación en muestra sanguínea. Se escogió aquella combinación que no alteró la expresión fenotípica ni el porcentaje de apoptosis de los linfocitos. (Figura 22).

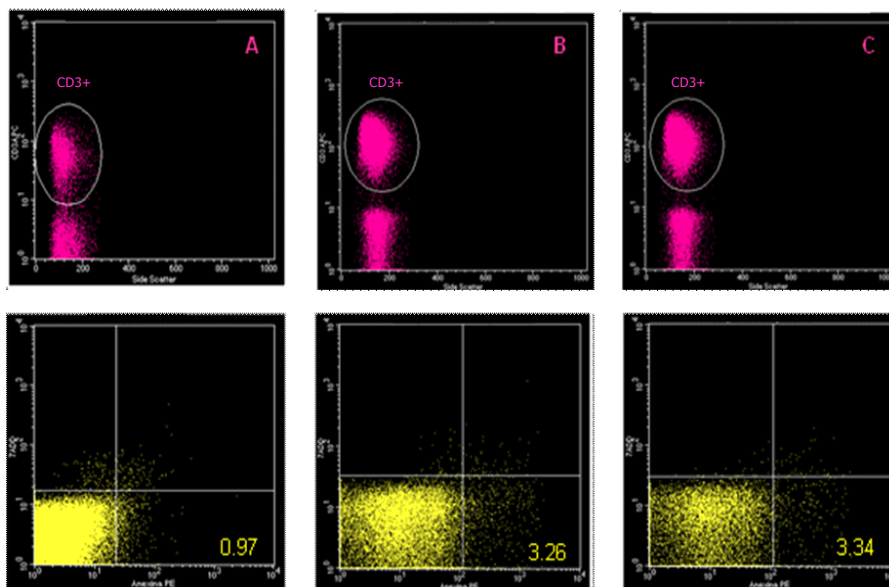


Figura 22. Valoración de la apoptosis en muestras sanguíneas. Los gráficos en rosa muestran la población CD3^+ y la CD3^- . Los gráficos en amarillo muestran el porcentaje de células CD3^+ vivas en el cuadrante inferior izquierdo, apoptóticas en el cuadrante inferior derecho y necróticas en el cuadrante superior derecho. A. Tras la extracción sanguínea (0.97% apoptosis), B. Incubación "overnight" (3.26% apoptosis) y C. Incubación "overnight" con enzimas solución C (3.34% apoptosis).

7.6.8. Análisis fenotípico y apoptótico mediante citometría de flujo de IEL y LPL

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de poblaciones celulares y de distintas moléculas en suspensión mediante el marcaje de éstas por medio de anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo. En la adquisición de las poblaciones de la muestra las células pasan de forma

120

individual captándose su tamaño y complejidad celular debido a la autofluorescencia que emiten las células. Al pasar las células, el láser del citómetro excita los fluorocromos de los anticuerpos unidos a las células, los cuales emiten fluorescencia a distintas longitudes de ondas que el citómetro traduce en la cuantificación de la expresión de uno o varios marcadores celulares de membrana, citoplasmáticos o nucleares.

Tanto los IEL como los LPL una vez aislados mediante gradiente de percoll se lavaron con PBS y se incubaron, cada una de las poblaciones (IEL y LPL) por separado, y cada población en 2 tubos. En el primer tubo marcamos con 2µl anti-CD3 conjugado con APC y con 2µl anti-CD8 conjugado con FITC, y en el segundo tubo marcamos con 2µl anti-CD3 conjugado con APC y con 2µl anti-CD4 conjugado con FITC (15min/temperatura ambiente/oscuridad). Para seguir con un lavado y marcaje con 5µl anexina-V conjugada con PE y 5µl 7-ADD (15min/temperatura ambiente/oscuridad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se añadieron 100µl de buffer del kit de apoptosis Anexina-V y a continuación se adquirieron por citometría de flujo mediante FACSCalibur (Becton-Dickinson, Bedford, MA, US).

La anexina V es una proteína con una alta afinidad por el fosfolípido fosfatidilserina (PS), el cual se transloca del lado interno al externo de la membrana plasmática en la fase inicial de la apoptosis. Por este motivo se utiliza la anexina V conjuntamente con un marcador de viabilidad como es 7-ADD. Esta molécula difunde a través de roturas en la membrana de células muertas actuando de forma análoga al yoduro de propidio. Las células apoptóticas serán positivas para anexina V y negativas para 7-ADD, las células viables serán negativas para ambos marcajes, mientras que las células que estén en una fase muy tardía de apoptosis o que hayan muerto como resultado de la necrosis serán positivas para los 2 marcajes.

El mínimo de células adquiridas para la cuantificación del fenotipo y de la apoptosis fue de 5000 células CD3⁺. El porcentaje de células CD3⁺ se expresa respecto al total de linfocitos adquiridos los cuales se determinan por su

Material y métodos

complejidad y tamaño celular. Los resultados nos permitirán evaluar el porcentaje de CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺, así como su respectivo nivel de apoptosis.

7.6.9. Determinación de la apoptosis mediante el método ISOL

A partir de secciones parafinadas de colon se determinó la apoptosis mediante "ApoTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation Apoptosis Detection Kit" (ISOL). La técnica de ISOL se basa en la especificidad bioquímica del enzima ligasa T4 DNA el cual se une covalentemente a extremos complementarios de un par de moléculas de DNA de doble cadena. Los extremos que unirá la ligasa T4 provienen del DNA genómico de la muestra y de un oligonucleotido sintético unido a biotina que suministra el kit ISOL. La detección se hace añadiendo un conjugado de estreptavidina-peroxidasa que tiene gran afinidad por la biotina que contiene el oligonucleotido. La peroxidasa provoca la deposición del sustrato diaminobenzadina (DAB) de la solución que se añadirá y que podremos visualizar por microscopia óptica. El marcaje coincide con la morfología celular apoptótica y la localización subcelular se hace aparente en la cromatina apoptótica. (Figura 23).

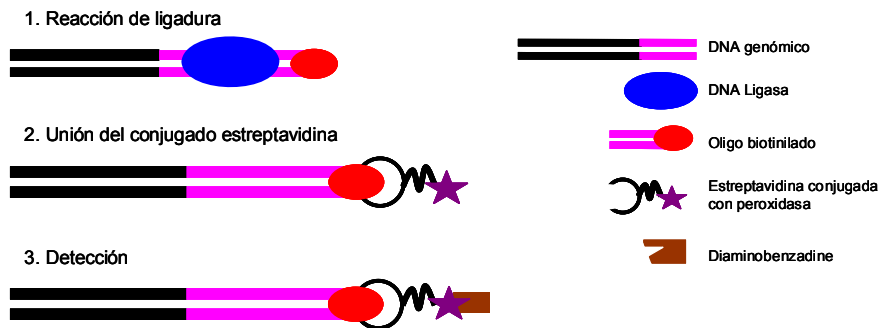


Figura 23. Esquema del proceso "ApoTag Peroxidase In Situ Oligo Ligation Apoptosis Detection Kit"

Esta técnica es más específica para la detección de la apoptosis que otras técnicas convencionales de detección *in situ* como el TUNEL ("Terminal deoxynucleotidyl transferase"), ISNT (DNA polimerasa I) o ISEL (Klenow DNA polimerasa), en las cuales no se diferencia entre la fragmentación

internucleosomal del DNA y la fragmentación DNasa tipo I causada por la activación de las endonucleasas apoptóticas, la cual es reconocida por T4 ligasa. De esta manera con este método, el marcaje que se obtiene se restringirá a la cromatina que empieza a condensarse para formar los cuerpos apoptóticos, evitando los falsos positivos debido al marcaje de "nicks", "gaps" o cadenas simples de DNA.

El procedimiento es el siguiente, se desparafina la sección del tejido con un gradiente decreciente de alcoholes (xileno/etanol absoluto/ etanol 95% /etanol 70%). Una vez se ha desparafinado e hidratado la muestra, se bloquea la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. Para dejar libres los epítomos del DNA que pudieran haber quedado enmascarados en el proceso de parafinización se hace un tratamiento con proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml durante 20min a temperatura ambiente. Después de este proceso se aplica un buffer de equilibrio durante 15min a temperatura ambiente y a continuación se aplica el oligonucleótido conjugado con biotina y el enzima DNA ligasa T4 y se incuba en una cámara oscura "overnight" a una temperatura entre 16-22°C. Transcurrido este periodo se lava y se incuba de nuevo en la cámara oscura ahora con el conjugado estreptavidina-peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente, y añadimos el sustrato de peroxidasa (DAB). Finalmente contrateñimos con hematoxilina (que tuvo mejor rendimiento que el Metyl Green) y deshidratamos. Se contaron el número de linfocitos apoptóticos en 10 campos en relación al número total de células con la ayuda del software "Scion Image" y diferenciando entre compartimiento epitelial y de lámina propia. Para el estudio 2 de esta tesis, el número de linfocitos apoptóticos se referencia al total de linfocitos CD3⁺ valorados por inmunohistoquímica.

7.6.10. Determinación CD3, TLR2 y MyD88 por inmunohistoquímica

Para determinar las células CD3⁺, TLR2⁺ y MyD88⁺ en el tejido cólico utilizamos anticuerpos primarios específicos que posteriormente serán detectados, o bien por un anticuerpo secundario o mediante polímeros inertes específicos. (Tabla 15).

Material y métodos

En nuestro estudio se identificaron las células CD3⁺, TLR2⁺ y MyD88⁺ en muestras incluidas en parafina de las que se obtuvieron secciones de 5 µm. Se desparafina la muestra mediante un gradiente decreciente de alcoholes (xileno/etanol absoluto/etanol 95%/etanol 70%) y por último se lava con PBS. A continuación bloqueamos la actividad peroxidasa endógena que pueda tener el tejido sumergiéndolo durante 30 min en H₂O₂ al 3% diluida en PBS. Seguidamente, se realiza un lavado con PBS y a continuación se incuba la muestra durante 30 min con buffer citrato (0.01 M, pH 6) a 95°C para externalizar los epítomos de la molécula a marcar que pudieran haber quedado enmascarados en el proceso de parafinización. Una vez superado este proceso, bloqueamos las posibles uniones inespecíficas que pudieran darse con "Normal Goat serum" y a continuación se incuba con el anticuerpo específico para CD3, TLR2 o MyD88 "overnight" a 4°C en oscuridad. En el caso del marcaje para CD3, tras la incubación con el anticuerpo primario hacemos 2 lavados con PBS para eliminar el anticuerpo no unido y, a continuación, se marca con el anticuerpo secundario anti-CD3-biotina durante 10 min tras los cuales se hacen otros 2 lavados adicionales. Para la detección del anticuerpo secundario se añade estreptavidina-peroxidasa durante 20 min la cual reaccionará con el sustrato DAB que añadimos a continuación. Lavamos con PBS, contrateñimos con hematoxilina y deshidratamos la muestra mediante incubaciones seriadas de alcoholes pero en sentido creciente, de menos concentrado a más.

Tabla 15. Anticuerpos inmunohistoquímica

| | Anti-CD3 | Anti-TLR2 | Anti-MyD88 |
|-------------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Casa comercial | Dako | Santa Cruz | ProSci |
| Dilución 1ario | 1:3200 | 1:20 | 1:400 |
| Control positivo | Ganglio Ratón | | |

En el caso del marcaje de TLR2 y MyD88 el sistema de revelado se hizo mediante polímeros, en lugar de añadir un anticuerpo secundario se añaden polímeros. Estos polímeros están conjugados con un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario unidas directamente a una columna de dextrano activada. Se llevó a cabo mediante el sistema Ventana (Benchmarck).

Mediante microscopía óptica se valora la expresión de los distintos marcadores. En el caso de CD3⁺ se contó el número de células positivas en 10 campos distinguiendo entre los distintos compartimentos intestinales. Mientras que para la valoración de MyD88 y TLR2 se evaluó su distribución y localización en el colon de los ratones, normalizando los resultados en función del número total de células por campo en 10 campos analizados.

7.6.11. Cuantificación de la expresión de TLR2 y TLR9

A. Extracción de RNA

Para evitar contaminar la muestra con DNA genómico, o con RNAsas que degradan el RNA, lo que nos daría en la PCR falsos positivos y negativos respectivamente, utilizamos guantes, puntas estériles con filtro, material y reactivos libres de RNAsas y trabajamos en un área limpia, Termi-DNA-tor, que elimina restos de DNA. Para evitar la degradación del RNA durante el proceso de extracción se mantiene la muestra a 4°C. A partir de dos secciones de colon que se congelaron mediante nitrógeno líquido se extrajo el RNA total de la muestra mediante el kit "RNeasy Mini Kit" siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, después de homogeneizar el tejido en un buffer de lisis que facilita el kit se pasa el lisado a través de una columna contenida en un eppendorf la cual retiene el RNA de la muestra. Después de varios lavados con distintos buffers, también suministrados por el fabricante, se elude el RNA en H₂O DEPC.

B. Cuantificación, pureza e integridad del RNA

Una vez extraído el RNA se valoró la concentración, pureza e integridad. Debido a las características fisicoquímicas de las moléculas de ácidos nucleicos, pueden absorber luz cuando están en dilución. Gracias a esta propiedad podemos aplicar la Ley de Lambert-Beer, de manera que la concentración de RNA o DNA puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

Material y métodos

$$\text{Concentración Ac. Nucleicos (ng/ml)} = A_{260\text{nm}} \times C$$

Siendo C el coeficiente de extinción molar que equivale a 50 en el caso del DNA y a 40 para el RNA en solución acuosa.

El ratio de absorbancia 260/280nm (Nanodrop, Cultek, España) nos indica la calidad y pureza del RNA, considerándose de óptima calidad si la relación 260/280nm se encuentra entre 1.8-2. Cuando esta relación se encuentra por debajo de estos valores nos están indicando presencia de proteínas, fenoles o de otros contaminantes o degradación del ácido nucleico.

La integridad de los ácido nucleicos puede evaluarse mediante su separación en geles de agarosa y posterior visualización mediante luz ultravioleta. Utilizando este método para evaluar la integridad deberemos observar una única banda para el DNA y 2 bandas para el RNA que corresponden al RNA ribosómico 18S y 28S en el caso de células eucariotas como es nuestro caso. Si el ácido nucleico se encuentra degradado observaremos un fondo de pequeños fragmentos de ácidos nucleicos. (Figura 24).

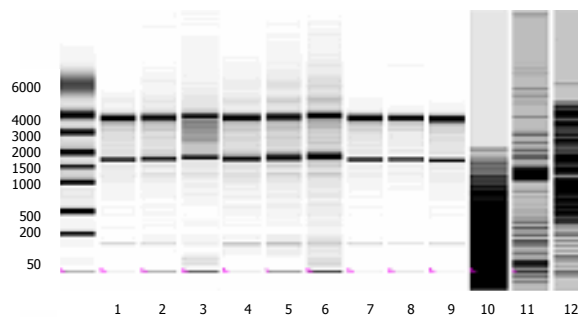


Figura 24. Gel para la valoración de la integridad del RNA. En los canales 1-9 pueden observarse 2 bandas, 18s y 28s, las cuales indican una buena calidad e integridad de las muestras. En los canales 10-12 se observan muestras degradadas

C. Retrotranscripción del RNA

Para la retrotranscripción del RNA se utilizó el kit de transcripción reversa de Promega. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se preparó una "master mix" que contenía: oligo(dT)15, nucleótidos, la retrotranscriptasa AMV, el buffer de retrotranscripción, el enzima RNasin y MgCl_2 ; a la que se le añadió $1\mu\text{g}$ de RNA.

Se mantuvo durante 15 min a 42°C, seguido de 5 min a 95°C y finalmente 5 min a 4°C.

D. PCR en tiempo real

A diferencia de la PCR convencional en la que se mide el producto final, la PCR en tiempo real mide la fluorescencia que se genera durante la fase de crecimiento exponencial del producto de amplificación de PCR.

El equipo para la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida, LightCycler 1.0 (Roche), consta de un termociclador convencional y un detector de fluorescencia. La reacción se lleva a cabo en capilares de 20 µl que se colocan en un "carousel" en el que pueden cargarse hasta 32 capilares. En los capilares se deposita la muestra y la "master mix" que contiene los primers, la DNA polimerasa, los nucleótidos y la molécula de marcaje. Para el marcaje del producto de la PCR a tiempo real pueden utilizarse distintos tipos de sondas de DNA (sondas Taqman, HybProbes, UPL) o reactivos intercalantes a la doble cadena de DNA que se sintetiza (SYBR Green I). En nuestro trabajo utilizamos SYBR Green I para la cuantificación de la expresión de TLR2 y TLR9 en colon.

SYBR Green I es un fluorocromo con gran afinidad por el surco menor del DNA de doble cadena con lo que durante la reacción se va acumulando de forma proporcional al nuevo DNA sintetizado. Este marcaje es de amplio uso a pesar de ser más inespecífico que las sondas, ya que podría unirse por ejemplo a moléculas de doble DNA formadas por la unión a dímeros de primers o a productos inespecíficos amplificados que nos podrían dar falsos positivos. Para evitar esto se han de diseñar los primers con especial atención y comprobar la temperatura de "Melting" o disociación (T_m) del producto. T_m es específica para cada amplicón y corresponde a la temperatura a la cual el 50% del DNA se disocia en DNA de cadena simple. Al finalizar la reacción, el equipo de PCR aplica un gradiente de temperaturas creciente y monitoriza la cinética de disociación del fragmento amplificado. De este modo y conociendo la T_m teórica del amplicón se puede comprobar la especificidad de los primers utilizados y por lo tanto de la amplificación pero además permite descartar la

Material y métodos

presencia de dímeros de primers y amplificaciones inespecíficas que en general tienen una T_m diferente a la del amplicón.

El producto de la reacción o amplicón tiene que tener entre 50 y 150 pb para que la reacción tenga una buena eficiencia. Los fragmentos pequeños se amplifican con mayor eficiencia que los grandes ya que tienen gran facilidad de desnaturalizarse a 95°C y se sintetizaran más rápidamente.

En caso de usar SYBR Green I, se recomienda que la longitud del amplicón proporcione una T_m mayor de 75°C para que no coincida con la T_m típica de un dímero de primer.

E. Construcción recta estándar

El LightCycler permite detectar entre 10^1 y 10^{10} copias en un solo análisis, que nos calculará el equipo extrapolando entre la fluorescencia emitida y el ciclo en el que empieza a detectarse dicha fluorescencia en una muestra determinada. La cuantificación puede ser absoluta o relativa respecto a una muestra de referencia y siempre normalizada mediante la cuantificación de un "House Keeping gen" (HKG). Un HKG es un gen que se expresa en todos los tejidos para mantener las funciones celulares básicas y de forma constante e invariable independientemente de las condiciones del ensayo (tratamiento con fármacos, estado de salud, edad, tipo de tejido, etc.). El HKG normaliza la expresión del gen problema de manera que se equilibran las posibles diferencias entre muestras. En nuestro estudio hemos recurrido a la cuantificación absoluta mediante estándar externos y normalizando mediante la β -actina.

Para hacer una cuantificación absoluta respecto un HKG es necesario construir una recta estándar. Para la creación de la recta estándar, se extrae RNA del mismo tejido, se retrotranscribe a cDNA tal y como se ha descrito y se amplifica mediante PCR convencional. La "master mix" para la PCR contiene los primers específicos para el gen concreto del que se quiere hacer la recta estándar, los nucleótidos, el buffer de PCR y la Taq DNA polimerasa. A la "master mix" se le

añada la muestra y se amplifica bajo las condiciones especificadas en la tabla 16.

Tabla 16. Condiciones PCR

| | Tiempo | Temperatura | ciclos |
|--------------------------|--------|-------------|--------|
| Desnaturalización | 3' | 95°C | 1 |
| Amplificación | 1'' | 94°C | 45 |
| | 1'' | 60°C | |
| | 7'' | 72°C | |
| Enfriamiento | 3'' | 4°C | 1 |

El producto de PCR se corrió en un gel al 3% de agarosa durante 1 hora a 80V. Mediante un transiluminador se captó la imagen para comprobar el tamaño del amplicón y posteriormente cuantificar el nº de copias que contenía mediante el programa Sigma Scan Pro 5 y un marcador de intensidad y concentración ØX174 RF DNA/*Hae* III Fragments.

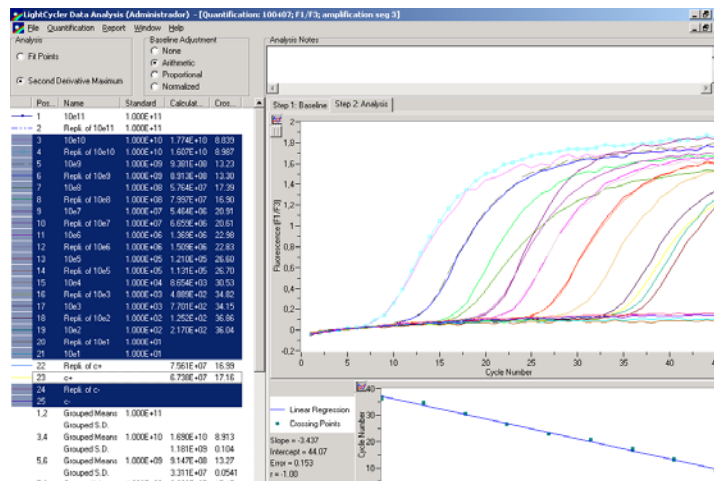


Figura 25. Recta estándar para cuantificación absoluta mediante PCR en tiempo real.

Una vez conocido el nº de copias se realizó un banco de diluciones del producto y se amplificó en el LC durante 45 ciclos a 60°C para obtener la recta estándar. (Figura 25).

F. Condiciones experimentales PCR tiempo real

Mediante el kit "LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I" se preparó la "master mix" (Fast Start Taq DNA polimerasa, buffer, MgCl₂, NTPmix, los primers (tabla 18) y SYBR Green I) y se amplificaron 5µl del producto de

retrotranscripción de cada una de las muestras siguiendo las indicaciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en capilares de 20 µl de master mix donde se cargaron 15µl de master mix y 5µl de cDNA provenientes de la muestra. También se cargaron controles negativos así como 2 concentraciones de la recta estándar y se amplifica siguiendo las condiciones de la tabla 17.

Tabla 17. Condiciones PCR en Tiempo Real

| | Tiempo | Temperatura | ciclos |
|--------------------------|--------|-------------|--------|
| Desnaturalización | 10' | 95°C | 1 |
| Amplificación | 10" | 95°C | 45 |
| | 30" | 60°C | |
| | 1" | 72°C | |
| Enfriamiento | 30" | 40°C | 1 |

Tabla 18. Primers para TLR2, TLR9 y MyD88

| Gen | "Forward" | "Reverse" |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| TLR2 | 5'AAGAGGAAGCCCAAGAAAGC3' | 5'GATGGAATCGATGATGTTG3' |
| TLR9 | 5'GCTGAGCACCCCTGCTTCTA3' | 5'CCACAGAGACGATACTGTTG3' |
| β-actina | 5'TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC3' | 5'TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG3' |

7.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS.12 (SPSS Inc, Chicago, USA). Los resultados se expresan como medianas (intervalo intercuartil) o bien mediante media±error estándar. En algún caso, también se representaron los valores máximo y mínimo.

Para la comparación de las variables cualitativas se utilizó la prueba de χ^2 y el test exacto de Fisher. Para la comparación de variables cualitativas que se ajustan a criterios paramétricos se utilizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Por otro lado cuando no se cumplían las condiciones de aplicación de ANOVA se utilizó el test no paramétrico de U Mann-Whitney. El criterio adoptado de significación estadística fue $p \leq 0,05$.

ESTUDIO 1

Evaluación de los cambios inmunológicos a nivel intestinal en ratones IL10 (-/-) mantenidos en dos condiciones ambientales distintas.

RESULTADOS ESTUDIO 1

8. 1. Resultados estudio 1

8.1.1. Los animales KO mantenidos en condiciones convencionales presentaron una mayor incidencia y gravedad en el proceso inflamatorio intestinal.

Los animales KO presentaron lesiones intestinales que fueron más graves en los ratones mantenidos en condiciones convencionales ($p=0,009$). Asimismo, los ratones deficientes para IL10 del ambiente convencional mostraron una mayor relación peso/longitud del colon respecto a sus respectivos homólogos WT ($p=0.017$), lo que es equivalente a un acortamiento y engrosamiento del colon con motivo del proceso inflamatorio. (Figura 27).

Junto con el baremo de lesión (si era ≥ 3), la presencia anemia y el decremento del peso corporal superior o igual al 5% respecto al peso inicial (figura 26), nos permitieron categorizar la incidencia de la colitis en los animales KO, ya que los animales WT en ningún caso presentaron estos signos. De esta manera, el 67% de los KO estabulados en condiciones convencionales y el 50% de los mantenidos en SPF desarrollaron colitis espontánea a las 12 semanas de vida.

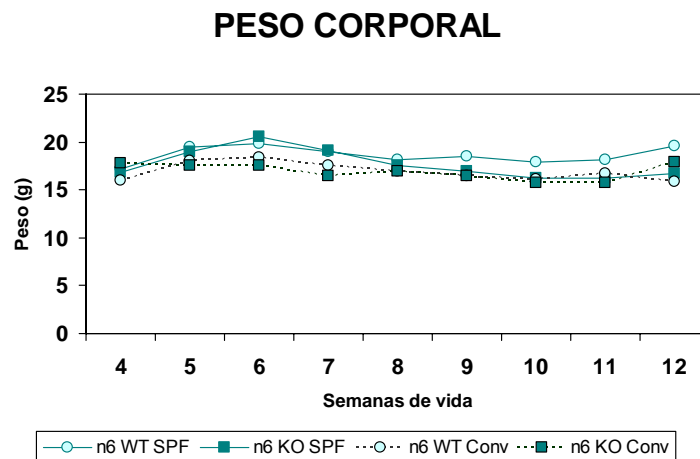


Figura 26. Peso corporal estudio 1

Hay que destacar que dos animales KO de los mantenidos en condiciones convencionales murieron antes de finalizar el estudio. La valoración posterior mostró signos de caquexia i diarrea, relacionados directamente con la aparición de colitis.

8.1.2. Los ratones IL10(-/-) expresan más IL6 e INF γ en SPF

Los animales colíticos del ambiente SPF mostraron un aumento significativo de IL2, IL5, IL6, TNF α e INF γ respecto sus controles, a diferencia de los animales del ambiente convencional que no mostraron diferencias respecto al "background" genético. La IL6 y el INF γ fueron superiores en los animales KO del ambiente SPF respecto los del ambiente convencional. (Tabla 19).

Tabla 19. Citoquinas ($\mu\text{g/ml}$ por mg tejido)

| Ambiente "Background" genético | SPF | | Convencional | | # |
|--------------------------------------|---------------|-------------------|----------------------|---------------------|-------|
| | WT | KO | WT | KO | |
| IL1 β | 0 (0-0) | 0 (0-3,9) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | ns |
| IL2 | 0 (0-2,7) | 17,5 (5,6-28)* | 0 (0-0) | 0,011 (0-0,66) | ns |
| IL4 | 0 (0-0,6) | 0 (0-4,6) | 6,6 (0-100) | 0,01 (0-0,14) | ns |
| IL5 | 0 (0-0) | 50 (12-119)* | 0,053 (0-0,12) | 0,103 (0-0,19) | ns |
| IL6 | 0 (0-0) | 16,5 (5-33)* | 0,12 (0,05-3,259) | 5,06 (0,14-4,5)# | 0,016 |
| IL10 | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 10 (0-12,5) | 0 (0-0) | ns |
| IL12 | 0 (0-0,5) | 4,9 (0-45) | 0 (0-0) | 0 (0-0,005) | ns |
| INF γ | 0,3 (0-65) | 110 (80-782)* | 0,08 (0-0,12) | 0,12 (0-0,04)# | 0,013 |
| TNF α | 0 (0-3,3) | 9,9 (0-89,8)* | 0,07 (0-0,07) | 0 (0-0,13) | ns |

* $p \leq 0,05$; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

8.1.3. Las subpoblaciones de linfocitos intestinales muestran cambios fenotípicos en función del "background" genético de los animales y del ambiente.

El porcentaje de linfocitos CD3⁺ en el compartimento intraepitelial y en la lámina propia de los animales KO fue superior al de los WT, independientemente del ambiente. (Figura 28). Como era de esperar, los IEL presentaron mayoritariamente el fenotipo CD8 mientras que los LPL polarizaron el fenotipo hacia CD4. En este sentido, fue especialmente relevante el incremento de IEL CD3⁺CD8⁺ y LPL CD3⁺CD4⁺ en los animales deficientes para la IL10 respecto a sus respectivos controles sanos (Tabla 21). Además, la relación

CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ mostró en ambiente convencional un aumento significativo en los animales KO en comparación con los WT en lámina propia.

8.1.4. La apoptosis muestra un comportamiento distinto en los dos compartimientos intestinales

Se detectó una disminución del porcentaje de apoptosis de los IEL en los ratones WT mantenidos en convencional respecto a los estabulados en SPF (p=0,050) (Figura 29). Esta disminución fue mucho más acusada en los ratones KO en comparación a sus respectivos controles (p=0,05). Por lo que respecta a los LPL, los resultados obtenidos muestran un comportamiento en la apoptosis distinto al obtenido en los IEL. En condiciones SPF existe un incremento de la apoptosis en los animales KO respecto a sus controles (p=0,05) y respecto a los animales KO del ambiente convencional (p=0,025). Por otra parte, no se observaron diferencias en la apoptosis entre las distintas subpoblaciones analizadas. (Tabla 22).

8.1.5. Las células epiteliales muestran un comportamiento apoptóticos distinto en los animales KO respecto a sus respectivos controles WT

Por ISOL se marcaron células epiteliales y linfocitos apoptóticos localizados en la mucosa intestinal. Por una parte, se observó una disminución de IEL apoptóticos en los animales KO de ambos ambientes con respecto a sus controles, mientras que los LPL sólo pudieron ser valorados en las áreas de lesión donde aparece un infiltrado inflamatorio prominente, sin observarse diferencias. Por otro lado, es destacable la disminución de la apoptosis en las células epiteliales en los animales KO respecto a sus controles. (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje células epiteliales apoptóticas valoradas por ISOL.

| Ambiente | SPF | | Convencional | | # |
|--|-------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----|
| | WT | KO | WT | KO | |
| "Background" génico | | | | | |
| % Células epiteliales de superficie | 0,053 (0,048-0,058)* | 0 (0-0,044) | 0 (0-0,37) | 0 (0,009-0,018) | ns |
| % Células epiteliales de cripta | 0,13 (0,07-0,19) | 0,08 (0,0164-0,18) | 0,033 (0-0,08) | 0,09 (0,053-0,13) | ns |
| * p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza | | | | | |

Resultados estudio 1

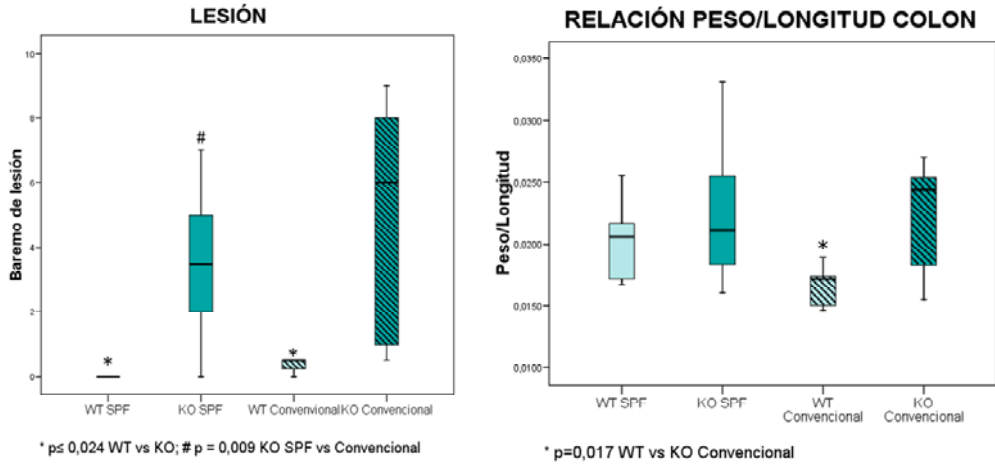


Figura 27. Lesión intestinal. Relación peso/longitud colon

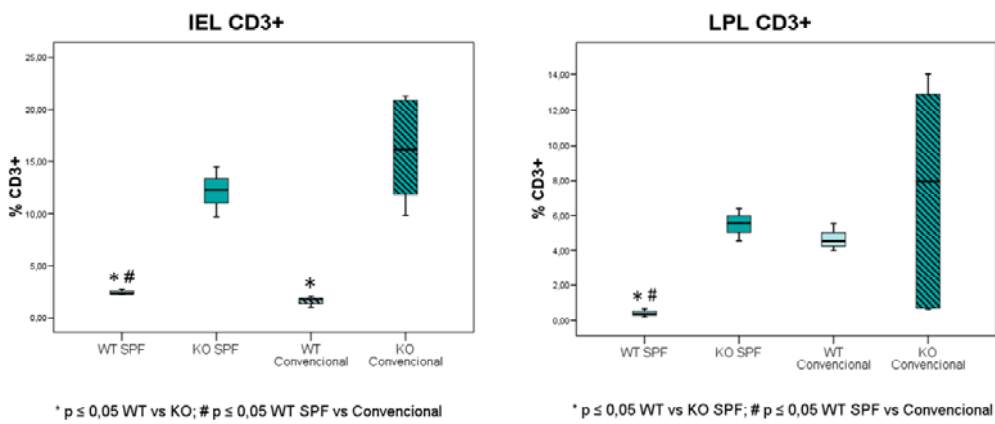


Figura 28. Porcentaje de IEL y LPL CD3⁺.

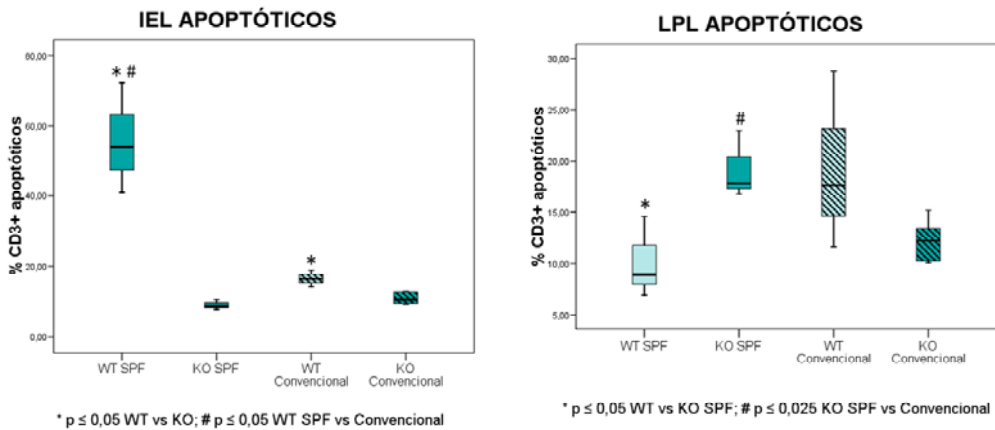


Figura 29. Porcentaje de IEL y LPL CD3⁺ apoptóticos.

Tabla 21. Porcentaje de las subpoblaciones IEL y LPL CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺.

| IEL | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|----|
| Ambiente | SPF | | Convencional | | # |
| "Background" génico | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 36,7 (24,6-38,9)* | 14,1 (10,6-15,2) | 12,8 (11,6-60,7) | 18 (12-29) | ns |
| %CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 31,8 (29-34,5) | 60,5 (60-64) | 42,3 (33,8-48,1)* | 57,8 (55,6-68) | ns |
| %CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 1 (0,7-1,3) | 0,22 (0,17-0,25) | 0,3 (0,3-1,3) | 0,3 (0,18-0,5) | ns |
| LPL | | | | | |
| Ambiente | SPF | | Convencional | | # |
| "Background" génico | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 60 (57-60,2)* | 81 (63-82) | 52 (50-65) | 74 (67-79) | ns |
| %CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 31 (22-36) | 83 (11-83) | 28 (26-32) | 16 (9-28) | ns |
| %CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 2 (1,7-2,6) | 1,9 (0,9-5,4) | 2 (1,8-2,02)* | 4,6 (2,5-8,8) | ns |

* p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

Tabla 22. Porcentaje del subpoblaciones IEL y LPL CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺.

| IEL Apoptóticos | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|----|
| Ambiente | SPF | | Convencional | | # |
| "Background" génico | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3 ⁺ CD4 ⁺ apoptóticos | 40 (11,7-42,8) | 8,7 (7,9-12,4) | 18,1 (17-25,6) | 17,3 (13,7-20) | ns |
| %CD3 ⁺ CD8 ⁺ apoptóticos | 32 (8,2-40,6) | 8,4 (7,4-9,1) | 10,8 (6-13) | 7,5 (7,3-9,7) | ns |
| LPL | | | | | |
| Ambiente | SPF | | Convencional | | # |
| "Background" génico | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3 ⁺ CD4 ⁺ apoptóticos | 12 (14-6,8) | 20 (13,3-31) | 18,6 (13,4-30,1) | 13,8 (10-16,5) | ns |
| %CD3 ⁺ CD8 ⁺ apoptóticos | 5,3 (4,6-13,5) | 16 (11,1-21,7) | 7 (6,8-26,5) | 16,3 (8,8-21) | ns |

* p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

8.1.6. La mayor expresión de TLR2 y TLR9 se asocia a los animales KO en condiciones SPF.

Se observa un aumento de TLR2 en los animales KO del ambiente SPF respecto a sus controles. En ambiente convencional se observa una tendencia a la disminución de TLR2 en los animales colíticos sin ser significativa. El TLR9 no muestra diferencias. (Figura 30)

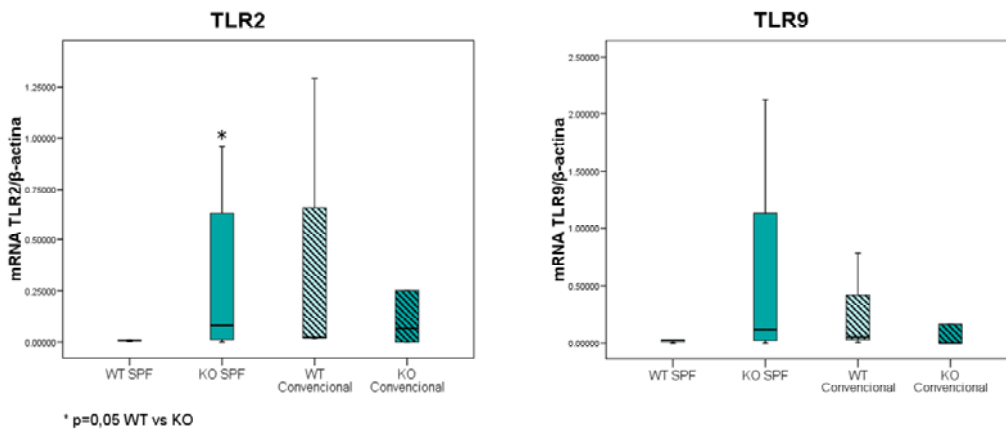


Figura 30. Expresión de TLR2 y TLR9 valorada por PCR en tiempo real.

8.1.5. TLR2 se expresa mayoritariamente en el epitelio intestinal

El marcaje mediante inmunohistoquímica de TLR2 nos muestra una localización muy abundante en el epitelio colónico. Concretamente, la distribución de TLR2 se observa de forma abundante en la base y a lo largo de la cripta intestinal, alcanzando en ocasiones el área superficial (aparentemente esto ocurre más en los animales mantenidos en SPF que en ambiente convencional). (Figura 31). TLR2 también se encuentra localizado en algunas células en la lámina propia siendo más abundante en el ambiente SPF. No obstante, existe una pérdida de marcaje en las criptas del epitelio intestinal próximas a áreas de lesión, a la vez que una reducción en el número de células inflamatorias de la lámina propia marcadas para TLR2. Para comprobar si esta reducción del marcaje de TLR2 era exclusiva de esta vía de señalización también realizamos el marcaje de MyD88, molécula adaptadora de las vías de señalización de varios TLR y de otras señalizaciones proinflamatorias. Para ello se realizó una tinción adicional de MyD88. (Figura 32). En este sentido, el marcaje con MyD88 siguió el mismo

patrón que el marcaje de TLR2, especialmente abundante en el epitelio intestinal y desapareciendo completamente de las áreas de lesión. Además hay que destacar que tanto TLR2 como MyD88 muestran una distribución más amplia en ratones deficientes para IL10 que en sus respectivos controles.

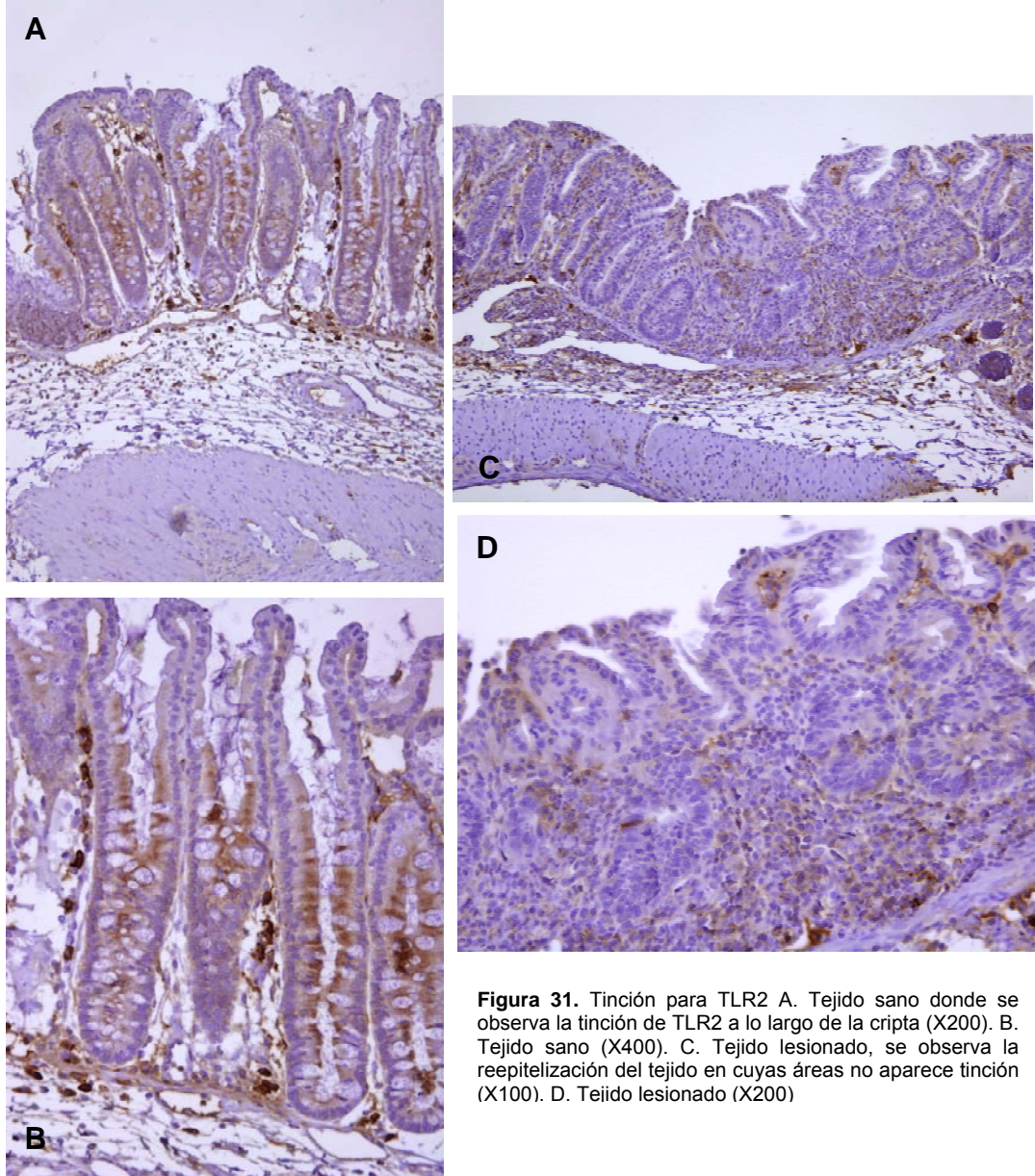


Figura 31. Tinción para TLR2 A. Tejido sano donde se observa la tinción de TLR2 a lo largo de la cripta (X200). B. Tejido sano (X400). C. Tejido lesionado, se observa la reepitelización del tejido en cuyas áreas no aparece tinción (X100). D. Tejido lesionado (X200)

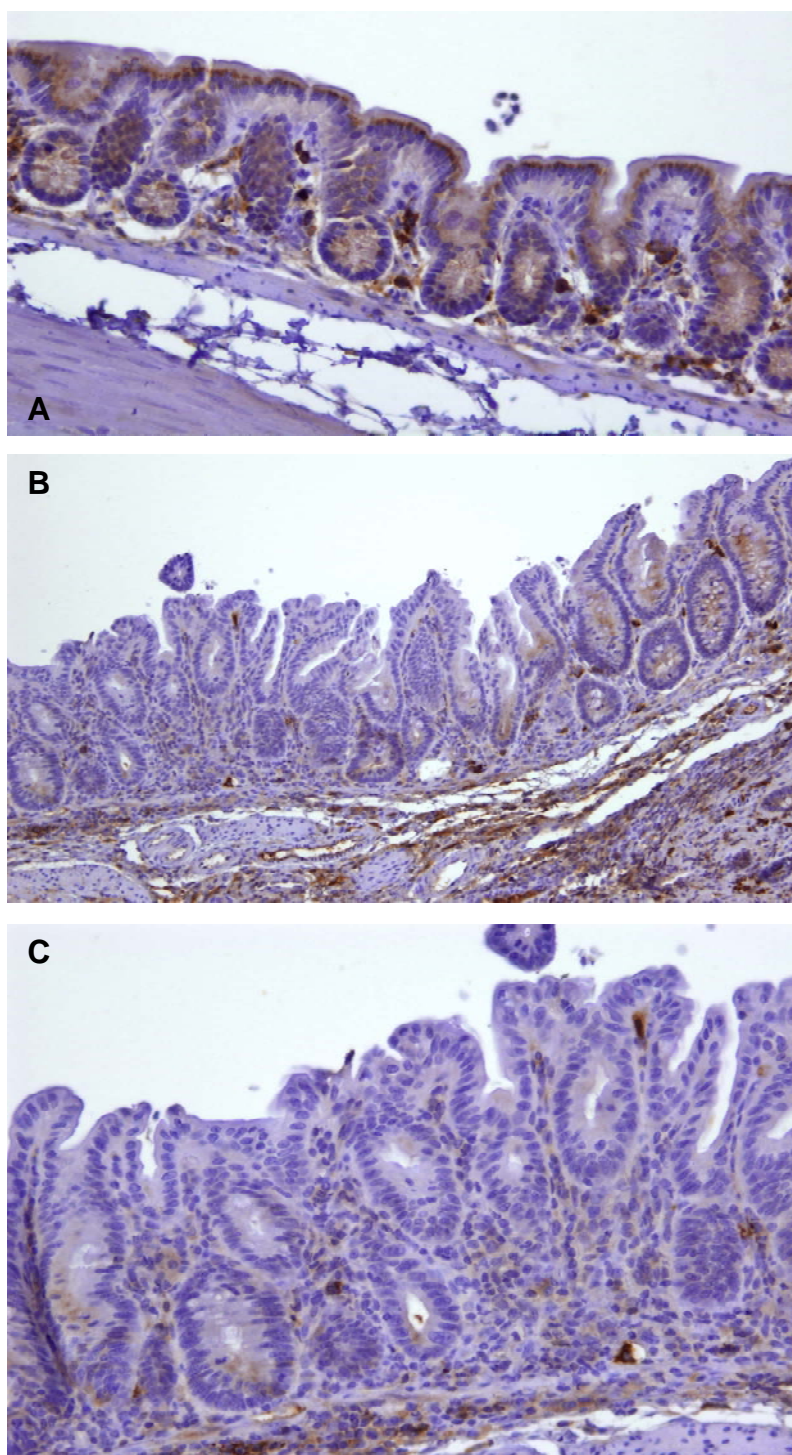


Figura 32. A. Tejido sano, la tinción con MyD88 se observa a lo largo de toda la cripta (X200). B. Tejido lesionado con ausencia de tinción para MyD88 (X100). C. Tejido lesionado (X200).

DISCUSIÓN ESTUDIO 1

8.2. Discusión Estudio 1

Los ratones deficientes para la IL10 representan una excelente herramienta para la evaluación de los mecanismos celulares y moleculares que acontecen en el desarrollo de la enterocolitis espontánea que sucede en algunas cepas a partir de la semana 8 de vida.¹⁷⁹ Diversos estudios han empleado este modelo experimental para estudiar la relación entre el huésped y la microflora intestinal, así como para profundizar en particularidades del sistema inmunológico intestinal y evaluar distintas estrategias terapéuticas.¹⁰⁴ Debido a la elevada sensibilidad que muestran los ratones IL10 (-/-) a los cambios ambientales que afectan a la aparición y gravedad de las lesiones intestinales,¹⁷⁹ el presente estudio ha caracterizado cambios inmunológicos en la mucosa colónica al trasladar los animales mantenidos en condiciones SPF a un ambiente convencional en un intento de reproducir las condiciones experimentales de la hipótesis de la higiene.

La lesión intestinal observada en los animales susceptibles a padecer una enteropatía espontánea por la deficiencia de la IL10 mostró, como era de esperar, un mayor índice de lesión histológica y de la relación peso/longitud cólica en los animales mantenidos en ambiente convencional, a pesar que la incidencia de colitis fue similar (50% vs 67%). En este sentido, el análisis histológico de las lesiones reveló una mayor presencia y áreas más extensas de ulceración en los animales IL10 (-/-) estabulados en ambiente convencional que los estabulados en SPF, los cuales manifiestan menos deterioro inflamatorio sobre la mucosa en la que aparecen únicamente algunas microulceraciones.

Con el objetivo de caracterizar la respuesta celular en dos compartimientos intestinales separamos de forma fraccionada los IEL y LPL. En ambos casos el número de células CD3⁺ está incrementado en los animales KO respecto a sus controles sanos. Esta diferencia comporta el incremento de los fenotipos predominantes de cada compartimiento, CD3⁺CD8⁺ en el compartimiento intraepitelial y de CD3⁺CD4⁺ en lámina propia. A pesar del aumento de estas subpoblaciones en sus respectivos compartimientos, la relación CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ se mantiene estable en todos los grupos a excepción de

los animales KO del ambiente convencional que manifiestan un aumento significativo de esta relación y que coincide con los animales que presentaron las lesiones más graves. A excepción de esta última relación celular comentada, el comportamiento fenotípico general de las poblaciones de ambos compartimientos no difiere, en cambio el análisis de la apoptosis revela un comportamiento celular distinto entre compartimientos en función del ambiente. Tanto los IEL, en ambos ambientes, como los LPL de los animales KO del ambiente convencional muestran un incremento de la población CD3⁺ con un bajo porcentaje de apoptosis, lo que supone una elevada actividad celular. Por el contrario los LPL CD3⁺ de los animales KO en SPF tienen una actividad celular menor y similar a lo de los animales sanos (WT), proceso que concuerda con unas lesiones menores y menos graves en este grupo experimental.

Estos resultados hacen pensar que ambos compartimientos con funciones distintas responden de forma diferente y modulada por el ambiente. Los animales deficientes para IL10 muestran alterada la función barrera.^{179, 193} Los IEL, primer mecanismo de defensa celular, reaccionan de forma similar tanto en SPF como en convencional, mientras que los LPL de los animales KO aumentan su actividad únicamente en un ambiente con mayor y más variada presencia antigénica.

En nuestro estudio no podemos detallar las acciones individuales de cada fenotipo celular, efector o regulador. El aumento de CD8⁺ podría ser el causante de la lesión debido entre otras a la capacidad citotóxica de algunas subpoblaciones.¹⁹⁴ Por otro lado, este aumento podría vincularse a la aparición de subpoblaciones CD8⁺ con capacidad reguladora e incluso protectora sobre el epitelio intestinal en un intento de mantener la función barrera.⁴⁶ Existen IEL TCRδγ que se han asociado al mantenimiento de la integridad de las superficies epiteliales dañadas mediante la síntesis de factores de crecimiento celular específicos para las células epiteliales.^{46, 195}

En cambio, a nivel de lámina propia, el ambiente sí que es determinante. Los mecanismos desencadenados en el compartimiento intraepitelial mantienen la

función barrera en un ambiente controlado, SPF.^{46, 194} En cambio en condiciones convencionales, la presencia de más antígenos y bacterias potencialmente patológicas dañan aún más la función barrera, en este sentido se han descrito algunas bacterias patogénicas capaces de alterar las TJ.¹⁹⁶ Frente a una barrera muy debilitada se activa la función inmunológica de la lámina propia. Por este motivo, la actividad de los LPL sólo se muestra elevada en los animales colíticos del ambiente convencional, lo que coincide con la aparición de lesiones más graves y que se han relacionado con la actividad lesiva de células CD4⁺.¹⁹⁷ A pesar de que no se observan diferencias significativas en las subpoblaciones de este compartimiento, si se observa una tendencia al aumento de CD4⁺ y una tendencia a la disminución de CD8⁺, ratificado por el aumento significativo de la relación CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ en los animales KO del ambiente convencional. A pesar de no poder diferenciar las CD4⁺ efectoras de las reguladoras, debido al déficit de IL10 de estos ratones las CD4⁺ existentes no podrán desarrollar su función reguladora. Por lo tanto el aumento de CD4⁺ efectoras y la disminución de CD8⁺, también recientemente descritas como reguladoras en lámina propia,¹⁹⁸ es lo que acaba provocando lesiones mayores y más graves. En cualquier caso, la actividad celular disminuida en los ratones KO mantenidos en SPF en comparación con los mantenidos en ambiente convencional sugiere una cierta capacidad de control sobre el proceso inflamatorio independiente de la deficiencia para IL10. Lo que es lo mismo que decir que la deficiencia de IL10 es crucial en el control de la inflamación intestinal más intensa y con características de inflamación crónica.

La determinación de la apoptosis con el método ISOL reafirma los aspectos evaluados mediante citometría de flujo por lo que respecta a los linfocitos intestinales. No obstante, este método histológico también nos permitió evaluar las células apoptóticas del epitelio intestinal. Los animales deficientes para IL10 en SPF muestran una disminución del proceso apoptótico normal de las células epiteliales en la superficie de la cripta. Recientemente se ha asociado el déficit de IL10 a la alteración del proceso apoptótico normal en células epiteliales e inflamatorias.¹⁷⁶ Además, la disminución de la apoptosis en las células del epitelio intestinal se ha vinculado a la vía de señalización TLR/NFκB.¹⁹⁹ De

hecho, se ha demostrado que la activación de TLR2, así como de MyD88, comporta un reforzamiento de la función barrera intestinal y de la reparación tisular.^{39,200} Con el objetivo de obtener información de estos mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, se valoró la expresión de TLR2 y TLR9 en la totalidad del colon de los animales de experimentación. Nuestros resultados indican un incremento de la expresión de TLR2 y TLR9 en los animales KO del ambiente SPF, aunque los animales mantenidos en ambiente convencional también expresan estos marcadores sin alcanzar significación. Este comportamiento en la expresión de TLR2 y TLR9 se puede correlacionar inversamente con el déficit de apoptosis en las células del epitelio intestinal, lo que sugiere que las señales transmitidas a través de TLR2 y TLR9 refuerzan la barrera epitelial.

Por otra parte aunque la evaluación mediante inmunohistoquímica de TLR2 no desveló excesivas diferencias entre los animales mantenidos en los dos ambientes y respecto a sus controles sanos, si pudimos constatar la desaparición de TLR2 de las áreas lesionadas y el tejido intestinal adyacente. Para comprobar que este hecho era independiente a la deficiencia de IL10 también analizamos ratones de la cepa BalbC a los que se les indujo colitis por TNBS. En este caso las áreas de lesión también carecieron de marcaje para TLR2. Además en un intento de comprobar si esta desaparición de las áreas de lesión era exclusiva para TLR2 realizamos un marcaje de la molécula adaptadora MyD88, cuya tinción fue coincidente con la de TLR2 apreciándose a lo largo del epitelio intestinal y desapareciendo de nuevo en las zonas de lesión.

Tal y como se ha descrito, el papel de los TLR es fundamental para la adquisición de la tolerancia así como para la activación de la respuesta inmune frente a patógenos. Es especialmente importante el mantenimiento del equilibrio de la expresión de estos receptores cuyo déficit provoca la imposibilidad de respuesta frente a infecciones mientras que una sobreexpresión cronifica el proceso inflamatorio. La sobreexpresión de ciertos TLR se ha descrito en la EII.¹⁷⁴ Sin embargo, los resultados del presente estudio

vinculan principalmente las acciones de TLR-2 a un mantenimiento de la función barrera.

La activación de NFκB a través de la vía TLR2/MyD88 induce expresión de genes implicados en la reparación tisular, la supervivencia celular a la vez que inhibe la apoptosis de células epiteliales intestinales.^{175, 201} En este sentido, nuestros resultados indican que las células epiteliales de los ratones que expresan más TLR2 presentan un descenso en la apoptosis de las células epiteliales, especialmente de las zonas más superficiales en continuo "turn over". Todos estos datos sugieren que los animales en un medio controlado (SPF) aumentan la expresión de TLR2, activando NFκB con la consecuente inhibición del proceso apoptótico de las células epiteliales intestinales. Además, la activación de NFκB regula otros procesos inflamatorios como la producción de citoquinas. En nuestro estudio, destaca la producción de IL6 e IFNγ en los animales KO en SPF, pero no en los KO del ambiente convencional. A pesar de la aparente contradicción que supone la mayor producción de IL6 e IFNγ en los ratones con lesiones menos graves que en los ratones con lesiones más importantes, numerosos estudios han demostrado el papel citoprotector de la IL6 cuya deficiencia induce la pérdida de la integridad de la mucosa intestinal en animales deficientes para MyD88 (-/-) con colitis inducida por *Citrobacter rodentium*.²⁰² Asimismo, el IFNγ tiene un papel clave en el inicio del proceso inflamatorio y, adicionalmente, se ha mostrado disminuido en las fases crónicas de la colitis en el modelo de ratones IL10 (-/-).²⁰³

En definitiva, todos estos datos sugieren que los animales con predisposición a padecer una colitis espontánea muestran una serie de mecanismos que intentan fortalecer la barrera epitelial evitando alteraciones en la lámina propia en condiciones SPF, lo que se traduce en lesiones menos graves. Por el contrario, los ratones IL10 (-/-) tienden a agravar el proceso inflamatorio activando las células de la lámina propia y apareciendo lesiones más importantes con descenso de la expresión de TLR2 en el epitelio cólico.

CONCLUSIONES ESTUDIO 1

8.3. Conclusiones estudio 1

1. Existen mecanismos celulares distintos durante el proceso inflamatorio en función del ambiente en los ratones deficientes para IL10:

- A. Los IEL presentan mayor actividad en los ratones susceptibles a desarrollar colitis.
- B. Los LPL en condiciones SPF consiguen controlar el proceso inflamatorio, mientras que en condiciones convencionales estos LPL participan en el proceso inflamatorio.

2. Entre los mecanismos moleculares evaluados destaca que:

- A. El TLR2, así como TLR9 y MyD88, están implicados en el mantenimiento de la función barrera en los animales IL10(-/-) en SPF.
- B. El descenso de la producción de IL6 e IFN γ en los ratones IL10 (-/-) mantenidos en convencional se asocia a una mayor gravedad y cronificación del proceso inflamatorio intestinal en este modelo.

ESTUDIO 2

Efecto de la substitución del 50% de la fracción de grasa de la dieta con MCT sobre el desarrollo de colitis en el modelo IL10 (-/-).

RESULTADOS ESTUDIO 2

9.1. Resultados estudio 2

9.1.1 Los animales KO que recibieron la dieta n6/MCT no mostraron lesión histológica ni modificaron la relación peso/longitud colon.

Ninguno de los animales WT mostró lesiones en la evaluación histológica. (Figura 35). El grupo de ratones KO para IL10 a los que se suministró la dieta n6 mostró un aumento significativo del baremo de lesión respecto a los WT de su grupo ($p < 0.001$) y respecto a los KO de la dieta n6/MCT ($p \leq 0.05$). (Figura 33) Los animales KO y WT de la dieta n6/MCT no mostraron diferencias entre ellos. Además, solo un ratón IL10 (-/-) del grupo n6/MCT mostró un baremo histológico de lesión superior a 3.

La relación peso/longitud del colon se observó aumentada significativamente en los KO de la dieta n6 respecto los KO n6/MCT ($p \leq 0.024$). (Figura 33) Los animales WT y KO de la dieta n6/MCT no mostraron diferencias estadísticas entre ellos.

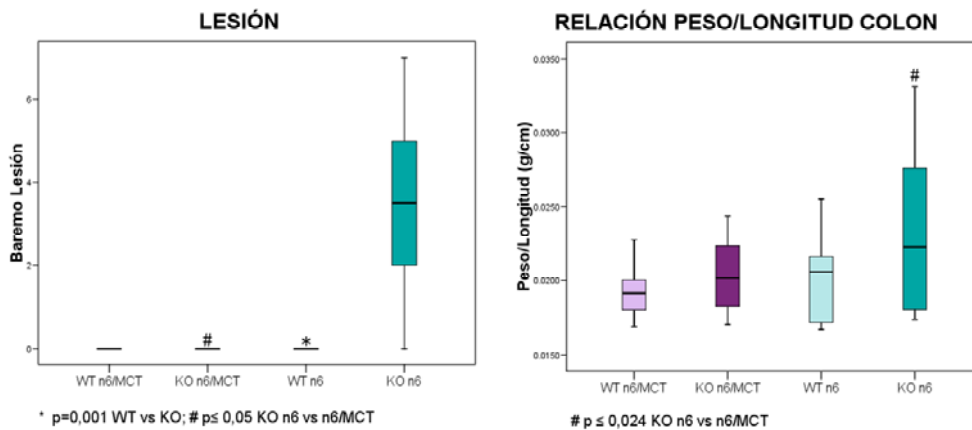


Figura 33. Lesión intestinal. Relación peso/longitud del colon

9.1.2. Los animales que recibieron la dieta n6/MCT presentaron una baja incidencia de colitis

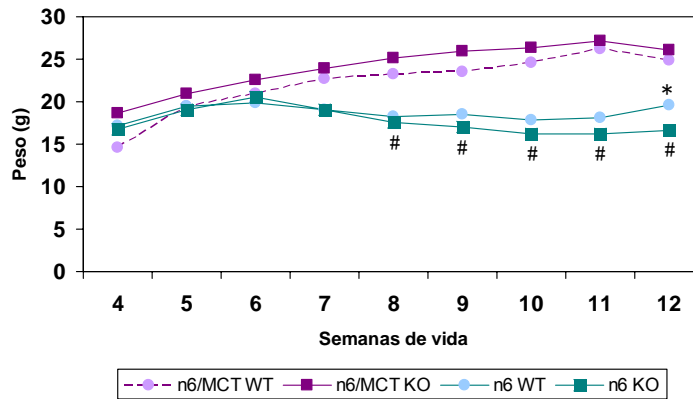
Se consideraron animales colíticos aquellos que cumplieron dos de tres condiciones: pérdida de peso superior o igual al 5% del peso inicial (figura 34), anemia (hemoglobina inferior o igual a 12g/l) y baremo histológico superior o igual a 3. Tal y como esperábamos ningún animal WT de ninguno de los grupos

Resultados estudio 2

experimentales mostró signos de colitis. Los animales KO de la dieta n6 mostraron una incidencia significativamente superior a los de la dieta n6/MCT. (50% vs 8,3%, p=0.003).

El peso corporal fue significativamente diferente entre los animales de la dieta n6 y n6/MCT a partir de las 8 semanas de vida. En el momento del sacrificio los animales KO del grupo dietético n6 tenían un peso significativamente inferior a los WT de su grupo dietético.

PESO CORPORAL



* p ≤ 0.05 WT vs KO; # p ≤ 0.05 KO n6 vs n6/MCT

Figura 34. Peso corporal estudio 2

Mientras los animales control no mostraron cambios significativos en los hemogramas, los animales KO de la dieta n6 mostraron diferencias en la concentración de hemoglobina y en el hematocrito. Concretamente, estos parámetros se encuentran disminuidos significativamente respecto a los KO de la dieta n6/MCT. (Tabla 23).

Tabla 23. Hemoglobina y hematocrito

| Grupo | n6/MCT | | n6 | | # |
|--------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|-------|
| | WT | KO | WT | KO | |
| Hemoglobina | 15,75 (15,38-15,9) | 14,2 (13,5-14,9)* | 14,1 (5,2-14,7) | 11,05 (5,18-14,23)*# | 0,013 |
| Hematocrito | 46,95 (45,43-47,8) | 41,7 (37,9-43,4)* | 42 (23,9-43,25) | 35,1 (14,03-40,85)# | 0,022 |

* p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

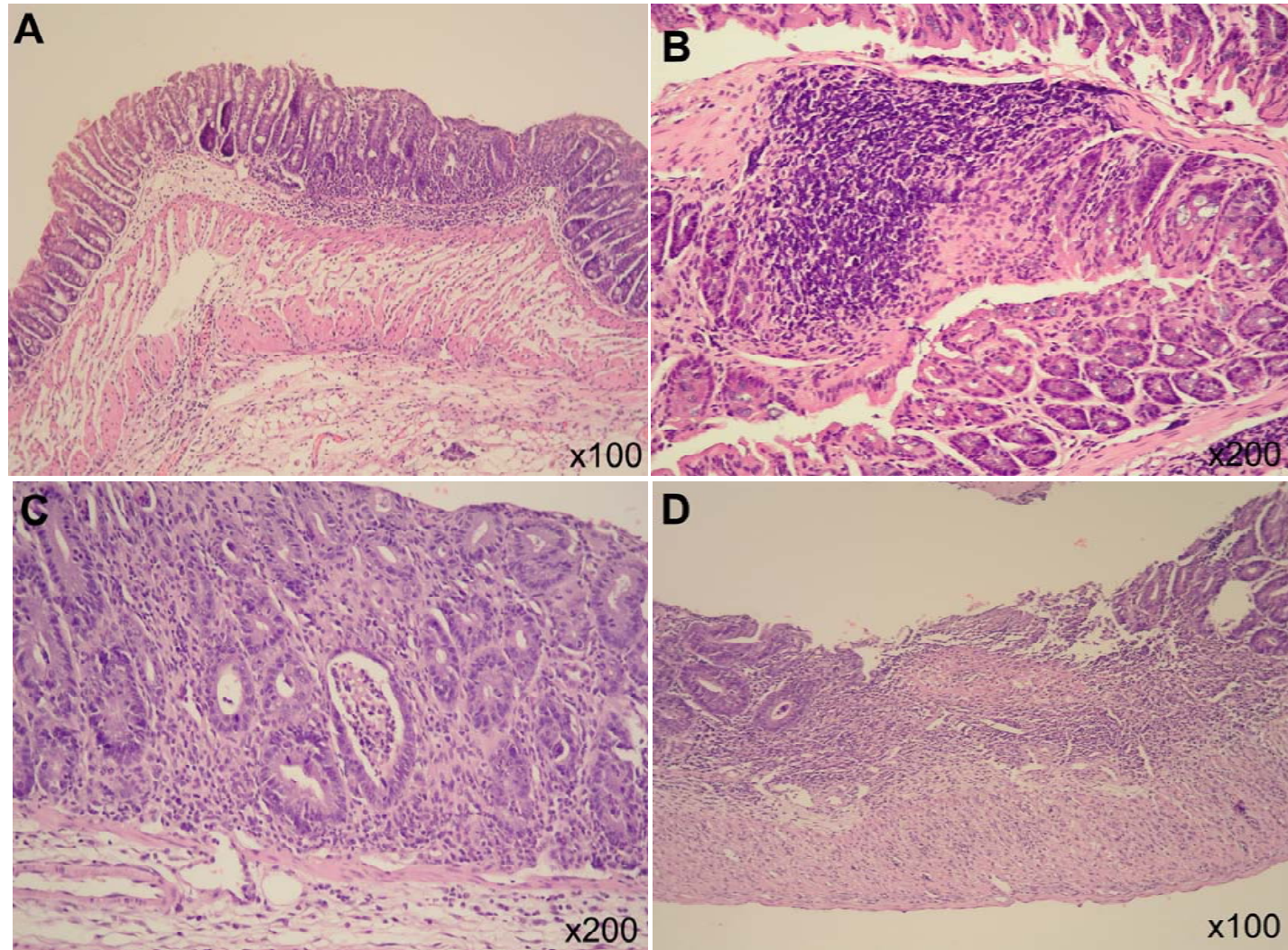


Figura 35. Lesión intestinal. A. Areas de inflamación de la mucosa con infiltrado en la lamina propia, edema transmural y pérdida de células caliciformes. B. Agregado linfocitario invadiendo la submucosa en algunas areas. C. Pérdida de la arquitectura glandular con criptitis. D. Úlcera franca limitada con epitelio más o menos conservado y con invasión de lámina propia. (H&E).

9.1.3. Los animales KO que recibieron la dieta n6/MCT no presentaron un patrón de citoquinas inflamatorias.

Las citoquinas IFN γ , IL2, IL6, IL5 y TNF α fueron superiores significativamente en animales KO de la dieta n6 respecto a sus WT, mientras que en los animales de la dieta n6/MCT no se observaron diferencias respecto a sus controles. Entre los animales KO de los dos grupos dietéticos solo se observaron diferencias significativas para IFN γ e IL6. (Tabla 24).

Tabla 24. Citoquinas ($\mu\text{g/ml}$ por mg de tejidos)

| Grupo "Background" genético | n6/MCT | | n6 | | # |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|------|
| | WT | KO | WT | KO | |
| IL1 β | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-3,9) | ns |
| IL2 | 0 (0-2,5) | 1,5 (0-12) | 0 (0-2,7) | 17,5 (5,6-28)* | ns |
| IL4 | 0 (0-0) | 0 (0-2,5) | 0 (0-0,6) | 0 (0-4,6) | ns |
| IL5 | 0 (0-0) | 6 (0-45) | 0 (0-0) | 50 (12-119)* | ns |
| IL6 | 0 (0-1) | 1 (0-3) | 0 (0-0,5) | 16,5 (5-33)* | 0,05 |
| IL10 | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) | ns |
| IL12 | 0 (0-0) | 0 (0-2,9) | 0 (0-0,5) | 4,9 (0-45) | ns |
| INF γ | 0 (0-51) | 0,8 (0-58) | 0,3 (0-65) | 110 (80-782)* | 0,05 |
| TNF α | 0 (0-0) | 0 (0-7,7) | 0 (0-3,3) | 9,9 (0-89,8)* | ns |

* $p \leq 0,05$; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

9.1.4. Determinación del perfil de ácidos grasos

A- Determinación de los AG en la mucosa intestinal

Los animales deficientes para IL10 del grupo dietético n6/MCT mostraron un aumento en el porcentaje de AGCM en el colon. Paradójicamente, estos animales también mostraron un aumento de la proporción de ácido linoleico (C18:2n6). (Tabla25).

Tabla 25. Porcentaje de ácidos grasos en mucosa

| Grupo | n6/MCT | | n6 | | # |
|------------------------------|--|----------------------|---------------------|----------------------|------|
| | WT | KO | WT | KO | |
| "Background" genético | 6.0 (3.0-7.0) | 5,9 (5,7-9) | 4.4 (3.1-7.5) | 3,7 (0,2-5,8)# | 0,03 |
| AGCM (C8-C12) | 40 (31-44) | 39,3 (34-46) | 43.6 (39.8-51.2) | 52,2 (38,6-59) | ns |
| ACGL (C14-24) | 12 (11.5-15.1) | 13 (11,6-15) | 11.9 (9.8-13.6) | 10,2 (6,5-13,5) | ns |
| AGMI | 26 (21-29) | 25,6 (8,3-29,4) | 24 (13.6-31.6) | 18,4 (0,4-25) | ns |
| AGPI n6 | 5.7 (5.1-6.1) | 6,3 (5,5-7,3) | 4.5 (1.7-5.0)* | 2,2 (0,08-3,4)# | 0,03 |
| C18:2n6 | 0.04 (0.03-1.4) | 0,05 (0,05-4,7) | 1.9 (0.05-7.9) | 1,9 (0,05-5,2) | ns |
| C20:3n6 | 16.2 (9.3-21.1) | 13,5 (0,1-19,6) | 16.9 (6-19) | 8,5 (0,08-13,2) | ns |
| C20:4n6 | 0.15 (0.12-14) | 0,2 (0,14-13,2) | 0.14 (0.12-2.4) | 4,2 (0,16-14,1) | ns |
| AGPI n3 | 0.04 (0.03-0.05) | 0,05 (0,03-0,05) | 0.05 (0.03-0.05) | 0,05 (0,03-0,09) | ns |
| C18:3n3 | 0.04 (0.03-0.05) | 0,05 (0,03-0,05) | 0.05 (0.04-0.23) | 0,08 (0,05-0,81) | ns |
| C20:5n3 | 0.05 (0.04-13.7) | 0,07 (0,05-13,2) | 0.047 (0.04-2.1) | 3,7 (0,06-11,5) | ns |
| C22:6n3 | 0.16 (0.07-0.19) | 0,17 (0,15-0,19) | 0.1 (0.07-0.16) | 0,07 (0,004-0,1)# | 0,03 |
| AGCM/ACCL | 0.01 (0.004-0.5) | 0,027 (0,006-0,5) | 0.01 (0.004-0.6) | 0,6 (0,5-0,6)# | 0,03 |
| n3/n6 | * p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza | | | | |

B. Determinación de la composición lipídica de la membrana de eritrocitos de ratón.

Para comprobar si los MCT se incorporaban a las membranas celulares se evaluó mediante cromatografía el perfil de AG en membranas celulares eritrocitarias. Como puede observarse en la tabla 26, no aparecieron diferencias

en cuanto al perfil de AG entre los dos grupos dietéticos en general, ni sobre el porcentaje de AG de cadena media, en particular.

Tabla 26. Porcentaje de ácidos grasos en las membranas eritrocitarias

| Grupo | n6/MCT | n6 | # |
|------------------------------|------------------------|------------------------|----|
| AGCM (C8:0-C12:0) | 0,0012 (0-0,0014) | 0 (0-0,0022) | ns |
| ACCL (C14:0-24) | 0,25 (0,23-0,56) | 0,66 (0,35-0,72) | ns |
| AGMI n9 | 0,035 (0,032-0,072) | 0,097 (0,074-0,127) | ns |
| AGPI n6 | 0,19 (0,18-0,46) | 0,37 (0,24-0,52) | ns |
| AGPI n3 | 0,053 (0,024-0,154) | 0,025 (0,025-0,094) | ns |

* p≤0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza

9.1.5. Los animales KO que recibieron la dieta n6/MCT mostraron un menor porcentaje de IEL y LPL

Los animales colíticos que recibieron la dieta estándar presentaron un mayor porcentaje de IEL y LPL CD3⁺ respecto a sus homólogos ambientales (WT) y respecto a los animales KO de la dieta experimental (n6/MCT). Estos por su parte presentan menor porcentaje de IEL que sus controles. (Figura 37)

El análisis de las subpoblaciones de IEL muestra una disminución y un aumento de CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ respectivamente, en los animales KO de ambos grupos dietéticos respecto a sus controles. Esta alteración de las subpoblaciones se refleja en la disminución de la relación CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ en los animales KO que solo es significativa en el caso de la dieta n6/MCT. En los LPL se observa un aumento de CD3⁺CD4⁺ y de CD3⁺CD8⁺ en los animales KO respecto a los WT, siendo sólo significativa para CD3⁺CD8⁺ en la dieta n6/MCT y para CD3⁺CD4⁺ en la dieta n6. Las diferencias subpoblacionales entre dietas también se observan en los animales control (WT), la dieta n6 muestra mayor porcentaje de CD3⁺CD4⁺ que los WT de la dieta n6/MCT lo que también queda reflejado en la relación CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺. (Tabla 27)

9.1.6. Los animales que recibieron la dieta n6/MCT presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T apoptóticos.

Los animales KO a los que se suministró la dieta n6/MCT mostraron un mayor porcentaje de IEL CD3⁺ apoptóticos respecto a sus controles y respecto a los animales colíticos del grupo dietético n6. (Figura 38).

En el compartimiento de lámina propia, mientras los LPL de los animales KO de la dieta n6/MCT no muestran diferencias respecto a sus WT, los de la dieta n6 presentan un mayor porcentaje de apoptosis que sus controles (WT), y estos a su vez un menor porcentaje que los WT de la dieta n6/MCT. (Figura 38).

El porcentaje de apoptosis en las subpoblaciones de IEL sigue la misma dinámica que la población CD3⁺. Los animales KO de la dieta n6/MCT muestran mayor porcentaje de CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ apoptóticos que sus controles y que los IEL de las animales KO de la dieta n6. (Tabla 28).

En lámina propia se observa un aumento de la apoptosis en los CD3⁺CD4⁺ que solo es significativa en la dieta n6/MCT. (Tabla 28).

9.1.7. La determinación histológica de la apoptosis de los linfocitos de la mucosa colónica reproducen los resultados obtenidos mediante citometria de flujo.

Se cuantificó la apoptosis valorada por ISOL mediante el conteo de linfocitos apoptóticos respecto al total de CD3⁺ de un corte adyacente. Se observó que los animales KO de la dieta n6 mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) de la apoptosis valorada por ISOL respecto a sus WT y respecto a la dieta n6/MCT. (Figura 36).

9.1.8. Los animales KO que recibieron la dieta n6 expresan más TLR2 y TLR9.

Se observó un aumento de TLR2 y TLR9 en los animales KO de la dieta n6 respecto a los KO de la dieta n6/MCT y respecto a sus controles (WT). (Figura 39).

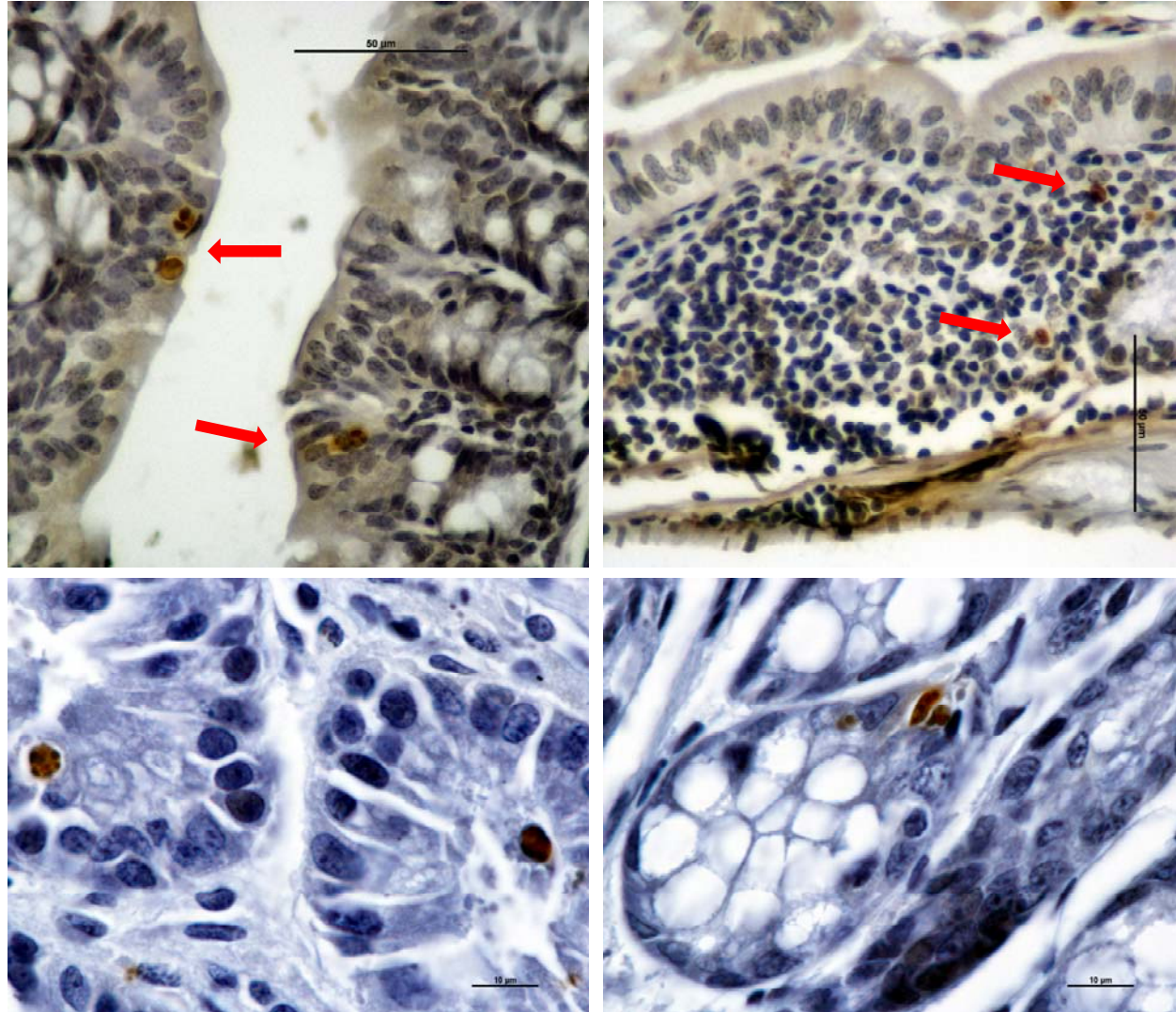


Figura 36. Evaluación histológica de la apoptosis mediante ISOL. A. Células epiteliales apoptóticas en el ápice glandular. B. Linfocitos apoptóticos en el infiltrado inflamatorio. C y D. Células epiteliales apoptóticas en la mitad y base de las criptas, se pueden observar la aparición de cuerpos apoptóticos.

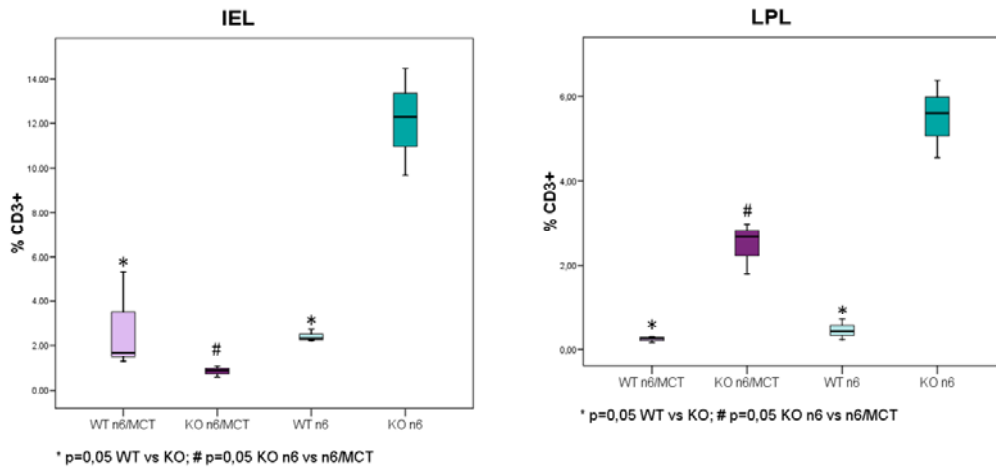


Figura 37. Porcentaje de IEL y LPL CD3⁺

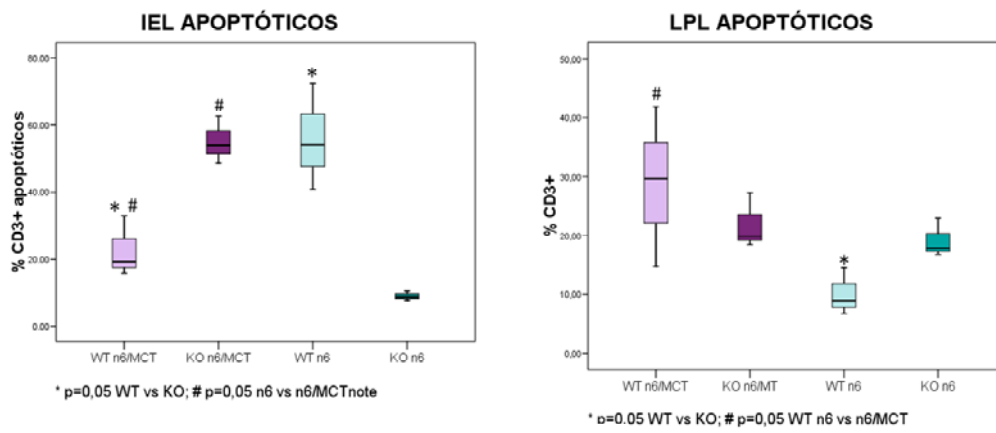


Figura 38. Porcentaje de IEL y LPL CD3⁺ apoptóticos

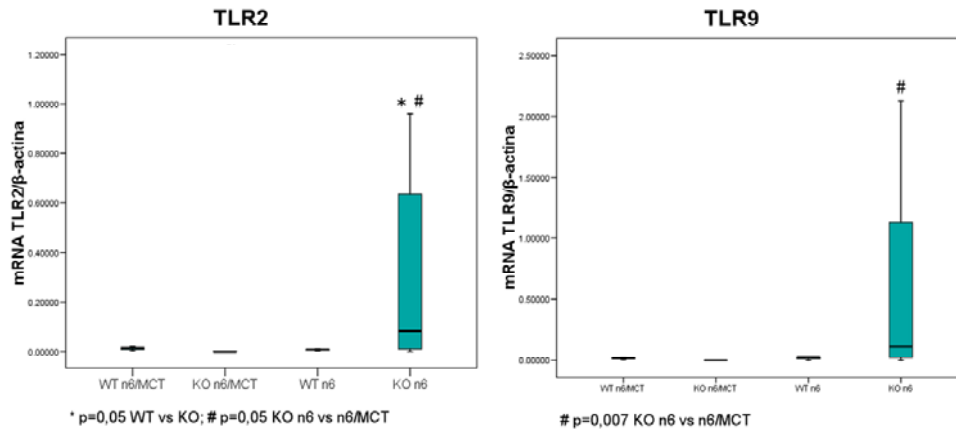


Figura 39. Expresión TLR2 y TLR9 valorada por PCR en tiempo real

Tabla 27. Porcentaje del subpoblaciones de IEL y LPL CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺.

| IEL | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------|
| | n6/MCT | | n6 | | # |
| | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3⁺CD4⁺ | 42 (38,2-46,1)* | 8,3 (6,1-19,7) | 36,7 (24,6-38,89)* | 14,1 (10,6-15,2) | ns |
| %CD3⁺CD8⁺ | 37,48 (26,45-38,39)* | 61,7 (54-63,8) | 31,8 (29-34,5) | 60,5 (60-64) | ns |
| %CD4⁺/%CD8⁺ | 1,1 (1,02-1,74)* | 0,13 (0,11-0,32) | 1 (0,7-1,3) | 0,22 (0,17-0,25) | ns |
| LPL | | | | | |
| | n6/MCT | | n6 | | # |
| | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3⁺CD4⁺ | 20,36 (17,12-39,3)# | 36 (19,6-71,4) | 59,8 (56,8-60,2)* | 80,7 (62,8-81,8) | 0,05 |
| %CD3⁺CD8⁺ | 34,25 (28,7-36,4)* | 50,7 (46,53-56,8) | 30,5 (21,9-35,9) | 83,1 (11,6-86,6) | ns |
| %CD4⁺/%CD8⁺ | 0,56 (0,50-1,37)# | 0,77 (0,39-1,26) | 1,96 (1,68-2,59) | 0,99 (0,93-5,43) | 0,05 |
| * p<0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza | | | | | |

Tabla 28. Porcentaje del subpoblaciones IEL y LPL CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ apoptóticas.

| IEL Apoptóticos | | | | | |
|--|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|----------|
| | n6/MCT | | n6 | | # |
| | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3⁺CD4⁺ apoptóticos | 24,3 (8,3-35,6) | 66,7 (50-100)* | 40 (11,7-42,8) | 8,7 (7,9-12,4)# | 0,05 |
| %CD3⁺CD8⁺ apoptóticos | 9,7 (5,7-22,9) | 46,9 (46,4-48)* | 32 (8,2-40,6) | 8,44 (7,4-9,1)# | 0,05 |
| LPL | | | | | |
| | n6/MCT | | n6 | | # |
| | WT | KO | WT | KO | |
| %CD3⁺CD4⁺ apoptóticos | 7,7 (6,8-10,6) | 47,22 (26,7-48,4)* | 12 (6,8-13,9) | 20 (13,3-30,8) | ns |
| %CD3⁺CD8⁺ apoptóticos | 28,4 (10,8-32,5) | 17 (16,7-20) | 5,3 (4,61-13,52) | 16 (11,1-21,7) | ns |
| * p<0,05; diferencias estadística entre WT y KO; # diferencias estadísticas entre WT o KO de distinto ambiente; ns = no significativo. Medianas más intervalo de confianza | | | | | |

DISCUSIÓN ESTUDIO 2

9.2. Discusión estudio 2: efecto de la dieta

Los ratones IL10 deficientes desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica con úlceras profundas, infiltración de células mononucleares y criptitis similar a la EC humana.¹⁷⁹ La lesión producida es menos extensa y grave en animales estabulados en condiciones SPF que en condiciones convencionales. Además, la cepa C57BL/6J muestra una inflamación intestinal más atenuada que en otras cepas de ratones deficientes para IL10. La elección de este modelo en lugar de modelos experimentales más agresivos, por ejemplo, de colitis inducida por TNBS, se debió a que datos previos sugerían que una lesión colónica más grave nos impediría revelar los efectos morfológicos inducidos por la dieta.^{133, 204}

El principal descubrimiento de este estudio es que la substitución parcial del ácido graso de la familia de n6, que es la fuente de grasa predominante en las dietas estándares para roedores, con MCT provoca una disminución de la incidencia de colitis en ratones deficientes para IL10. Además, los animales del grupo dietético n6/MCT mostraron una disminución de la lesión tanto a nivel macroscópico como histológico. Sin embargo, estos hallazgos no significan necesariamente que los animales con colitis del grupo n6/MCT tengan una inflamación colónica menos grave ya que sólo un animal desarrolló colitis.

A pesar de que los MCT tradicionalmente se han considerado como mera fuente de energía fácil de oxidar, datos recientes respaldan la idea de que estos ácidos grasos puedan tener propiedades inmunomoduladoras. Un ejemplo de ello lo constituye la administración intravenosa de emulsiones lipídicas que contienen MCT que consiguen modular la función de los neutrófilos de sangre periférica tanto *in vivo* como *in vitro*.^{205, 206} La administración enteral de MCT en ratas con diferentes patrones inflamatorios todavía son más interesantes. Diversos estudios indican que la administración oral de MCT en ratas atenúa la lesión hepática inducida por etanol.^{207, 208} Este efecto se asoció a una disminución del estrés oxidativo,^{206, 207} de la activación de NFκB,²⁰⁷ en la producción de TNFα,^{206, 209} y en la expresión de COX2 en hígado,^{210, 211} reduciendo, así mismo, la endotoxemia plasmática.²⁰⁹ Es más, los MCT fueron efectivos en la prevención

de la mortalidad, en el daño intestinal, en el daño hepático, y la expresión de CD14 fue deficiente en las células de Kupffer murinas estimulada con LPS.²⁰⁸ Otra prueba de la capacidad inmunomoduladora, es la reducción de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1 β) y el aumento de citoquinas antiinflamatorias (IL10) que se consigue con una dieta rica en MCT en comparación con dietas enriquecidas con ácidos grasos de las familias n6, n9 o n3 en ratones tratados con LPS.²¹¹

El efecto de los MCT en modelos experimentales de inflamación intestinal no ha sido muy evaluado. En un estudio donde se compara el efecto dietético de los MCT respecto cantidades equicalóricas de AGCL (principalmente AGPI n6) en ratas con ileitis inducida por TNBS se observó que los animales que recibieron MCT mostraban al octavo día de administración un baremo de lesión significativamente inferior, y los niveles de TNF α y leucotrieno B4 (LTB4) tendieron a ser inferiores respecto la dieta con AGCL.²¹² Otro estudio de los mismos autores, donde se compara la administración de MCT *vs* AGCL durante 3 días tras la inducción de ileitis mediante TNBS, no reveló diferencias en el baremo de lesión, pero tanto la actividad mieloperoxidasa como la expresión de IL8 estaban significativamente disminuidos en los animales tratados con MCT.²⁰³ Trabajos anteriores en nuestro laboratorio mostraron que los animales a los que se administró MCT, antes y después de la inducción de colitis por TNBS, redujeron significativamente, la relación LTB4/LTB5 intracolónico en comparación a la de los animales tratados con AGPI n6 y con valores similares a los de la dieta con aceite de pescado (AGPI n3). A pesar de la falta de diferencias en el baremo de lesión, hay que destacar el aumento de LTB5 intracolónico asociado a la presencia de MCT o AGPI con la dieta y que representa mucha menos bioactividad que el LTB4.¹³³

El presente estudio expande la investigación de los efectos inmunológicos de los MCT en la inflamación intestinal hacia el conocimiento del perfil fenotípico y la tasa de apoptosis de IEL y LPL, la producción *ex vivo* de un amplio espectro de citoquinas y la expresión de TLR. Sin embargo, como en el baremo de lesión,

el análisis puede sufrir un sesgo por el hecho de que sólo un animal del grupo n6/MCT desarrolló colitis.

En la mucosa rectal de pacientes EC se ha observado un aumento de células CD3⁺CD8⁺ así como un aumento de su actividad citolítica.^{213,193} De igual manera, los animales IL10 (-/-) tratados con la dieta n6 mostraron la proporción más elevada de IEL CD3⁺, la mayoría de los cuales eran CD8⁺. Esto se ha asociado a una mayor incidencia de colitis. Es más, experimentos de transferencia de células a ratones Rag2 (-/-) sugieren que la generación de colitis en ratones deficientes para IL10 es mediada por estas células.²¹⁴ Por el contrario, la administración de la dieta n6/MCT provocó un decremento importante de IEL CD3⁺, con valores tan bajos como los observados en ratones WT no colíticos. Este efecto parece deberse, al menos en parte, al incremento de la apoptosis de estas células.

Tal y como sucede en pacientes de IBD,^{215, 87} las citoquinas proinflamatorias se muestran aumentadas en ratones IL10 (-/-).²¹⁶ De estas citoquinas, el IFN γ es particularmente relevante al inicio de la colitis pero no en estadios más tardanos de ésta.^{217,218} En este estudio, la producción de IFN γ fue mucho superior en ratones IL10 (-/-) a los que se administró la dieta n6, y además su producción, al igual que la de la IL6, se mostró marcadamente disminuida en los animales con la dieta n6/MCT.

Los TLR son fundamentales para la correcta respuesta innata del huésped en la mucosa intestinal. En condiciones normales, las señales inducidas por TLR protegen la barrera intestinal y confieren tolerancia frente a microorganismos comensales. En la colitis, los TLR pueden inducir respuestas aberrantes y desmesuradas que van desde respuestas inflamatorias agudas hasta cronificar el proceso inflamatorio.⁵⁶ En este estudio, se ha valorado la expresión de TLR2 y TLR9 como biosensores de bacterias intestinales comensales, principalmente Gram positivas, en lugar de patógenos Gram negativos, ya que los animales estuvieron en condiciones SPF.⁴⁸ Además, las señales que desencadenan TLR2 y TLR9 solo se dan a través de la vía MyD88-NF κ B.²¹⁹ La expresión de TLR2 y TLR9

en animales IL10 (-/-) que recibieron la dieta n6 fue elevada, concordando con estudios recientes donde la señalización vía TLR es un punto clave en el desarrollo de colitis en ratones deficientes para IL10 pero no en otros modelos de inflamación intestinal.^{220,221} Los animales que recibieron la dieta n6/MCT mostraron una marcada disminución en la expresión de TLR2 y TLR9, pero no podemos discernir entre si esto es un mecanismo importante para la prevención de la colitis o un mero epifenómeno. No obstante, por los resultados del anterior estudio, el aumento en la expresión de TLR puede vincularse a un fortalecimiento de la función barrera.

Los mecanismos celulares y moleculares de las acciones inmunomoduladoras de los MCT están lejos de ser descritos de forma clara. Se ha sugerido que los MCT pueden influir sobre la fluidez de la membrana celular, la movilidad celular, el funcionamiento de receptores, activación de señales intracelulares de forma directa o a través de la formación de eicosanoides, expresión de genes y la diferenciación celular.²¹¹ Estudios *in vitro* con colonocitos de rata indican que los MCT son oxidados igual que el butirato,²²² sugiriendo que tienen efectos tróficos sobre el epitelio mejorando la función barrera de la mucosa. En ratas tratadas con LPS y alimentadas con MCT se observó un aumento en el tamaño de las células epiteliales, mayor número de células caliciformes y una disminución de la permeabilidad intestinal en comparación con animales a los que se administró aceite de maíz (AGPI n6).²¹¹ Además, la administración de MCT se asoció a una disminución significativa del contenido de bacterias fecales.²¹¹ Por otra parte, se ha observado que los MCT reducen la tasa de oxidación de AGCL en ratas y en humanos, de esta manera se favorece su incorporación a la membrana celular. Esto puede explicar el aumento del contenido de ácido linoleico que se observó en los animales que recibieron MCT.^{223,224}

Se puede argumentar que el efecto de reemplazar ácidos grasos n6 con MCT sobre el desarrollo de la colitis experimental se debe a la disminución de la fracción n6 más que a las acciones inmunomoduladoras de los MCT. Además, el ácido linoleico es el precursor del ácido araquidónico que a su vez es el

substrato de los eicosanoides proinflamatorios.²²⁵ El ácido araquidónico y otros derivados del ácido linoleico parecen ejercer otras acciones proinflamatorias independiente de eicosanoides.^{226,227,228} De hecho, se ha descrito que el ácido linoleico regula la producción de IL8 aumentándola en células intestinales de pacientes de EC *in vitro*, a través de distintos metabolitos de la vía del ácido araquidónico.^{229,230} Adicionalmente, algunos ensayos clínicos sugieren que dietas con bajo o muy bajo contenido en grasa son especialmente útiles en inducir la remisión en colitis activas,^{231,232,233,234} aunque no se han observado diferencias significativas en un metanálisis reciente.²³⁵ Tsujikawa y cols.¹⁴⁸ compararon una dieta enteral con bajo contenido en grasa respecto una dieta enriquecida con MCT en ratas a las que se indujo colitis o ileitis mediante TNBS. Ambas dietas fueron igualmente efectivas en la prevención de ileitis pero la dieta con MCT fue más efectiva que la dieta con bajo contenido en grasa en la prevención de colitis, sugiriendo que los MCT *per se* deben tener un efecto adicional al de reducir la fracción lipídica de la dieta.

En conclusión, el presente estudio muestra que el reemplazamiento parcial de ácidos grasos de la familia n6 mediante MCT disminuye la incidencia de colitis en un modelo espontáneo de inflamación intestinal y proporciona pruebas experimentales de un probable efecto terapéutico de los MCT en la EII humana. Estos resultados deben ser confirmados en otros modelos experimentales de inflamación intestinal con un "background" patogénico distinto. Particularmente, sería interesante valorar el papel de los MCT en modelos en los que se vea afectada la función barrera intestinal como el modelo de colitis inducida por DSS.

CONCLUSIONES ESTUDIO 2

9.3. Conclusiones estudio 2

1. La reducción del contenido de AGPI n6 de la dieta por la incorporación de MCT reduce la incidencia de colitis en ratones deficientes en IL10.
2. La manipulación lipídica de la dieta ejerce cambios en la composición de MCT a nivel de mucosa pero no alcanza una incorporación significativa en la membrana de los eritrocitos.
3. El grado de actividad de los IEL en los ratones IL10 (-/-) fue menor en el grupo n6/MCT.
4. De forma similar la actividad de los LPL fue reducida en el grupo n6/MCT
5. La expresión de TLR2 y TLR9 se asocia a un proceso inflamatorio de intensidad baja.

CONCLUSIONES GENERALES

10. Conclusiones generales

1. Los ratones deficientes para IL10 constituyen un excelente modelo para el estudio de la EI:
 - A. Es capaz de modificar la evolución inflamatoria intestinal ante un tratamiento nutricional.
 - B. Muestra una elevada sensibilidad a la interacción con el ambiente.
 - C. Reproduce cambios celulares y moleculares relacionados con la tolerancia e inflamación.

2. La reducción del contenido de AGPI n6 de la dieta por incorporación de MCT constituye una aproximación terapéutica preclínica que deberá contrastarse con otros modelos experimentales que reproduzcan otras alteraciones sobre la función barrera.

ANEXO

ANEXO

Los resultados de esta tesis están pendientes de publicación:

- Partial replacement of dietary n-6 fatty acids with medium-chain triglycerides decreases the incidence of spontaneous colitis in interleukin-10 deficient mice.
Josep Mañé, Elisabet Pedrosa, Violeta Lorén, Isabel Ojanguren, Lourdes Fluvià, Eduard Cabré, Gerhard Rogler, Miquel A. Gassull.
Journal of Nutrition 2008 Submitted

- Different control mechanisms involved in colitis development in IL10 deficient mice housed under SPF or conventional conditions.
Elisabet Pedrosa, Violeta Lorén, Isabel Ojanguren, Eduard Cabré, Gerhard Rogler, Miquel A. Gassull, Josep Mañé.
Journal of American Physiology 2008 Submitted

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ **Wilks.** Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. London Medical Times&Gazette 1859;2:264.
- ² **Baumgart DC,** Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. The Lancet 2007;369:1641-57.
- ³ **Truelove SC,** Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. Br Med J 1955;2:1041-8.
- ⁴ **Nos Mateu P.** Índices de actividad en la enfermedad inflamatoria intestinal. En Enfermedad Inflamatoria Intestinal. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ⁵ **Mendoza Hernández JL,** R. Lana Soto, M. Díaz-Rubio. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. En Enfermedad Inflamatoria Intestinal. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ⁶ **Anonymous.** Wilhem Fabry (1560-1624): the other fabricius. JAMA 1964;190:93.
- ⁷ **Crohn BB,** Ginzburg L, Oppenheimer GD. Landmark article Oct 15, 1932: regional ileitis: a pathological and clinical entity, by Burril B Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D Oppenheimer. JAMA 1984;251:73-9.
- ⁸ **Silverberg MS,** Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Can J Gastroenterol. 2005;19 Suppl A:5-36.
- ⁹ **Guindi M,** Riddell RH. Indeterminate colitis. J Clin Pathol 2004;57:1233-44.
- ¹⁰ **Wells AD,** McMillan I, Price AB, Ritchie JK, Nicholls RJ. Natural history of indeterminate colitis. Br J Surg 1991;78:179-81.
- ¹¹ **Warren BF,** Edwards CM, Travis SP. "Microscopic colitis": Classification and terminology. Histopathology 2002;40:374-6.
- ¹² **Chang F,** Deere H, Vu C. Atypical forms of microscopic colitis: Morphological features and review of the literature. Adv Anat Pathol 2005;12:203-11.

-
- ¹³ **Loftus Ev.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-17.
- ¹⁴ **Olafsdottir EJ,** Fluge G, Haug K. Chronic inflammatory bowel disease in children in western Norway. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989;8:454-8.
- ¹⁵ **Basu D,** López I, Kulkarni A, Sellin JH. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100(10):2254-61.
- ¹⁶ **Kugathasan S,** Judd RH, Hoffmann RG, Heineken JB, Telega G, Khan F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: A statewide population-based study. *J Pediatr* 2003;143:525-31.
- ¹⁷ **Niv Y,** Abuksis G, Fraser GM. Epidemiology of ulcerative colitis in Israel; survey of Israeli Kibbutz settlements. *Am J Gastroenterol* 2000;95:693-98.
- ¹⁸ **Hanauer SB.** Top-down versus step-up approaches to chronic inflammatory bowel disease: Presumed innocent or presumed guilty. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:493.
- ¹⁹ **Gassull MA.** New insights in nutritional therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Nutr* 2001;20 (Supl.1):113-21.
- ²⁰ **Munkholm P,** Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:360-2.
- ²¹ **Faubion WA Jr,** Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn W. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: A population-based study. *Gastroenterology* 2001;121:255-60.
- ²² **Lledó Matoses S,** J. García Armengol. Tratamiento quirúrgico de la Colitis Ulcerosa. En *Enfermedad inflamatoria intestinal*. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ²³ **Rotholtz N,** M. Bun. Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Crohn: cuándo operar y cómo. En *Enfermedad inflamatoria intestinal*. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.

-
- ²⁴ **Gionchetti P**, F. Rizello, M. Campieri. Reservoiritis. En Enfermedad inflamatoria intestinal. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ²⁵ **M. Minués Pérez**, A. Benages Martínez, F. Mora Miguel. Megacolon tóxico y colitis fulminante. En Enfermedad inflamatoria intestinal. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ²⁶ **Gassull MA**, E. Cabré. Nutrición y enfermedad inflamatoria intestinal. En Enfermedad inflamatoria intestinal. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ²⁷ **Eaden JA**, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cáncer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut* 2001;48(4):526-35.
- ²⁸ **Velayos FS**, Loftus EV Jr, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* 2006;130:1941-9.
- ²⁹ **Reinhard Pabst and Hermann J. Rothkötter**. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. *Immune Mechanisms in Inflammatory Bowel Disease*. Richard S. Blumberg, Markus F. Neurath. 2006. ISBN: 0-387-30831-8.
- ³⁰ **Gassull MA**. Review article: the intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24 Suppl 3:90-5.
- ³¹ **Elpick DA**, YR Mahida. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005;54:1802-9.
- ³² **Shi J**, Aono S., Lu W., Ouellette A.J., Hu X., Ji Y., Wang L., Lenz S., van Ginkel FW., Liles M., Dyskstra C., Morrison EE., Elson C.O. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: Regulation of IL1 β secretion. *The Journal of Immunology*, 2007, 179:1245-1253.
- ³³ **Selsted ME**, Oullette AJ. Mammalian defesins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005;6:551-7.
- ³⁴ **Ley Re**, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-48
- ³⁵ **O'Hara Ann M**, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO* 2006;7:688-93.

-
- ³⁶ **Sartor RB.** Microbial Influences in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2008;134:577-594.
- ³⁷ **Sonnenburg JL,** Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weathford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan Foraging in vivo by a Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science* 2007;307:1955-9.
- ³⁸ **Hooper LV,** Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal Host-Microbial Relationships in the intestine. *Science* 2001;291:881-4.
- ³⁹ **Rakoff-Nahoum S,** Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of Commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal Homeostasis. *Cell* 2004;118:671-4.
- ⁴⁰ **Cario E,** Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):224-38.
- ⁴¹ **Swidsinski A,** Loening-Baucke V, Lochs H, Hale L.P. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11(8):1131-1140.
- ⁴² **Schleimer RP,** Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: At the interface of innate and adaptativa immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1279-84.
- ⁴³ **Bischoff SC,** Sigrid Krämer. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. *Immunological Reviews* 2007;217:329-37.
- ⁴⁴ **Brandtzaeg P,** Bosnes, T.S. Halstensen, H. Scott, L.M. Sollid, K.N. Valnes. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and ar often CD45/UCHL-1positive. *Scand J Immunol* 1989;30:123-8.
- ⁴⁵ **Hayday, A., E.** Theodoridis, E. Ramsburg, J. Shires. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Thrid way in immunology. *Nat Immunol* 2001;2;997-1003.
- ⁴⁶ **Chen Y,** Chou K, Fuchs E, Harvan WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *PNAS* 2002;99:14338-43.
- ⁴⁷ **Cario E.** Therapeutic Impact of Toll-like receptors on inflammatory bowel disease: a multiple-edge sword. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:411-21.
- ⁴⁸ **Beutler B.** Innate Immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 2004;40:845-59.

-
- ⁴⁹ **Hansson GK**, Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(6): 1085-7.
- ⁵⁰ **Steinman RM**, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus; the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* 2002;99:351-8.
- ⁵¹ **West MA**, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. Enhanced dendritic cell Antigen capture via Toll-like Receptor-Induced Actin remodeling. *Science* 2004.305;1153-7.
- ⁵² **Lanning DK**, Rhee KJ, Knight KL. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends in Immunology* 2005;26:419-25.
- ⁵³ **Wolowczuk I**, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. Feeding our Immune System: Impact on Metabolism. *Clinical and Developmental Immunology* 2008;639803.
- ⁵⁴ **Akira S**, Takeda K. Toll-like Receptor signalling. *Nature Reviews.* 2004;4:499-511.
- ⁵⁵ **Sonkoly E**, Stahle M, Pivarcsi A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in Cancer Biology* 2008;18:131-40.
- ⁵⁶ **Cario E**. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54:1182-93.
- ⁵⁷ **Ian R. Sanderson**, Walker WA. TLR in the gut. The role of TLR/Nods in intestinal development and homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G6-10.
- ⁵⁸ **Andoh A**, Ogawa A, Bamba S, Fujiyama Y. Interaction between interleukin-17-producing CD4+T cells and colonic subepithelial myofibroblasts: what are they doing in mucosal inflammation?. *J Gastroenterol* 2007;42:29-33.
- ⁵⁹ **Benko S**, Magyarics Z, Szabó A, Rajnavölgyi E. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biol Chem* 2008;389:469-85.
- ⁶⁰ **Hart AL**, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602-9.
- ⁶¹ **Tam MA**, Sundquist M, Wick MKJ. MyD88 and IFN $\alpha\beta$ differentially control maturation of bystander but not Salmonella-associated dendritic cells or CD11c^{int}CD11b⁺ cells during infection. *Cellula Microbiology* 2008;10 :1517-29.
- ⁶² **Makita S**, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M. CD4+CD25bright T cells in human

intestinal *lámina propria* as regulatory cells. *The Journal of Immunology* 2004;173:3119-30.

⁶³ **Ten Hove T**, The Olle F, Berkhout M, Bruggeman JP, Vyth-Dreese FA, Slors JF, Van Deventer SJ, Te Velde AA. Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Journal of Leukocyte Biology* 2004;75:1010-5.

⁶⁴ **Suzuki K**, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, Fagarasan S. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *PNAs* 2004;101:1981-6.

⁶⁵ **Caligiuri MA**. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-9.

⁶⁶ **Luci C.**, Tomasello E. Natural Killer cells: detectors of stress. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008;40:2335-40.

⁶⁷ **Keilbaugh SA**, Shin ME, Banchereau RF, McVay LD, Boyko N, Artis D, Cebra JJ, Wu GD. Activation of RegIII β/γ and interferon γ expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonization of the gut. *Gut* 2005;54:623-29.

⁶⁸ **Wingender G**, Kronenberg M. Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G1-8.

⁶⁹ **Kaser A**, Nieuwenhuis EE, Strober W, Mayer L, Fuss I, Colgan S, Blumberg RS. Natural Killer t cells in Mucosal homeostasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004;1029:154-68.

⁷⁰ **O’Keeffe J**, Moran AP. Conventional, Regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2008;13:1-19.

⁷¹ **Tesmer LA**, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunological reviews* 2008;223:87-113.

⁷² **Wynn TA**. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.

⁷³ **Novak N**, Thomas Bieber. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin. Immunol.* 2008;121(Suppl2):S370-4.

⁷⁴ **Sato A**, A. Iwasaki. Peyer’s patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2005;62:1333-8.

⁷⁵ **Cho JH**, Weaver CT. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2007;133:1327-39.

-
- ⁷⁶ **Kastelein RA**, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and Biology of IL23 and IL27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol* 2007;25:221-42.
- ⁷⁷ **Maloy KJ**. The interleukin-23/Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *Journal of internal Medicine* 2008;263:584-90.
- ⁷⁸ **Kondo T**, Takata H, Takiguchi M. Functional expresión of chemokine receptor CCR6 on human effector memory CD8+ T cells. *Eur J. Immunol.* 2007;37:54-65.
- ⁷⁹ **Fillatreau S**, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nature Reviews* 2008;8:486-7.
- ⁸⁰ **Fantini MC**, D. Fina, F. Pallone. Inmunología de las enfermedades inflamatorias intestinales. En *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. 2006 Madrid.
- ⁸¹ **Sojka DK**, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression –a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008;124:13-22.
- ⁸² **Chen Y**, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones included by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237-40.
- ⁸³ **Stockinger B**, Christine Bourgeois, George Kassiotis. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunological Reviews* 2006;211:39-48.
- ⁸⁴ **Lanzavecchia A**, Nadia Bernasconi, Elisabetta Traggiai, Claudia R. Ruprecht, Davide Corti, Federica Sallusto. Understanding and making use of human memory B cells. *Immunological Reviews* 2006;211:203-9.
- ⁸⁵ **Cohen JJ**. Apoptosis. *Immunol. Today* 1993;14:126-30.
- ⁸⁶ **Wills-Karp M**, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic diseases: Revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev* 2001;1:69-75.
- ⁸⁷ **Baumgart DC**, Simon R Carding. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*.2007;369:1627-40.
- ⁸⁸ **Taurog JD**, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;180:2359-64.
- ⁸⁹ **Swidsinski A**, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.

- ⁹⁰ **Rutgeerts P**, Van Assche G, Vermeire S, D'Haens g, Baert f, Noman M, et al. Ornidazole for prophylaxis G of postoperative Crohn's disease recurrence: A randomized, doublé blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128:856-61.
- ⁹¹ **Shih DQ**, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:390-400.
- ⁹² **Bibiloni R.**, Mangold M., Madsen K L, Fedorak RN, Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55:1141-49.
- ⁹³ **Swidsinski A.**, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial Organization and composition of the mucosal flora in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:3380-89.
- ⁹⁴ **Galvez J**, Rodríguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005;49:601-8.
- ⁹⁵ **van Nuenen MHMC**, de Light RA, Doornbos RP, van der Woude JC, Kuipers EJ, Venema K. The influence of microbial metabolitos on human intestinal epithelial cells and macrophages in vitro. *Immunology and Medical Microbiology* 2005;45:183-9.
- ⁹⁶ **Duchmann R**, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, MeyerzumBuschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but it is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55.
- ⁹⁷ **Abreu MT**, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005;174:4453-60.
- ⁹⁸ **Van Liembergen J**, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J. Genetics of the innate immune response in inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:338-55.
- ⁹⁹ **Hugot JP**, Chamailard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- ¹⁰⁰ **Weersma RK**, H. M. Van Dullemen, G. Van Der Steege, I. M. Nolte, J. H. Kleibeuker, G. Dijkstra. Review article: inflammatory bowel disease and genetics. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26 Suppl2:57-65.
- ¹⁰¹ **Shi J**. Defensins and Paneth Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1284-92.

-
- ¹⁰² **Henckaerts L**, S. Vermeire. Genética de la enfermedad inflamatoria intestinal. En *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. III Edición. Miquel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. Madrid 2006.
- ¹⁰³ **Ferguson LR**, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutation Research* 2007;622:70-83.
- ¹⁰⁴ **Jurjus AR**, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 50:81-92.
- ¹⁰⁵ **Kaufmann HJ**, Taubin HL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 1987;107:513-6.
- ¹⁰⁶ **Peltekova VD**, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variations of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-5.
- ¹⁰⁷ **Smithson JE**, Campbell A, Andrews JM, Milton JD, Pigott R and Jewell DP. Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut* 1997;40:234-40.
- ¹⁰⁸ **Buisine MP**, Desreumaux P, Leteurtre E, Copin M-C, Colomber J-F, Porchet N, Aubert J-P. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 2001;49:544-551.
- ¹⁰⁹ **Leon F**, Smythies LE, Smith PD, Kelsall BL Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol*. 2006;579:117-32.
- ¹¹⁰ **Kobayashi T**, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive Increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory Bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:837-46.
- ¹¹¹ **Berndt U**, Bartsch S, Philipsen L, Danese S, Wiedenmann B, Dignass AU, Hämmerle M, Sturm A. Proteomic Analysis of the Inflamed Intestinal Mucosa reveals distinctive Immune response profiles in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J Immunol* 2007;179:295-30.
- ¹¹² **Claesson MH**, Bregenholt S, Bonhagen K, Thoma S, Moller P, Grusby MJ, Leithauser F, Nissen MH, Reimann J. Colitis-inducing potency of CD4+T cells in immunodeficient adoptive hosts depends on their state of activation, IL12 responsiveness, and CD45RB surface phenotype. *J Immunol* 1999;162:3702-10.
- ¹¹³ **Mizoguchi A**, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2008;43:1-17.

-
- ¹¹⁴ **Duerr RH**, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as a inflammatory bowel disease gene. *Science* published on line Oct 26, 2006;314:1461-3.
- ¹¹⁵ **Pasare C**, Medzhitov R. Toll Pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated supresión by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033-36.
- ¹¹⁶ **Baumgart DC**, Metzke D, Wiedenmann B, Dignass AU. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 2005;54:228-36.
- ¹¹⁷ **Nakazawa A**, Dotan I, Briones J., et al. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126:1347-57.
- ¹¹⁸ **van Tol EA**, Verspaget HW, Peña AS, Lamers CB. Normal inflammatory bowel disease mucosa conceals in natural killer cell activity. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:999-1005.
- ¹¹⁹ **Egawa S**, Hiwatshi N. Natural Killer cell activity in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Lab Immunol*. 1986;20:187-92.
- ¹²⁰ **Giacomelli R**, Passacantando A, Frieri G, Parzanese I, D'Alò S, Vernia P, Pimpo MT, Petrucci C, Caprilli R, Cifone MG, Tonietti G. Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol* 1999;115:72-7.
- ¹²¹ **Nowak M**, Stein-Streilein J. Invariant NKT Cells and Tolerance. *International Reviews of Immunology* 2007;26:95-119.
- ¹²² **Meyer EH**, DeKruyff RH, Umetsu DT. T Cells and NKT Cells in the Pathogenesis of Asthma. *Annu. Rev. Med.* 2008. 59:281–92.
- ¹²³ **van Dieren JM**, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, Nieuwenhuis EE. Roles of CD1d-Restricted NKT Cells in the Intestine Inflamm Bowel Dis 2007;13;1146-52.
- ¹²⁴ **Neuman MG**. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translational Research* 2007;149:173-86.
- ¹²⁵ **Fantini MC**, Monteleone G, MacDonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1419-23.
- ¹²⁶ **Sekut L**, Connolly K. AntiTNF-alpha agents in the treatment of inflammation. *Expert Opin Investig Drugs*. 1998;11:1825-39.

-
- ¹²⁷ **Mangan PR**, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-4.
- ¹²⁸ **Ettinger R**, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL21 in regulating Bcell function in health and disease. *Immunological Reviews* 2008;223:60-86.
- ¹²⁹ **Mannon PJ**, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
- ¹³⁰ **Clarke JO**, Mullin GE. A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. *Nutrition in Clinical Practice* 2008;23:49-62.
- ¹³¹ **Kontogianni MD**, Zampelas A, Tsigos C. Nutrition and inflammatory load *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1083:214-38.
- ¹³² **Cordain L**, Eaton SB, Sebastian A, Mann L, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, BrandMiller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21th century. *Am Clin Nutr.* 2005;81;341-54.
- ¹³³ **Gassull MA**, Mañé J, Pedrosa E, Cabré E. Macronutrients and Bioactive molecules: Is there a specific role in the management of Inflammatory Bowel Diseases? *JPEN* 2005;29:S179-S183.
- ¹³⁴ **Meister D**, Ghosh S. Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ cultura: Differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease. *World J Gastroenrol* 2005;11:7466-72.
- ¹³⁵ **Wild GE**, Drozdowski L, Tartaglia C, Clandinin MT, Thomson AB. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease -from molecular to the integrative to the clininal. *World J Gastroenterol* 2007;13:1-7.
- ¹³⁶ **Ma X**, M. Torbenson, A.R.A. Hamad, M.J.Soloski, Z. Li. High-fat diet modulates non-C1d-restricted natural killer T cells and regulatory T cells in mouse colon and exacerbates experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2007;151:130-8.
- ¹³⁷ **Lee JY**, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibit toll-like receptor 2 dimerized with toll-like receptor 6 or 1. *The J Biol Chem* 2004;279:16971-9.
- ¹³⁸ **Denys A**, Hichami A, Khan NA. N-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-KappaB signaling pathway. *J Lipid Res* 2005;46:752-8.
- ¹³⁹ **Shah YM**, Morimura K, Gonzalez FJ. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophages suppresses experimentally induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292;G657-66.

-
- ¹⁴⁰ **Shah YM**, Morimura K, Gonzalez FJ. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in macrophage suppresses Experimentally-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G657-666.
- ¹⁴¹ **Bassaganya-Riera J**, Hontecillas R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clin Nutr* 2006;25:454-65.
- ¹⁴² **Ramakers JD**, Mensink RP, Schaart G, Plat J. Arachidonic acid but not eicosapentaenoic acid (EPA) and oleic acid activates NF-KB and Elevates ICAM-1 expression in Caco-2 cells. *Lipids* 2007;42:687-98.
- ¹⁴³ **Tedelink S**, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;28:2826-2832.
- ¹⁴⁴ **Scheppach W**. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci*. 1996;41(11):2254-9.
- ¹⁴⁵ **Butzner JD**, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*. 1996;38:568-73.
- ¹⁴⁶ **Kono H**, Fujii H, Asakawa M, Maki A, Amemiya H, Hirai Y, Matsuda M, Yamamoto M. Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:1081-9.
- ¹⁴⁷ **Tsujikawa T**, Ohta N, Nakamura T, Satoh J, Uda K, Ihara T, Okamoto T, Araki Y, Andoh A, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. Medium-chain triglycerides modulate ileitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Dec;14:1166-72.
- ¹⁴⁸ **Tsujikawa T**, Ohta N, Nakamura T, Yasuoka T, Satoh J, Fukunaga T, Itohi A, Uda K, Ihara T, Andoh A, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. Medium-chain triglyceride-rich enteral nutrition is more effective than low-fat enteral nutrition in rat colitis, but is equal in enteritis. *J Gastroenterol*. 2001;36:673-80.
- ¹⁴⁹ **Hoshimoto A**, Suzuki Y, Katsuno T, Nakajima H, Saito Y. Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Br J Pharmacol*. 2002;136:280-6.
- ¹⁵⁰ **Camuesco D**, Gálvez J, Nieto A, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, Xaus J, Zarzuelo A. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in Rats with DSS-induced colitis. *J. Nutr* 2005;135:687-94.

-
- ¹⁵¹ **Besler HT**, Grimble RF. Comparison of the modulatory influence of maize and olive oils and butter on metabolic response to endotoxin in rats. *Clin Sci*. 1995;88:59-66.
- ¹⁵² **Sanderson P**, Yaqoob P, Calder PC. Effect of dietary lipid manipulation upon graft vs host and host vs graft responses in the rat. *Cell Immunol* 1995;164:240-7.
- ¹⁵³ **Yaqoob P**. Monounsaturated fatty acids and immune function. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(4):453-65.
- ¹⁵⁴ **Waitzberg DL**, Lotierzo PH, Logullo AF, Torrinhas RS, Pereira CC, Meier R. Parenteral lipid emulsions and phagocytic systems. *Br J Nutr*. 2002;87 Suppl 1:S49-57.
- ¹⁵⁵ **Nieto N**, Mesa MD, López-Pedrosa JM, Torres MI, Ríos A, Suárez MD, Gil A. Contribution of Polyunsaturated fatty acids to intestinal repair in protein-energy malnutrition. *Digestive Diseases and Sciences* 2007;52:1485-96.
- ¹⁵⁶ **Bjorkkjaer T**, Brun JG, Valen M, Arslan G, Lind R, Brunborg LA, Berstad A, Froyland L. Short-term duodenal seal oil administration normalised n-6 to n-3 fatty acid ratio in rectal mucosa and ameliorated bodily pain in patients with inflammatory bowel disease. *Lipids Health Dis* 2006;20:5-6.
- ¹⁵⁷ **Aldhous MC**, Meister D, Ghosh S. Modification of enteral diets in inflammatory bowel disease. *Proc Nutr Soc* 2001;60:457-461.
- ¹⁵⁸ **Gil A**. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 2002;56:388-96.
- ¹⁵⁹ **Calder PC**, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002;87:S31-S48.
- ¹⁶⁰ **Avula CP**, Zaman AK, Lawrence R, Fernández G. Induction of apoptotic mediators in Balb/c splenic lymphocytes by dietary n-3 and n-6 fatty lipids. *Lipids* 1999;34:921-7.
- ¹⁶¹ **Harbige LS**. Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 2003;38:323-41.
- ¹⁶² **Erickson KL**, Adams DA, McNeil CJ. Dietary lipid modulation of the immune responsiveness. *Lipids* 1983;18:468-74.
- ¹⁶³ **Elson CO**, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 1995; 109:1344-67.
- ¹⁶⁴ **Wirtz S**, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1073-83.

- ¹⁶⁵ **Fiorucci S**, Distrutti E, Mencarelli A, Barbanti M, Palazzini E, Morelli A. Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocyte reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion* 2002; 66:246-56.
- ¹⁶⁶ **Kwon KH**, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:395-406.
- ¹⁶⁷ **Andoh A**, Tsujikawa T, Ishizuka I, et al. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 2003; 12:721-5.
- ¹⁶⁸ **Triantafyllidis JK**, Papalois AE, Parisi A, et al. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6843-7.
- ¹⁶⁹ **Tobi M**, Chintalapani S, Kithier K, Clapp N. Gastrointestinal tract antigenic profile of cotton-top tamarin, *Saguinus oedipus*, is similar to that of humans with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45:2290-97.
- ¹⁷⁰ **Elson CO**, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews* 2005 ;206 :260-76.
- ¹⁷¹ **Pizarro TT**, Arseneau KO, Cominelli F. Lessons from genetically engineered animal models XI. Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *Am J Physiol* 2000; 278:G665-9.
- ¹⁷² **Kennedy RJ**, Hoper M, Deodhar K, Erwin PJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *British Journal of Surgery* 2000;87:1346-51.
- ¹⁷³ **Kullberg MC**, Ward JM, Gorelick PL, Caspar P, Hieny S, Cheever A, Jankovic D, Sher A. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL10)-deficient mice through an IL12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun*. 1998;66:5157-66.
- ¹⁷⁴ **Cario E**, Podolsky DK. Intestinal epithelial Tolerance versus Intolerance of commensals. *Molecular Immunology* 2005;42:887-93.
- ¹⁷⁵ **Edelblum KL**, Yang F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:413-424.

-
- ¹⁷⁶ **Fang Y**, Sharp GC, Braley-Mullen H. Interleukin-10 promotes resolution of granulomatous Experimental Autoimmune Thyroiditis. *The American Journal of Pathology*. 2008;172:1591-1602.
- ¹⁷⁷ **Itoh J**, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut*. 2001;49:35-41.
- ¹⁷⁸ **Strauch UG**, Obermeier F, Grunwald N, Güster S, Dunger N, Schultz M, Griese DP, Mähler M, Schölmerich J, Rath HC. Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from transfer model of colitis. *Gut* 2005;54:1546-52.
- ¹⁷⁹ **Kühn R**, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263-74.
- ¹⁸⁰ **Fernández Bañares F**, Cabré E, González-Huix F, Gassull MA. Enteral nutrition as primary therapy in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35(Suppl1):S55-9.
- ¹⁸¹ **Gorard DA**. Enteral nutrition in Crohn's disease: fat in the formula. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:115-8.
- ¹⁸² **Shoda R**, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn's disease in Japan: Increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn's disease in Japan. *Am J Clin Nutr* 1996; 63:741-745.
- ¹⁸³ **Sakamoto N**, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: A multicenter, case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11:154-163.
- ¹⁸⁴ **Wanten GJ**, Naber AH. Cellular and physiological effects of medium-chain fatty acids. *Mini Rev Medic Chem* 2004; 4:847-57.
- ¹⁸⁵ **Khoshoo V**, Reifen R, Neuman MG, Griffiths A, Pencharz PB. Effect of low- and high-fat, peptide based diets on body composition and disease activity in adolescents with active Crohn's disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1996; 20:401-5.
- ¹⁸⁶ **Sakurai T**, Matsui T, Yao T, Takagi Y, Hirai F, Aoyagi K et al. Short-term efficacy of enteral nutrition in the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled trial comparing nutrient formulas. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26:98-103.
- ¹⁸⁷ **Madsen KL**, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-14.

- ¹⁸⁸ **Das G**, Augustine MM, Das J, Bottomly K, Ray P, Ray A. An important regulatory role for CD4+CD8 alpha alpha T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5324-9.
- ¹⁸⁹ **Lepage G**, Roy CC. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res* 1984;25:1391-6.
- ¹⁹⁰ **Dodds E**, McCoy MR, Rea LR, Kennish JM. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs electron impact mass spectrometry. *Lipids*. 2005;40:419-28.
- ¹⁹¹ **Sugahara S**, Shimizu T, Yoshida Y, Aiba T, Yamagiwa S, Asakura H, Abo T. Extrathymic derivation of gut lymphocytes in parabiotic mice. *Immunology* 1999;96:57-65.
- ¹⁹² **Van Damme N**, Baeten D, De Vos M, Demetter P, Elewaut D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, De Keyser F. Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. *Journal of Immunological Methods* 2000;236:27-35.
- ¹⁹³ **Sydona BC**, MacFarlane SM, Walker JW, Dmytrash AL, Churchill TA, Doyle J, Fedorak RN. Epithelial Barrier disruption allows nondisease-causing bacteria to initiate and sustain IBD in the IL10 gene-deficient mouse. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:947-54.
- ¹⁹⁴ **Nüssler NC**, Stange B, Hoffman RA, Schraut WH, Bauer AJ, Neuhaus P. Enhanced cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:218-24.
- ¹⁹⁵ **Inagaki-Ohara K**, Chinen T, Matsuzaki G, Sasaki A, Sakamoto Y, Hiromatsu K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yoshimura A. Mucosal T Cells Bearing TCR $\gamma\delta$ play a protective role in intestinal inflammation. *The Journal of Immunology* 2004;173:1390-8.
- ¹⁹⁶ **Sears CL**. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions V. Assault of the tight junction by enteric pathogens. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1129-34.
- ¹⁹⁷ **Zhou P**, Streutker C, Borojevic R, Wang Y, Croitoru K. IL10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol* 2004;287:G599-G604.
- ¹⁹⁸ **Brimmes J**, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lámina propria of patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol* 2005;174:5814-22.

-
- ¹⁹⁹ **Nenci A.**, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007;446:557-61.
- ²⁰⁰ **Cario E.**, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007;132:1359-74.
- ²⁰¹ **Araki A.**, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol* 2005;40:16-23.
- ²⁰² **Wang XP.**, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, Proksch E. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2004;123:124-31.
- ²⁰³ **Gibson DL.**, Ma C, Bergstrom SB, Huang JT, Man C, Wallace BA. MyD88 signalling plays a critical role in host defence by controlling pathogen burden and promoting epithelial cell homeostasis during *Citobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol* 2008;10:618-31.
- ²⁰⁴ **Ohta N.**, Tsujikawa T, Nakamura T, Andoh A, Sasaki M, Bamba T. A comparison of the effects of medium- and long-chain triglycerids on neutrophil stimulation in experimental ileitis. *J Gastroenterol* 2003;38:127-33.
- ²⁰⁵ **Wanten GJ.**, Geijtenbeek TBH, Raymakers RAP, van Kooyk Y, Roos D, Jansen JBMT et al. Medium-chain triglyceride-containing lipid emulsions increase human neutrophil β_2 integrin expression, adhesion, and degranulation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000;24:228-33.
- ²⁰⁶ **Wanten GJ.**, Curfs JH, Meis JF, Naber AH. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* by human neutrophils after exposure to structurally different lipid emulsions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;25:9-13.
- ²⁰⁷ **Kono H.**, Enomoto N, Connor HD, Wheeler MD, Bradford BU, Rivera CL. Medium-chain triglycerides inhibit free radical formation and TNF α production in rats given enteral ethanol. *Am J Physiol* 2000;278:G467-76.
- ²⁰⁸ **Nanji AA.**, Yang EK, Fogt F, Sadrzadesh SMH, Dannenberg AJ. Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established experimental alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1694-1700.
- ²⁰⁹ **Nanji AA.**, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:638-44.

-
- ²¹⁰ **Nanji AA**, Zakim D, Rahemtulla A, Daly T, Miao L, Zhao S. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* 1997;26:1538-45.
- ²¹¹ **Nanji AA**, Rahemtulla A, Daly T, Khwaja S, Miao LL, Zhao SP. Cholesterol supplementation prevents necrosis and inflammation but enhances fibrosis in alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1997;26:90-7.
- ²¹² **Kono H**, Fujii H, Asakawa M, Yamamoto M, Matsuda M, Maki. Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Ann Surg* 2003;237:246-55.
- ²¹³ **Caballero T**, Noguera F, Medina MT, Caracul MD, de Sola C, Martínez-Salmerón FJ. Intraepithelial and lamina propria leucocyte subsets in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical study of colon and rectal biopsy specimens. *Gut* 1995;48:743-48.
- ²¹⁴ **Davidson NJ**, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes LA, Kühn R, Müller W. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:241-51.
- ²¹⁵ **Podolsky DK**. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
- ²¹⁶ **Rennick DM**, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models XII. IL10-deficient (IL10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol* 2000;278:G829-33.
- ²¹⁷ **Berg DJ**, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+ Th1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010-20.
- ²¹⁸ **Davidson NJ**, Hudak SA, Lesley RE, Menon S, Leach MW, Rennick DM. IL12, but not IFN- γ , plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL10-deficient mice. *J Immunol* 1998;161:3143-49.
- ²¹⁹ **Akira S**, Takeda K. Toll-like receptors signaling. *Nature Rev Immunol* 2004;4:499-511.
- ²²⁰ **Rakkoff-Nahoum S**, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006;25:319-29.
- ²²¹ **Karrasch T**, Kim JS, Muhlbauer M, Magness ST, Jobin C. Gnotobiotic IL10^{-/-}; NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis. *J Immunol* 2007; 178:6522-32.

-
- ²²² **Jorgensen JR**, Clausen MR, Mortensen PB. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague- Dawley rat colonocytes. *Gut* 1997; 40:400-405.
- ²²³ **Periago JL**, Suárez MD, Pita ML. Effect of dietary olive oil, corn oil, and medium-chain triglycerides on the lipid composition of rat red blood cell membranes. *J Nutr* 1990; 120:986-94.
- ²²⁴ **Rodriguez M**, Funke S, Fink M, Demmelmair H, Turini M, Crozier G, Koletzko B. Plasma fatty acids and [¹³C]linoleic acid metabolism in preterm infants fed a formula with medium-chain triglycerides. *J Lipid Res* 2003; 44:41-8.
- ²²⁵ **Samuelsson B**. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220:568-75.
- ²²⁶ **Moghaddami N**, Costabile M, Grover PK, Jersmann HP, Huang ZH, Hii CS et al. Unique effect of arachidonic acid on human neutrophil TNF receptor expression: up-regulation involving protein kinase C, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase A2. *J Immunol* 2003; 171:2616-24.
- ²²⁷ **Shaikh SR**, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:1277-89.
- ²²⁸ **Kapoor R**, Huang YS. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr Pharm Biotechnol* 2006; 7:531-4.
- ²²⁹ **Alzoughaibi MA**, Walsh SW, Willey A, Fowler AA, Graham MF. Linoleic acid, but not oleic acid, upregulates the production of interleukin-8 by human intestinal smooth muscle cells isolated from patients with Crohn's disease. *Clin Nutr* 2003; 22:529-35.
- ²³⁰ **Alzoughaibi MA**, Walsh SW, Willey A, Yager DR, Fowler AA, Graham MF. Linoleic acid induces interleukin-8 production by Crohn's human intestinal smooth muscle cells via arachidonic acid metabolites. *Am J Physiol* 2004; 286: G528-G537.
- ²³¹ **Middleton SJ**, Rucker JT, Kirby GA, Riordan AM, Hunter JO. Long-chain triglycerides reduce the efficacy of enteral feeds in patients with active Crohn's disease. *Clin Nutr* 1995; 14:229-236.
- ²³² **O'Moráin C**, Segal AW, Levi AJ. Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. *Br Med J* 1984; 288:1859-62.
- ²³³ **Giaffer MH**, North G, Holdsworth CD. Controlled trial of polymeric versus elemental diet in treatment of active Crohn's disease. *Lancet* 1990; 335:816-19.
- ²³⁴ **Royall D**, Jeejeebhoy KN, Baker JP, Allard JP, Habal FM, Cunnane SC et al. Comparison of amino acid v peptide based enteral diets in active Crohn's disease: Clinical and nutritional outcome. *Gut* 1994; 35:783-7.

²³⁵ **Zachos M**, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for inducing remission in Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev 2007; 1:CD000542.