



Facultad de Medicina

Dpto. Citología e Histología Normal y Patológica

**NUEVAS TERAPIAS BIOACTIVAS PREVENTIVAS Y
TERAPÉUTICAS EN UN MODELO ANIMAL DE
ENFERMEDAD DE CROHN**

TESIS DOCTORAL

Tamara Andrea Ortiz Cerda

DIRECTORES

Manuel de Miguel Rodríguez

Josefa María García Montes

Matilde Illanes Moreno

Sevilla, 2019

AGRADECIMIENTOS

Cuando acabas un proyecto o cierras una etapa en tu vida, en la cual tienes un cúmulo de sentimientos, desde la añoranza por tu tierra y tu gente, decepciones, angustias y un gran etcétera, hasta alegrías infinitas, te das cuenta de que al final de este camino, solo prima un sentimiento, y es el de agradecimiento profundo e infinito por lo aprendido y por tanta gente linda y buena que ha estado antes y durante este proceso. En esta instancia quiero reconocer a cada una de ellas:

A mi madre, padre y hermana.

Hermana, te quiero tanto y soy tan feliz con tu felicidad. Verte revoluciona mi vida y mi vida empieza a girar entorno a la emoción y ansiedad de poder abrazarte. A mis padres les debo y quiero dedicar esta experiencia de 4 años. Para ellos mi máxima admiración y amor. De mis padres he aprendido lo esencial de la vida, lo verdaderamente importante: la entrega absoluta y el amor incondicional. Ellos vibran con cada suceso de la vida de mi hermana y la mía. El sacrificio y el trabajo plasmado en este trabajo es insignificante en comparación con el esfuerzo y el sacrificio que mis padres han hecho durante toda su vida por nosotras. Papis, los amo profundamente.

A Javier, mi negri, mi compañero, cómplice y amigo, que me ha acompañado en cada momento. A él le agradezco gran parte de estar aquí, por su paciencia infinita, compañía y ayuda en cada cosa que se me ha ocurrido, incluso en la elaboración de esquemas e imágenes de este trabajo. El negri es el hombre más versátil, inteligente, admirable y con la sonrisa más bonita que conozco. Espero estar contigo en muchas experiencias más de nuestras vidas. Te amo negrito.

A toda mi familia, especialmente a la Mana-Mana, tía Emilia, tío Aldo, tío Iván, tía Gaby, Karlita, de la cual me siendo profundamente orgullosa por su amor y entrega constante.

A mis queridas amigas y amigos, chilenos y españoles (Nichme, Fanny, Jesu, Coty, Fran, Maui, Ernesto, Claudia, Paulina, Tania, Katy, Raúl), por su preocupación constante,

llamados de teléfono, desayunos y videollamadas. Agradezco especialmente a mi amiga Tania que la añoro cada día, desde mis cinco años. Te adoro amiga querida.

A Victoria Halabí, mi jefa y amiga en Chile. A ella le agradezco infinitamente su apoyo académico y laboral durante este proceso. Muchas gracias por creer en mi desde los inicios de mi formación.

A mis directores por guiar este tan bonito proyecto. Gracias por compartir vuestros conocimientos y apoyarme en todo el proceso. Agradezco especialmente a Manuel de Miguel Rodríguez, por ser parte activa en todo este proceso de formación, por depositar su confianza en mí y dedicarme el tiempo necesario en el desarrollo y finalización de la tesis.

A Josefa María García Montes, mi querida amiga y hermana putativa. Agradecimientos infinitos por toda su entrega y preocupación, no solo en lo académico, sino también en lo personal (como olvidar sus cuidados médicos y mimos cuando, a falta de mamá y papá, ella me los entregó).

A Federico Argüelles Arias, por el apoyo y el asesoramiento clínico. Le agradezco enormemente por impulsar constantemente esta línea de trabajo, confiar en mí y brindarme las oportunidades de seguir investigando.

A Miriam Escoriza, una gran alumna interna y amiga. Le agradezco su tremenda disposición a trabajar (a toda hora, en cualquier actividad y lugar). Sin duda alguna, será una gran médica.

A Marcos Ortega, sin él no hubiese sido posible todo el desarrollo de la tesis en el área de histología. Gracias por estar tan pendiente, ser tan eficaz y rápido en todo lo que he necesitado.

Gracias a Rosa Martos, Manuel Castrillo y Auxi Espinar, que me han dado los momentos de humor y alegrías en el departamento. Son los mejores para empezar un buen día de trabajo. A ellos gracias por todos los favores, impresos, fotocopias, ayudas y risas.

A todos los compañeros del departamento de citología e histología normal y patológica. Gracias por siempre estar abiertos a ayudar y compartir buenos momentos del día a día.

A Itziar Benito, por su ayuda constante y consejos sobre el manejo responsable y respetuoso con animales. Agradezco también su preocupación constante.

A Ana Alcudia, por todo su asesoramiento y colaboración en el área de química. Agradezco su amistad y su generosidad con sus conocimientos.

A Virginia Motilva y en especial a Elena Talero, por su apoyo académico, asesoramiento y ayuda en la línea de biología molecular.

A David Pozo por facilitarnos la línea celular RAW264.7 para el desarrollo de la tesis.

Finalmente, a todos aquellos que fueron parte directa e indirectamente de este proceso, sin ustedes esto no habría sido posible. Gracias infinitas

“...Algo le duele a la negra
Vino el médico del pueblo
Recetó emplasto de barro
Pero del barro más negro...
¿Qué le dieron a la negra?
Zumo de **maqui** del cerro”

*“Casamiento de negros”, canción de Violeta Parra, cantautora, pintora, escultora,
bordadora y ceramista chilena*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	16
1. ANTECEDENTES	16
2. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	19
3. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (ESPECIAL ÉNFASIS EN ENFERMEDAD DE CROHN)	22
3.1 Vías oxidativas en la patogénesis de la EII	22
3.1.1 Estrés oxidativo	22
3.1.2 Mecanismos de generación de RNS/ROS en el intestino	23
3.1.2.1 ROS	23
3.1.2.2 RNS	26
3.1.3 Mecanismos de defensa antioxidante del intestino	28
3.2 Vías inflamatorias en la patogénesis de la EII	33
3.3 Relación entre estrés oxidativo e inflamación	38
3.4 Inflamasomas	39
4. MODELO ANIMAL	46
4.1 Modelo Animal de enfermedad inflamatoria intestinal	46
4.2 Modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS	54
5. TRATAMIENTOS EN LA EII	65
5.1 Tratamientos farmacológicos en la EII	65
5.2 Tratamientos alternativos antioxidantes/antiinflamatorios en la EII	74
5.2.1 Nutracéuticos y componentes bioactivos	74
5.2.2 Polifenoles	75
5.2.3 Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bayas	77
5.2.4 Polifenoles de bayas y su impacto en la salud	81
5.2.5 Polifenoles y su relación en la EII	84
5.2.6 Polifenoles y su impacto en inflamomas en II	86
6. ARISTOTELIA CHILENSIS	90
6.1 Generalidades	90
6.2 Extractos, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante	93
6.2.1 Extractos	93
6.2.2 Contenido de polifenoles	95
6.2.3 Capacidad antioxidante	96

6.2.4 Contribución en ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	98
PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	100
OBJETIVOS	102
MATERIALES Y MÉTODOS	103
1. MAQUI	103
1.1 Extracto polifenólico de maqui (<i>Ach</i>).....	103
1.2 Estimación del contenido total de polifenoles (CTP) por Folin-Ciocalteu	107
1.3 Estimación de poder antioxidante a través de método FRAP.....	108
2. IN VITRO	110
2.1 Cultivo celular.....	110
2.2 Ensayo de viabilidad celular.....	110
2.3 Determinación de ROS.....	113
3. IN VIVO	115
3.1 Modelo animal.....	115
3.1.1 Animales.....	115
3.1.2 Grupos experimentales.....	115
3.1.3 Valoración de la severidad de la enfermedad.....	116
3.1.4 Estudio macroscópico.....	117
3.1.5 Estudio histopatológico.....	117
4. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPASMÁTICAS Y ANÁLISIS DE WESTERN	119
BLOT	
4.1 Procesamiento de las muestras.....	119
4.2 Determinación de proteínas.....	119
4.3 Análisis de Western blot.....	119
5. DETERMINACIÓN DE IL-1β	120
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	121
RESULTADOS	122
1. CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE MAQUI	122
2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTO DE MAQUI	123
3. EFECTO DE <i>Ach</i> SOBRE VIABILIDAD CELULAR	125
4. EFECTO DE <i>Ach</i> SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CULTIVO	127
CELULAR	
5. EVIDENCIA DE LA INDUCCIÓN DE ENFERMEDAD DE CROHN AGUDA POR	129
TNBS	
6. EFECTO SOBRE ACTIVIDAD CLÍNICA Y PESO CORPORAL DE <i>Ach</i> EN	131
ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDA POR TNBS	

7. EFECTO PREVENTIVO Y CURATIVO DE <i>Ach</i> SOBRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y MACROSCÓPICOS DEL TEJIDO COLÓNICO EN EL MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDO POR TNBS.....	134
8. EFECTO PREVENTIVO Y CURATIVO DE <i>Ach</i> SOBRE EVALUACIÓN MICROSCÓPICA Y ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL TEJIDO COLÓNICO EN EL MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDO POR TNBS.....	139
9. EFECTO PREVENTIVO Y CURATIVO DE <i>Ach</i> SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MUCOSA COLÓNICA EN LOS ANIMALES CON ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDO POR TNBS.....	145
10. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS NRF-2 Y HO-1 RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN ENFERMEDAD DE CROHN Y SU REGULACIÓN CON <i>Ach</i>	147
11. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS iNOS Y COX-2 INVOLUCRADAS EN PROCESOS INFLAMATORIOS EN LA ENFERMEDAD DE CROHN Y SUS NIVELES POSTRATAMIENTO CON <i>Ach</i>	149
12. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL COMPLEJO MULTIPROTEICO INFLAMASOMA NLRP3/ASC/CASPASA 1 EN LA ENFERMEDAD DE CROHN Y SUS NIVELES POSTRATAMIENTO CON <i>Ach</i>	151
13. EFECTO DE <i>Ach</i> SOBRE LOS NIVELES DE CITOQUINA INFLAMATORIA IL-1 β EN EL MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDO POR TNBS.....	154
DISCUSIÓN	155
CONCLUSIONES	173
ANEXOS	175
BIBLIOGRAFÍA	196

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: a) Imágenes endoscópicas de íleon y colon transverso sano. b) principales diferencias entre EC y CU.....	21
Figura 2a: Mecanismos inflamatorios y regulación del sistema inmune en EII.....	36
Figura 2b: Polifenoles y mecanismos de regulación del sistema inmune y vías inflamatorias en EII.....	84
Figura 3: Componentes indispensables para ensamblaje y activación de inflammasoma NLRP3.....	43
Figura 4: Modelos Animales de EII.....	46
Figura 5: Evolución histológica de la inducción de EC mediado por TNBS.....	56
Figura 6: Drogas Biológicas anti-TNF- α y sus características.....	70
Figura 7: Clasificación de polifenoles.....	76
Figura 8: Maqui, su fruto y mujer indígena comercializándolo.....	91
Figura 9: Distribución geográfica del fruto del Maqui.....	92
Figura 10: Comparación de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de maqui y otros frutos.....	97
Figura 11: Procedimiento para la obtención del extracto del maqui.....	105
Figura 12: Esquematación de la obtención del extracto polifenólico de maqui (<i>Ach</i>).....	106
Figura 13: Pasos para la evaluación de viabilidad celular por Alamar blue.....	111
Figura 14: Esquema experimental de inducción de EC y administración de <i>Ach</i>	116
Figura 15: Tejido del intestino grueso entero enrollado en portaobjeto.....	118
Figura 16: Recta de calibración de AG.....	122
Figura 17: Recta de calibración Trolox.....	124
Figura 18: <i>Ach</i> previene muerte celular inducida por H ₂ O ₂ en HT-29.....	125
Figura 19: <i>Ach</i> <u>no</u> presenta citotoxicidad en RAW264.7.....	126
Figura 20: <i>Ach</i> protege contra el estrés oxidativo en línea celular HT-29.....	127
Figura 21: Actividad protectora de <i>Ach</i> en RAW264.7 inducidos con LPS.....	128
Figura 22: TNBS induce Enfermedad de Crohn aguda.....	130
Figura 23: Tratamiento con <i>Ach</i> mejoró las características clínicas en los roedores tratados con TNBS.....	131

Figura 24: Tratamiento con <i>Ach</i> mejora las características clínicas en modelo experimental de EC.....	132
Figura 25: <i>Ach</i> impide la pérdida de peso en EC inducida por TNBS.....	133
Figura 26: <i>Ach</i> impide el acortamiento del intestino grueso.....	135
Figura 27: <i>Ach</i> mejora significativamente la longitud del intestino grueso.....	136
Figura 28: <i>Ach</i> restablece el peso del tejido colónico.....	137
Figura 29: <i>Ach</i> mejora características morfológicas del colon.....	138
Figura 30: <i>Ach</i> restaura la morfología colónica.....	139
Figura 31: <i>Ach</i> atenúa el daño histológico.....	140
Figura 32: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo control (G1). Tinción H&E.....	141
Figura 33: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo (G2). Tinción H&E.....	142
Figura 34: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado de forma curativa con <i>Ach</i> (G3). Tinción H&E.....	143
Figura 35: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado de forma preventiva (G4). Tinción H&E.....	144
Figura 36: Estudio histopatológico de la integridad y funcionalidad de la mucosa colónica. Tinción PAS.....	145
Figura 37: El modelo agudo de enfermedad de Crohn en roedores genera un aumento de mecanismos antioxidantes: Nrf-1 y HO-1.....	147
Figura 38: <i>Ach</i> disminuye la expresión de las proteínas iNOS y COX-2.....	149
Figura 39: <i>Ach</i> inhibe la activación del complejo inflammasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1.....	152
Figura 40: <i>Ach</i> inhibe la producción de IL-1 β en tejido colónico.....	154
Figura 41: Vías de señalización involucradas en la enfermedad de Crohn y efectos propuestos de polifenoles derivados de <i>Ach</i> sobre estos mecanismos.....	172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales mecanismos oxidantes y antioxidantes del tracto gastrointestinal.....	32
Tabla 2: Interacción entre las células implicadas en la inflamación de la EII.....	34
Tabla 3: Modelo de Inflamación colónica propuesto por Morris y cols.....	53
Tabla 4: Resumen de los principales modelos animales de EC inducida por TNBS.....	60
Tabla 5: Principales dianas de fármacos biológicos utilizados en EII.....	73
Tabla 6: Contenido de polifenoles y capacidad antioxidantes de diversas bayas.....	79
Tabla 7: Efecto de los polifenoles sobre la inflamación y actividad de inflammasoma en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de inflamación.....	89
Tabla 8: Principales metodologías para obtención de extracto de <i>Ach</i> , contenido de polifenoles y capacidad antioxidante.....	94
Tabla 9: Perfil y cuantificación de antocianinas de <i>Ach</i>	96
Tabla 10: Efecto de <i>Ach</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	99
Tabla 11: Concentración de Trolox para recta patrón.....	109
Tabla 12: Índice de actividad clínica.....	116
Tabla 13: Score de daño macroscópico intestinal.....	117
Tabla 14: Score de daño microscópico intestinal.....	118
Tabla 15: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox.....	122
Tabla 16: Contenido de polifenoles totales en extracto liofilizado de maqui.....	123
Tabla 17: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox.....	123
Tabla 18: Capacidad Antioxidante del extracto polifenólico de maqui.....	124
Tabla 19: Promedio (\pm SEM) de la longitud del colon de los grupos experimentales.....	134

I. ABREVIATURAS

¹O₂	Oxígeno singlete	IL	Interleuquina
2WO₄²⁻	Ácido fosfowolfrámico	iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
5-ASA	Ácido 5-amino-salicílico	IRGM	GTPasa M relacionada a inmunidad
6-MP	6- Mercaptopurina	IS	Inmunosupresores
6-TGN	6 tioguanina-nucleótido	JAK	Janus quinasa (JAK-1, JAK-2, JAK-3)
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
AA	Ácido araquidónico	KI	Knock-in
ABTS	2,2'-azino-bis	KO	knockout (KO, Knockout inducible [iKO])
Ach	Extracto polifenólico de maqui	LPS	Lipopolisacáridos
AcMs	Anticuerpos monoclonales	MAdCAM-1	Molécula de cito-adhesión adresina mucosal 1
AcOH	Ácido acético	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
AGR2	Proteína de gradiente anterior -2	MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos
Ahr	Receptor de hidrocarburos de arilos	MDA	Malondialdehído
AIM-2	Ausente en melanoma 2	MeOH	Metanol
AINES	Antiinflamatorio no esterooidal	MIP-2	Proteína inhibitoria de macrófagos (MIP-2, MIP-1α)
ALR	Receptores tipo AIM2	MPO	Mieloperoxidasa
AP-1	Proteína activadora -1	mtROS	ROS mitocondrial
AR	Artritis reumatoide	MTX	Metotrexato
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante	Muc2	Mucina 2
ASC	Proteína tipo speck asociada a apoptosis	NaAc	Acetato sódico
Atg	Genes relacionados con autofagia	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
AZA	Azatioprina	NFAT	Factor nuclear de células T activas
Bax	Proteína x asociada a Bcl-2	NF-κB	Factor nuclear kappa B
Bcl-2	Células B-Linfoma 2	NLR	Receptores tipo NOD (NLRP1, NLRP3, NLRP6)
CA	Capacidad antioxidante	NLS	Secuencia de localización nuclear
CAM	Moléculas de adhesión celular	nNOS-	Neuronas mientéricas NO nitrérgica
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasa	NO•	Óxido nítrico
CAT	Catalasa	NOD	Nucleótido responsable de la oligomerización
CFU	Unidad formadora de colonia	NOX	NADPH oxidasa
Cl⁻	Ion cloruro	Nrf-2	Factor-2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
CO	Monóxido de Carbono	O₂•-	Anión superóxido
COX	Ciclooxygenasa (COX-1, COX-2)	OH•	Radical hidroxilo
CPF	Calprotectina fecal	ONOO⁻	Peroxinitrito
CTP	Contenido total de polifenoles	ORAC	Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno
CU	Colitis Ulcerosa	P/ST	Penicilina-estreptomina
CyA	Ciclosporina	PAGE/SDS	Poliacrilamida de dodecilsulfato sódico
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño	PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
DCF	Diclorofluoresceína	PAS	ácido peryódico-reactivo de schiff
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína	PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína	PG	Prostaglandinas
DHA	Ácido docosahexaenoico	PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
DMN	Dimetilnitrosamina	PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
Dn	Transgénico negativo dominante	PMNLs	Leucocitos polimorfonucleares
DNBS	Ácido dinitrobenenosulfónico	PPAR-γ	Receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
DNMT1	ADN metil transferasa 1	PRR	Receptores de reconocimiento de patrones

DPPH	Difenil picrilhidrazilo	PUFA	Ácido graso poliinsaturado omega-3
DSS	Sodio sulfato de dextrano	PYD	Pirina N-terminal
DUB	Enzima deubiquitinadora	RAG	Genes de activación recombinante
EC	Enfermedad de Crohn	RII	Reperfusión isquémica intestinal
ECG	Epigalocatequina	RNS	Especies reactivas del nitrógeno
EGCG	Epigalocatequina 3-galato	RL	Radicales libres
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal	ROOH	Hidroperóxido lipídico
ENU	N-etil-N-nitrosourea	ROS	Especies reactivas del oxígeno
EO	Estrés oxidativo	S1P	Esfingosina-1-fosfato (S1P1, S1P5)
EPA	Ácido eicosapentaenoico	SNE	Sistema nervioso entérico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares	SNP	Polimorfismos de nucleótido simple
EtOH	Etanol	SOD	Superóxido dismutasa (SOD1, SOD2, SOD3)
FcRn	Receptor Fc neonatal	STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3)
FRAP	Poder antioxidante de reducción férrica	TAK1	TGFβ activado por quinasa 1
GAE	Equivalentes de ácido gálico	TBARS	Ácido tiobarbitúrico
GC	Glucocorticoides	TCRα	Receptor de células T-α
GPx	Glutación peroxidasa (GPx1- GPx5)	TE	Trolox equivalentes
GRE	Elementos de respuesta a GC	TEAC	CA equivalente de Trolox
Gro-α	Oncogén regulador de crecimiento	Tg	Transgénicos
GSH	Glutación reducido	TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
GSSG	Glutación oxidado	TGFβR	receptor de transmembrana TGF-β (TGFβR1, TGFβR2)
GSSG-R	Glutación reductasa	Th	Linfocitos T helper (Th1, Th2 Th17)
GSTα	Glutación S- Transferasa	TLR	Receptor tipo-Toll
H&E	Hematoxilina & Eosina	TNBS	2,4,6 ácido trinitrobencenosulfónico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	TNFR1	Receptor de TNF-α
HCl	Ácido clorhídrico	TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
HDAC6	Histona deacetilasa 6	T-NK	Célula natural killer
HNE	4 hidroxinonenal	TPTZ	2,4,4-tripiridil-s-triazina
HO	Hemo oxigenasa (HO-1, HO-2)	Treg	Linfocitos T reguladores
HOBr	Ácido hipobromoso	Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
HOCl	Ácido hipocloroso	TRx	Tiorredoxina
HOO•	Hidroperoxilo	TRx-(SH)₂	Tiorredoxina reducida
HX	Hipoxantina	TRxR	Tiorredoxina reductasa
IBDQ-9	Índice de cuestionario de EII-9	TRx-S₂	Tiorredoxina oxidada
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular	Tx	Tromboxano
ICE	Enzima convertidora de IL-1	TYK2	Tirosina quinasa 2
IEC	Células epiteliales intestinales	W₂O₅	Azul de wolframio
IFN-γ,	Interferón-γ	XO	Xantina Oxidasa
IκBα	Inhibidores de κBα	YIPF	Proteínas que interaccionan con Rab
IKK	Enzima quinasa IκB	ZO-1	Zonulina-1

II. RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), son un trastorno inflamatorio crónico del tracto digestivo que cursa con fases agudas y de remisión. La etiología de la EII, aunque no está completamente dilucidada, involucra una respuesta inmunológica anormal y presencia de estrés oxidativo (EO) en individuos genéticamente susceptibles, en combinación con una alteración de la microbiota intestinal y factores medioambientales como la dieta. Diversos componentes bioactivos, como los polifenoles, han sido descritos por su efecto antioxidante y antiinflamatorio y que podrían jugar un rol en la resolución de la inflamación intestinal. Los objetivos del presente estudio fueron obtener un extracto de maqui rico en contenido de polifenoles totales y con alto poder antioxidante para investigar su efecto sobre el EO y la viabilidad celular en líneas celulares de epitelio colónico (HT-29) y macrófagos (RAW264.7), e identificar el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto polifenólico de maqui (*Ach*) y su uso como terapia preventiva y curativa en un modelo animal de EC aguda inducido por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) mediante vía intracolónica. Los resultados *in vitro* indican que el extracto de *Ach* impide la muerte celular e inhibe el EO causado por H₂O₂ en HT-29. Además, hemos demostrado que *Ach* no ejerce efectos citotóxicos e impide la oxidación en macrófagos activados con LPS. En modelo agudo de EC, la administración de *Ach* fue mediante vía orogástrica a una dosis de 50 mg/Kg y fue iniciada 7 días previo a la inducción y hasta el sacrificio para el grupo preventivo y durante 4 días después de la inducción para el grupo curativo. La administración oral de *Ach* redujo la inflamación intestinal inducida por TNBS, evidenciada por una mejora en el peso corporal, características clínicas, morfología colónica y disminución del score histopatológico, incluyendo una recuperación de las células caliciformes y función mucosecretora. En el modelo animal de EC, fue observado un incremento de la expresión del factor de transcripción Nrf-2 y HO-1, probablemente como una respuesta adaptativa al EO. Hemos descrito que *Ach*, conocido por su poderosa CA, presenta una tendencia a incrementar estas vías antioxidantes y favorecer de forma significativa la actividad antiinflamatoria, al disminuir la expresión de COX-2 e iNOS. Adicionalmente, hemos demostrado que *Ach* inhibe fuertemente la activación de inflammasoma NLRP3 y reduce

la expresión del complejo multiproteico ASC y caspasa 1 y la inhibición de la producción de IL-1 β , una importante citoquina proinflamatoria. Este estudio describe por primera vez el efecto de los polifenoles del fruto del maqui sobre la EC en fase aguda, indicando que *Ach* podría ser útil como fuente antioxidante y un importante candidato como terapia antiinflamatoria, específicamente en EC.

III. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un término que se emplea de manera genérica para referirse a enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal de tipo crónico, curso recurrente y de etiología desconocida, que alterna fases de actividad y remisión. Dicho término engloba dos entidades principales: la enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU). Aunque los fenotipos patológicos-clínicos son similares, es posible distinguir ambas entidades por su diferencia en la localización de la inflamación en el tracto gastrointestinal, patrones inmunológicos e histológicos[1]. Por lo impredecible del curso de la enfermedad y el inicio en pacientes de corta edad, la EII representan una gran carga física y psicológica en pacientes, afectando drásticamente la calidad de vida.

Existe una amplia variabilidad geográfica en la incidencia y prevalencia de la EII. Se han observado altas tasas de incidencia en el Reino Unido, el norte de Europa, Canadá y los Estados Unidos, mostrando una rápida expansión en los últimos 20 años. Aunque inicialmente se identificó en los países occidentales durante la revolución industrial, se ha apreciado un aumento en áreas donde previamente existía una baja incidencia, como en África, Asia, América del Sur y otras regiones recientemente industrializadas [2, 3].

A nivel mundial, existe un aumento en la incidencia de EC y CU a lo largo del tiempo, estimándose una prevalencia de 5 millones de personas afectadas. La prevalencia de EII es mayor en Europa, seguido por América del Norte. La incidencia de CU en Europa oscila entre 1.6 a 31.8 casos por 100.000 habitantes/año, mientras que la EC presenta un promedio 16.0 casos por 100.000 habitantes/año [4]. En España, se ha estimado que la prevalencia puntual de EC y CU es del 0.3% para ambas enfermedades [5]. Específicamente, en el Sur de España se ha observado que la incidencia de EII se ha duplicado entre 2001 a 2014 comparado con periodos anteriores, mostrando una incidencia actual de 14.7 casos por 100.000 habitantes/año, similar a la descrita en otros países europeos. Concretamente, la incidencia de CU es de 7.6 casos por 100.000 habitantes/año y 7.1 casos por 100.000 habitantes/año para EC [6]. Con una creciente prevalencia y la necesidad de costosos tratamientos médicos, la EII representa un

importante problema de salud pública a nivel mundial, con costos directos anuales estimados de € 4.6-5.6 miles de millones sólo en Europa [7].

Aunque la etiología de la EII sigue siendo poco clara, es ampliamente aceptado que se trata de una desregulación de la respuesta inmune a diversos estímulos medioambientales, incluyendo la microbiota intestinal en personas genéticamente predispuestas. Dichos estímulos desencadenan una respuesta inmunológica exagerada que, tras la liberación de una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias, interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquinas (IL), causan inflamación intestinal [2]. Actualmente, los factores ambientales implicados en la EII, que en parte explican este rápido incremento a finales del siglo XX, son la industrialización y la urbanización de las sociedades, asociados a cambios en el saneamiento, conductas de estilo de vida, uso de medicamentos, exposición a contaminación y dieta [3]. Diversas publicaciones han señalado que la dieta estaría modulando el desarrollo de la EII. Por ejemplo, en la población china, una dieta con una excesiva ingesta de alimentos fritos y azúcares, ha sido identificada como factor de riesgo, mientras que beber agua del grifo, beber té, consumir omega 3 y la actividad física, han sido descritas como factores de protección para la CU [2]. Estudios sobre las poblaciones canadiense y australiana, han señalado que patrones dietéticos específicos, como una dieta occidental, caracterizada por consumo de carnes y alimentos grasos, podrían aumentar el riesgo de EC, mientras que el consumo de verduras, frutas, aceite de oliva, pescado, granos y nueces se asocia con un menor riesgo de enfermar [8, 9]. Así, nutrientes y componentes dietarios específicos, en combinación con factores genéticos, podrían estar vinculados a cambios en la microbiota y microbioma intestinal, afectando el riesgo de inflamación intestinal [10-12]. Del mismo modo, un estudio europeo multicéntrico prospectivo de cohorte indica un rol potencial de una dieta rica en polifenoles al disminuir el riesgo de desarrollar EC [13], posiblemente debido a la estrecha relación entre el estrés oxidativo (EO), sus mecanismos de señalización y el desarrollo de EII [1, 14, 15].

Actualmente, el objetivo del tratamiento en la EII es inducir la remisión y tratar los síntomas y las complicaciones. Terapias convencionales tales como medicamentos antiinflamatorios, corticoides, antibióticos e inmunosupresores siguen siendo los más utilizados. La introducción y el desarrollo de biológicos durante las últimas dos décadas

se han sumado al arsenal terapéutico con el fin de mejorar el curso de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes, aunque con diversos efectos secundarios y con relativa efectividad [16, 17].

2. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Los trastornos de CU y EC tienen distintas características patológicas y clínicas, pero su etiopatogenia sigue siendo poco conocida. El curso clínico de la CU y EC son impredecibles y se caracteriza por episodios de remisión y actividad con síntomas característicos como dolor, diarrea y pérdida de peso [18]. A pesar de la existencia de similitudes entre ambas entidades, el fenotipo y la progresión de la enfermedad difieren significativamente. Actualmente, es ampliamente aceptado que la predisposición genética y una desregulación inmunológica en respuesta a factores ambientales y microbiota intestinal, participan en la etiopatogenia de la enfermedad [1]. Las células epiteliales intestinales (IEC) forman una barrera que protege contra posibles estimulantes dañinos, representando un elemento esencial para regular las respuestas inmunitarias. Una capa de mucina sobre las IEC actúa como una barrera crítica que separa las bacterias patógenas del epitelio, disminuyendo así la activación inmune. Tanto en EC como en CU, es posible observar una alta penetración de las bacterias en la capa de mucina y una mayor permeabilidad de barrera intestinal [19, 20]. De hecho, el aumento de la permeabilidad de la barrera epitelial durante la remisión se ha asociado con una recaída clínica de la enfermedad [21].

a) Colitis Ulcerosa

Se caracteriza por una inflamación crónica de la mucosa, que afecta al colon y recto, y es de afectación continua y difusa y en sentido proximal. La enfermedad se desarrolla con mayor frecuencia en la segunda o tercera década de la vida. Los síntomas más característicos son la presencia de sangre y/o mucosidad en las heces, diarrea, así como dolor abdominal, urgencia fecal y tenesmo [22] (**Figura 1 [a,b]**).

b) Enfermedad de Crohn

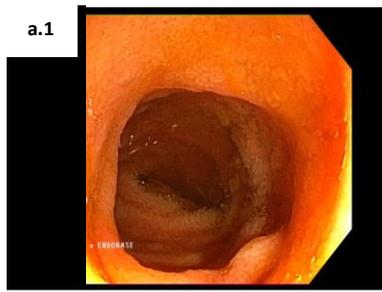
Se caracteriza por una inflamación crónica, con lesiones segmentarias y discontinuas y con afectación transmural. A diferencia de la CU, puede afectar a todo el tubo digestivo, aunque la localización más frecuente (en el 50% de los pacientes) es en

íleon terminal y en colon y por lo general, suele respetar el recto, aunque existe enfermedad perianal. La mayoría de los pacientes la presentan en la adolescencia tardía y en la edad adulta temprana [23]. Debido a la variabilidad de la gravedad y la ubicación de la EC, así como a su naturaleza transmural, los pacientes pueden tener presentaciones de amplio alcance. Suelen presentar dolor abdominal y diarrea y en los casos más severos, astenia, anorexia y pérdida de peso. En etapas temprana, hay presencia de necrosis parcheada del epitelio, acumulación de leucocitos focal adyacente a las criptas y un incremento intraepitelial de macrófagos y granulocitos [24]. La presencia de granulomas epitelioides, una colección de macrófagos y otras células inflamatorias, es una característica histológica relativamente específica de la EC asociada con la cronicidad, aunque solo se observa en menos de la mitad de los pacientes con EC [25] (**Figura 1[a,b]**).

c) Colitis Indeterminada

La colitis indeterminada (CI) representa un tercer subtipo de EII que implica inflamación de la mucosa con características que no se pueden distinguir entre CU y EC. Los pacientes presentan características patológicas superpuestas de CU y EC, lo que hace que la distinción definitiva entre estos dos trastornos sea difícil. En la mayoría de los casos, el paciente muestra características clínicas y patológicas de CU, pero la muestra de colectomía revela una o más características de EC. En este contexto, a menudo se realiza un diagnóstico CI. Se considera que un 10% de los pacientes con EII presentan CI [26, 27]

a)



b)

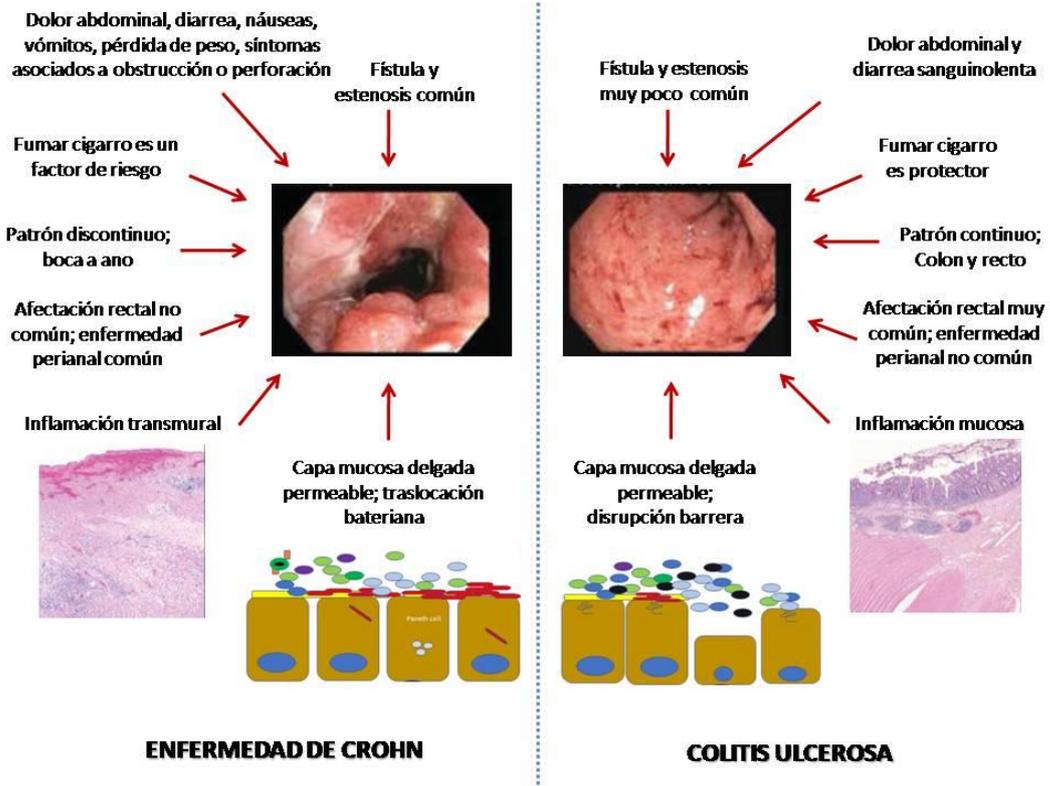


Figura 1: a) Imágenes endoscópicas de íleon (a.1) y colon transverso sano (a.2). b) Principales características y diferencias entre EC y CU. (Obtenido y modificado de Levine y cols. 2018 y Cheifetz y cols. 2013 [23, 28].)

3. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Especial énfasis en EC

3.1 VÍAS OXIDATIVAS EN LA PATOGÉNESIS DE LA EII

3.1.1 ESTRÉS OXIDATIVO

El EO se puede definir como un estado en el que las especies reactivas del oxígeno (ROS), del nitrógeno (RNS), así como radicales libres (RL) y componentes no radicales sobrepasan la capacidad de los sistemas antioxidantes, generando lesiones celulares reversibles o irreversibles. Concentraciones fisiológicas de ROS (nanomolar a micromolar) son esenciales para la supervivencia celular debido a su implicancia en diversos procesos, que incluyen la fosforilación de proteínas, activación de factores de transcripción, diferenciación celular, apoptosis, inmunidad celular, entre otras [29]. En condiciones fisiológicas, la célula puede tolerar ciertos niveles de EO (ROS y RNS), gracias a que posee un sistema antioxidante que permite mantener la homeostasis celular.

A nivel del tracto gastrointestinal, el EO puede resultar en efectos lesivos, como ruptura de la barrera colónica e incremento de infiltración leucocitaria en el tejido intestinal, junto con moléculas inflamatorias como citoquinas, ácido araquidónico (AA) y metabolitos como ROS [30]. Además, el EO es responsable del daño de estructuras intracelulares formadas por carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

El EO ha sido implicado en la iniciación y progresión de diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Específicamente, se ha mostrado que la presencia de EO juega un rol clave en la patogénesis de enfermedades de la mucosa del tracto gastrointestinal como úlceras gastroduodenales, cáncer colorrectal/gástrico y EII [1, 29]. En la EC, ha sido ampliamente descrito que el EO podría ser un factor importante en contribuir a la lesión tisular y la fibrosis que caracterizan la EC y en la desregulación de la respuesta inmunitaria, asociada a una producción excesiva de ROS y RNS [14, 31]

3.1.2 MECANISMOS DE GENERACIÓN DE RNS/ROS EN EL INTESTINO

3.1.2.1 ROS

Las principales fuentes de producción de ROS son las células fagocíticas, especialmente macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos polimorfonucleares (PMN), además de células endoteliales y diversos tipos de células epiteliales, incluidos enterocitos, hepatocitos, neumocitos y células de los túbulos renales [29]. Específicamente, la producción de ROS endógena es producida en el citoplasma, matriz extracelular y principalmente por orgánulos celulares como retículo endoplasmático, peroxisomas, núcleo y mitocondrias, siendo estas últimas las responsables de la mayor proporción de generación de ROS mediante el complejo I de la cadena transportadora de electrones y de enzimas mitocondriales como las flavoproteínas [32]. Un exceso de ROS genera una disminución en la producción de ATP mitocondrial, supresión de la cadena transportadora de electrones y daño al ADN mitocondrial, llevando a la muerte celular [1].

La producción de ROS puede provenir de distintas fuentes como se detalla a continuación (**Tabla 1**):

- a) Mecanismos endógenos de producción de ROS
- b) Fuentes exógenas o medioambientales de ROS

a) Mecanismos endógenos de producción de ROS

- **NADPH oxidasa:** Complejo enzimático presente en la membrana plasmática y fagosomas de fagocitos como monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Se han identificado 6 enzimas homologas a NADPH oxidasa, denominada NOX (NOX1, NOX 3-5 y DUOX1-2) [33]. NADPH oxidasa genera grandes cantidades de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical más abundante en el tejido humano y altamente expresada en el tracto gastrointestinal. El $O_2^{\bullet-}$ es altamente reactivo, inestable y de vida muy corta, convirtiéndose rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical hidroperoxilo (HOO^{\bullet}) es la forma protonada del anión $O_2^{\bullet-}$ e inicia la lipoperoxidación, generando alteración de la integridad, fluidez y permeabilidad de la membrana, a través de la introducción de este radical en la cola hidrofóbica de los ácidos grasos insaturados de la

misma. Durante la peroxidación lipídica, existe también una modificación de lipoproteínas hacia formas proinflamatorias, generando productos tóxicos como malondialdehído (MDA) o 4 hidroxinonenal (HNE) que pueden causar daño en proteínas [24]. En particular, los niveles de MDA se encuentran elevados tanto en la mucosa inflamada de pacientes con EC como con CU [34].

Las isoformas de NADPH oxidasa se encuentran distribuidas en diversos tejidos. Mientras la NOX1 se expresa principalmente en células epiteliales del colon y recto [35], la expresión de la isoforma DUOX2 se puede encontrar a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, con una expresión máxima en el íleon [36]. Los datos obtenidos por diversos autores sugieren una correlación positiva entre sobreexpresión de NOX e inflamación gastrointestinal. Se ha descrito que la expresión de ARNm de NADPH oxidasa se encuentra prácticamente ausente en macrófagos de la mucosa normal, mientras que la mucosa inflamada, particularmente en la EC, la actividad oxidativa incrementa la expresión de ARNm de NADPH oxidasa [37]. Es más, se ha demostrado que la expresión de ciertas variantes del gen NOX afecta la susceptibilidad de un individuo a desarrollar EII [38].

- **Xantina Oxidasa (XO):** Es una molibdoflavoenzima versátil, ampliamente distribuida en humanos (leche materna, riñón, pulmón, corazón y endotelio vascular); especialmente, su actividad es máxima en hígado y en mucosa intestinal. Esta enzima participa en el metabolismo de las purinas, catalizando la oxidación de hipoxantina (HX) a xantina, para luego producir ácido úrico y $O_2^{\bullet-}$, que eventualmente será reducido a H_2O_2 [39]. La carga aniónica de $O_2^{\bullet-}$ no difunde a través de las membranas, favoreciendo la oxidación solo en tejidos cercanos, mientras que H_2O_2 es difusible y reacciona preferentemente con compuestos que contienen tiol, iniciando la señalización redox. La catálisis por XO para producir ácido úrico y ROS, conduce a diversas enfermedades como gota y enfermedades relacionadas con daño oxidativo en tejido [40]. Kruidenier y cols. identificaron una alta expresión de XO en el tejido epitelial de intestino y en los neutrófilos de la lámina propia, tanto en mucosa sana como en mucosa de pacientes con EII, aunque con una tendencia mayor en epitelio de pacientes con EC y ligeramente más alta en mucosa inflamada que en mucosa no inflamada de sujetos con EC [34].

- **Mieloperoxidasa (MPO):** Es una hemoproteína presente en neutrófilos circulantes, monocitos y algunos macrófagos tisulares, que desempeña una acción bactericida. Del mismo modo, MPO actúa como un tóxico, ya que en presencia de haluros (Cl⁻, Br⁻), transforma H₂O₂ en ácidos más reactivos (ácido hipocloroso [HOCl] y ácido hipobromoso, [HOBr]), así como cloraminas [41]. HOCl reacciona con H₂O₂ para generar oxígeno singlete (¹O₂) y ion cloruro (Cl⁻) [33]. Los oxidantes derivados de MPO pueden causar daño en el tejido del huésped al promover la modificación de proteínas postraduccionales y oxidación de lípidos [41]. En la mucosa inflamada del intestino, la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMNLs) y monocitos puede inducir una mayor formación de HOCl, que es más tóxica que O₂^{•-} o H₂O₂ y reacciona inespecíficamente con sulfhidrilos, ácidos grasos poliinsaturados, ADN, piridina, nucleótidos y aminoácidos aromáticos [42]. Se ha identificado que niveles de MPO fecal se correlacionan positivamente con la gravedad de EII, considerándose como un posible y potente biomarcador fecal, no invasivo y viable para evaluar el estado de la EII [43, 44].

- **Ciclooxigenasa (COX):** Presente en dos isoformas: COX-1 y COX-2. Tiene por función liberar AA de la membrana fosfolipídica y catalizar la conversión de AA a prostanoídes (prostaglandinas [PG], levuloglandinas y tromboxanos [Tx]). Cataliza la inserción de las dos moléculas de oxígeno necesario para la formación de moléculas intermediarias (PGG₂/PGH₂) a partir de AA. Es considerada una proteína enzimática con actividad catalítica bifuncional, ya que presenta acciones propias de COX y función peroxidasa. Esta última reduce PGG₂ a PGH₂, la cual es convertida a su forma biológicamente activa. Dado el papel de las reacciones dependientes de radicales en la catálisis de COX, es posible que se produzca, junto a PG, NO[•] y que este último pueda estimular la actividad de COX [45]. Ha sido descrito que la inmunexpresión de COX-2 en EC se hace más marcada con la progresión de la enfermedad. Aunque la expresión de COX-1 en células epiteliales e inflamatorias está presente en algunos casos de EC, una mayor proporción de pacientes con EC presentan inmunoreactividad a COX-2 en células inflamatorias y epiteliales en asociación con la actividad inflamatoria aguda [46]. Adicionalmente, polimorfismos de COX-2 se han asociado con riesgo de CU [47].

- **Metales de transición:** El radical hidroxilo (OH•) es un radical libre muy reactivo y de vida muy corta formado a partir de H₂O₂, O₂•⁻ e iones de hierro, mediante la reacción de Haber-Weiss. El primer paso involucra la reducción de ion férrico o cúprico (Fe³⁺, Cu²⁺), generalmente Fe³⁺, a ion ferroso (Fe²⁺). El segundo paso es una reacción de Fenton en donde el ion metálico reducido reacciona con el H₂O₂ para formarse OH• [31]. Debido a la ausencia de cualquier mecanismo enzimático para la eliminación de este radical, el exceso de producción de OH• finalmente conduce a la muerte celular. En el tracto gastrointestinal, OH• inactiva la enzima mitocondrial piruvato deshidrogenasa, despolimeriza la mucina y causa daño en ARN y ADN mitocondrial [24], describiéndose como un mediador de toxicidad en EII [29]. El radical OH• también puede iniciar la reacción en cadena al reaccionar con los lípidos de la membrana, lo que conduce a la peroxidación lipídica [48]. Boehm y cols. han descrito que los niveles plasmáticos de MDA medidos con ácido tiobarbitúrico (MDA/TBARS) son un marcador de peroxidación lipídica en la EC [49].

b) Fuentes exógenas o medioambientales

El EO también puede ser activado por factores medioambientales, como radiación, quimioterapia, humo de cigarro, antígenos luminales (provenientes por ejemplo de la dieta), alcohol, drogas y xenobióticos, los cuales contribuyen a la EII. Minerales en la dieta, ácidos grasos trans en algunos tipos de alimentos procesados, entre otros, pueden activar la generación de ROS y resultar en EO [1, 33].

3.1.2.2 RNS

- **Sintasa de óxido nítrico (NOS):** Los RNS son producidas por la NOS que se localiza en el endotelio, macrófagos y músculo liso del tracto gastrointestinal. La isoforma inducible de NOS (iNOS) metaboliza arginina a citrulina y radical óxido nítrico (NO•) de manera constante. El NO• está involucrado en los mecanismos de defensa de la mucosa, así como en los causantes del daño celular. Por una parte, NO• mantiene la integridad de la mucosa por regulación del flujo sanguíneo, secreción epitelial y barrera intestinal, mientras que por otra, es capaz de generar daño en el tejido intestinal [50] (**Tabla 1**). Es posible observar un incremento en la expresión de iNOS en tejido inflamado, macrófagos, leucocitos y células epiteliales de la mucosa intestinal, generando una

excesiva producción de RNS [51]. La reacción entre $\text{NO}\bullet$ y $(\text{O}_2\bullet^-)$ lleva a la producción de peroxinitrito (ONOO^-), un poderoso oxidante que reacciona con proteínas, ADN y lípidos. Estas reacciones desencadenan una amplia gama de respuestas celulares que van desde modulaciones sutiles de la señalización celular hasta una lesión oxidativa, comprometiendo a las células a necrosis o apoptosis [52]. Se ha publicado en un modelo animal de EC, un incremento en la expresión de iNOS tanto en tejido colónico como en muestras de hipocampo, sugiriendo un rol no sólo inflamatorio, sino también en efectos de comportamiento y comorbilidades siquiátricas en EC, mostrando la importancia de la comunicación intestinal-cerebral durante el desarrollo de la inflamación colónica [53]. En pacientes con EC, polimorfismo del gen de NOS (*Nos2a*) estarían involucrados en la susceptibilidad de EII [54]. Por tanto, NOS es ampliamente reconocida como participante en el inicio y el mantenimiento de la inflamación intestinal en la EII, además de ser sugerida como un potente biomarcador en leucocitos en sangre, específicamente para identificar fases de actividad y remisión [55].

3.1.3 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE DEL INTESTINO

Dado las significativas fuentes oxidantes en el microambiente mitocondrial y celular, la existencia de mecanismos antioxidantes en el tracto gastrointestinal es indispensables para mantener la homeostasis celular. Para dicho fin, se encuentran mecanismos de eliminación catalítica de RL, reducción de RL por donantes de electrones, quelación por iones metálicos, como el hierro, y mecanismos de reparación [56]. Es así como ha sido demostrado que en el tracto gastrointestinal no sólo hay un mayor contenido de ROS, sino también hay una mayor concentración de enzimas antioxidantes [24] (**Tabla 1**).

- a) Antioxidantes enzimáticos endógenos
- b) Antioxidantes no-enzimáticos endógenos
- c) Antioxidantes exógenos

a) Antioxidantes enzimáticos endógenos

- **Superóxido Dismutasa (SOD):** Es una enzima que requiere un factor de ion metálico. Pueden catalizar la reducción de $O_2^{\bullet-}$ en O_2 y H_2O_2 . Se presenta en 3 isoformas: CuZn/SOD1, presente en el citoplasma y representa el 70% del total de esta enzima; Mn/SOD2 mitocondrial, que protege a la mitocondria del posible daño de $O_2^{\bullet-}$, vital para la sobrevivencia celular; y SOD extracelular (EC/SOD3), presente en el medio extracelular como plasma e intersticio [1, 24].

Estudios clínicos han mostrado una reducción significativa de actividad de SOD en personas con EC en comparación con personas sanas junto con una disminución de los niveles de zinc plasmáticos [31, 57]. A nivel de la mucosa, se ha descrito cambios importantes en los niveles de expresión de las distintas isoformas en el tejido intestinal de pacientes con EII. Kruidenier y cols. mostraron que, tanto en EC como en CU, hay una mayor cantidad del antioxidante Mn/SOD intestinal, particularmente en el epitelio de la mucosa inflamada, neutrófilos y macrófagos, comparado con la mucosa no inflamada de pacientes con EII y con la mucosa de personas sanas, junto con una disminución de los niveles de Cu/Zn-SOD y EC/SOD3 en comparación con la mucosa no inflamada [58]. En general, se ha indicado que la actividad de SOD aumenta en la EII en fase activa, como

primera línea de defensa para proteger contra el EO, mientras que los pacientes en fase de remisión pueden presentar niveles más bajos de este mecanismo antioxidante [59].

- **Catalasa (CAT):** Es una enzima que utiliza como cofactor un grupo hemo. Tiene por función catalizar la reducción de H_2O_2 intracelular a H_2O y O_2 . Existen 3 tipos de CAT. La CAT típica o monofuncional, cuya conformación activa es un tetrámero y muestra poca actividad peroxidasa; la CAT-peroxidasa o bifuncional, activa en la forma de dímero o tetrámero y actúan como CAT y peroxidasa y la pseudo-CAT, también llamada CAT-manganeso no-hemo [29]. En general, la CAT es ampliamente expresada en el citoplasma y peroxisomas del epitelio colónico y lámina propia, y se encuentra activa durante procesos inflamatorios cuando incrementan las concentraciones de H_2O_2 [60]. Sin embargo, algunos autores indican que la actividad de la CAT se encuentra permanentemente inhibida en células inmunes durante procesos inflamatorios como la EC, independientemente de la actividad de la enfermedad. La causa y significado biológico aún no están claros, aunque se considera que la CAT es un regulador de los procesos celulares fisiológicos y no parece actuar en condiciones inflamatorias [61, 62].

- **Glutación peroxidasa (GPx):** Es una proteína compuesta por 4 subunidades idénticas que participan en la reducción de lípidos y H_2O_2 [63]. GPx puede catalizar glutación reducido (GSH) en glutación oxidado (GSSG) y reducir H_2O_2 en H_2O e hidroperóxido lipídico (ROOH). A su vez, GSSG es reconvertido a GSH por la glutación reductasa (GSSG-R). Ambos procesos mantienen niveles bajos de GSH y protegen a la célula del daño por H_2O_2 a través de mecanismos dependientes de NADPH [15, 29].

Se han descrito 5 isoenzimas dependientes de selenio en mamíferos: GPx1 se distribuye en eritrocitos, riñón e hígado; GPx2 en tracto gastrointestinal; GPx3 en riñón; GPx4 altamente expresada en epitelio renal y testículos; y GPx5 en todos los tejidos [63]. Sin embargo, la mayoría de estas isoformas tienen distintos roles a nivel intestinal: GPx1 está altamente expresada en el tejido linfático del colón, lámina propia, submucosa, muscular y serosa, mientras que, en el epitelio, se encuentra específicamente la GPx2. En modelos experimentales de colitis inflamatoria y en mucosa de pacientes con EII se ha detectado una sobrerregulación de GPx2 identificado como un mecanismo de defensa contra el EO severo y como un indicador de que el H_2O_2 es un mediador

universal en el proceso inflamatorio intestinal [64]. Adicionalmente, GPx3 es secretada por las células epiteliales intestinales y tiene una acción de defensa antioxidante extracelular, mientras que GPx4 ha sido detectada en tejido colónico e íleon [1].

- **Hemo oxigenasa (HO):** Se han descrito 2 isoformas, HO-2, que está expresada constitutivamente, y HO-1, que es inducible. HO convierte un grupo hemo en biliverdina, monóxido de carbono (CO) y Fe^{2+} . Posteriormente la biliverdina se reduce a bilirrubina. Puede expresarse en numerosos tipos de células después de la exposición de diversos estímulos, incluido el grupo hemo, metales pesados, hipoxia y ROS. Aunque HO no se considera que tenga una función antioxidante directa, es ampliamente reconocido su efecto citoprotector y reductor de la peroxidación lipídica en respuesta a EO asociado con la producción de biliverdina y bilirrubina [65].

La transcripción de HO depende del factor nuclear relacionado con el factor 2 eritroide 2 (Nrf-2) es un factor de transcripción responsable de la regulación del equilibrio redox celular. Nrf-2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células. Se une a una secuencia de ADN específica conocida como Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE). Por otra parte, Keap1, una proteína citoplasmática, es responsable del secuestro citosólico de Nrf-2 en condiciones fisiológicas. En presencia de EO, la modificación de los grupos -SH en Keap1 o la fosforilación de Nrf-2 facilitan la disociación de Nrf-2 de Keap1, así como la translocación de Nrf-2 al núcleo, activando ARE y aumentando la transcripción del gen *Ho-1* [66]. Finalmente, se ha observado en modelos experimentales de EII una disminución de la expresión de Nrf-2 [67], mientras que en biopsias de tejido inflamado en humanos. (pacientes con CU un aumento de Nrf-2 ha sido observado) [68].

b) Antioxidantes no-enzimáticos endógenos

- **Glutati3n (GSH):** Es un tripéptido no proteínico, soluble en agua, constituido por tres aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina) y un grupo tiol derivado de cisteína, lo que lo convierte en un potente agente reductor. La reducci3n de dos GSH lleva a la síntesis de la forma oxidada de glutati3n mediante GSSG-R. El GSH también es sintetizado *de novo* a partir de aminoácidos de cisteína, glicina y ácido glutámico [63]. GSH está altamente expresado en el citoplasma (1-11mM), núcleo (3-15nM) y

mitocondrias (5-11mM), y es el principal antioxidante de estos compartimentos celulares. Una concentración suficiente de GSH en las células epiteliales del yeyuno y el colon, previene del daño del EO en el tejido mediante la eliminación de peróxidos nocivos [69].

- **Tiorredoxina (TRx):** Es una enzima oxidoreductasa que actúa como antioxidante, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Está presente en el citoplasma, membrana, mitocondrias y espacio extracelular. Cuando TRx se oxida (TRx-S₂) es reducida por la tiorredoxina reductasa (TRxR) para dar lugar a su forma activa, la cual tiene por función disminuir ROS y mantener las proteínas en su estado reducido [33]. En mucosa de colon inflamado de pacientes con CU se ha observado una disminución de la expresión de TRx [70].

c) Antioxidantes exógenos

- **Antioxidantes exógenos:** Diversos autores han realizado revisiones sobre los efectos de micronutrientes y elementos en la dieta en humanos con propiedades antioxidante. Algunos de los compuestos ampliamente descritos son los carotenoides (vitamina A), vitamina E, vitamina C, que ayuda a reparar y proteger el revestimiento de la mucosa contra las lesiones perjudiciales, vitamina D, cuya deficiencia es altamente asociada a pacientes con EC, ácidos grasos omega 3 con propiedades antiinflamatorias, además de minerales como selenio y zinc que interactúan con GPx y SOD para combatir ROS [33, 71]. Adicionalmente, los polifenoles, fitoquímicos con importante actividad antioxidante, podrían reducir el daño inflamatorio y la permeabilidad intestinal. Además, muchos de ellos podrían modular la actividad enzimática, suprimir los factores transcripcionales inflamatorios, aliviar el EO y reducir la secreción de citoquinas proinflamatorias [72]. Se estima que la ingesta dietética habitual de estos compuestos varía entre 50 a 800 mg/día [73].

Radical	Ecuación
MECANISMOS OXIDANTES	
iNOS	$\text{L-arginina} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{L-citrulina} + \text{NO}\bullet$ $2 \text{NADPH} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\hspace{1cm}} 2\text{NADP}^+$
NADPH oxidasa	$2\text{O}_2 + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{O}_2\bullet^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$
XO	$\text{HX} + 2\text{O}_2 + \text{NADPH} \longrightarrow \text{Xantina} + 2\text{O}_2\bullet^- + 2\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ $\text{Xantina} + \text{O}_2 + \text{NADPH} \longrightarrow 2\text{O}_2\bullet^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADP}^+ + \text{ácido úrico}$
MPO	$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{HOCl} \longrightarrow \text{}^1\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$ $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\hspace{1cm}} \text{H}_2\text{O}$
COX	$\text{AA} + 2\text{O}_2 \longrightarrow \text{PGG}_2 \longrightarrow \text{PGH}_2$
Metales de transición	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2\bullet^- \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ $\text{Reacción de Fenton: } \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\bullet$ $\text{Reacción neta de Haber-Weiss: } \text{O}_2\bullet^- + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OH}\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$
MECANISMOS ANTIOXIDANTES	
SOD	$2\text{H}^+ + 2\text{O}_2\bullet^- \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
CAT	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$
GPx	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2\text{GSH} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
GSSG-R	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \longrightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+$
HO-1	$\text{Hemo} + \text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{biliverdina} + \text{Fe}^{2+} + \text{CO} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
TRx	$\text{TRx}-(\text{SH})_2 + \text{Enzima } \text{S}_2 \longrightarrow \text{TRx}-(\text{S})_2 + \text{Enzima } (\text{SH})_2$ $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{TRx}-(\text{S})_2 \longrightarrow \text{NADP}^+ + \text{TRx}-(\text{SH})_2$

Tabla 1: Principales mecanismos oxidantes y antioxidantes del tracto gastrointestinal. **iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible; **XO:** Xantina oxidasa; **HX:** Hipoxantina; **MPO:** Mieloperoxidasa; **COX:** Ciclooxygenasa; **SOD:** Superóxido dismutasa; **CAT:** Catalasa; **GPx:** Glutathion peroxidasa; **GSSG-R:** glutatión reductasa; **HO-1:** Hemo-oxigenasa-1; **TRx:** Tiorredoxina. (Obtenido y modificado de Whittle e Vargas 2010, Bhattacharyya y cols 2014, Piechota-Polanczyk e Fichna 2014, Loboda y cols 2016) [24, 33, 65, 66].

3.2 VÍAS INFLAMATORIAS EN LA PATOGÉNESIS DE LA EII

Los mecanismos moleculares que explican el proceso inflamatorio comprenden la producción de mediadores inflamatorios tales como PG y NO• producidas por la actividad enzimática de COX e iNOS respectivamente, así como quimioquinas y citoquinas, incluidos TNF- α , las interleuquinas -1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, entre otras [74]. La iniciación del proceso inflamatorio se caracteriza por una infiltración masiva de neutrófilos y macrófagos, que producen altos niveles de citoquinas proinflamatorias [75].

El aumento de la concentración tisular de citoquinas permite que macrófagos no diferenciados (M0) se diferencien a macrófagos activos M1 (proinflamatorios). Los macrófagos M1 también pueden derivar a macrófagos M2 (antiinflamatorios) en presencia de altos niveles de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ . En condiciones normales, la mayoría de los macrófagos intestinales se diferencian en el fenotipo M2, bajo influencia de citoquinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-10 e IL-13, que presentan un efecto protector en células epiteliales [76]. A su vez, los macrófagos activos producen TNF- α , factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12, responsables de la diferenciación de células T naïve a células T helper (Th) específicas: Th1 (por acción principalmente de IL-12), Th2 y Th17 (por acción principalmente de IL-4 e TGF- β , IL-6, IL-21, respectivamente), claves en la iniciación y perpetuación de la EII [77, 78]. Por otra parte, las células T reguladores (*Treg*) pueden ser cruciales en la auto tolerancia y en la respuesta inmunitaria al suprimir las funciones de las células Th1 y Th2 mediante la liberación de citoquinas TGF- β e IL-10 [78, 79]. En modelos animales de colitis se ha demostrado que las células *Treg* tienen un rol relevante en el control de la respuesta inmune inflamatoria de la mucosa mediante una mayor producción de IL-10 [78]. Los mecanismos descritos involucran la auto activación y retroalimentación positiva de células Th1 y Th2 principalmente por IFN- γ e IL-4, respectivamente [77] (**Tabla 2**).

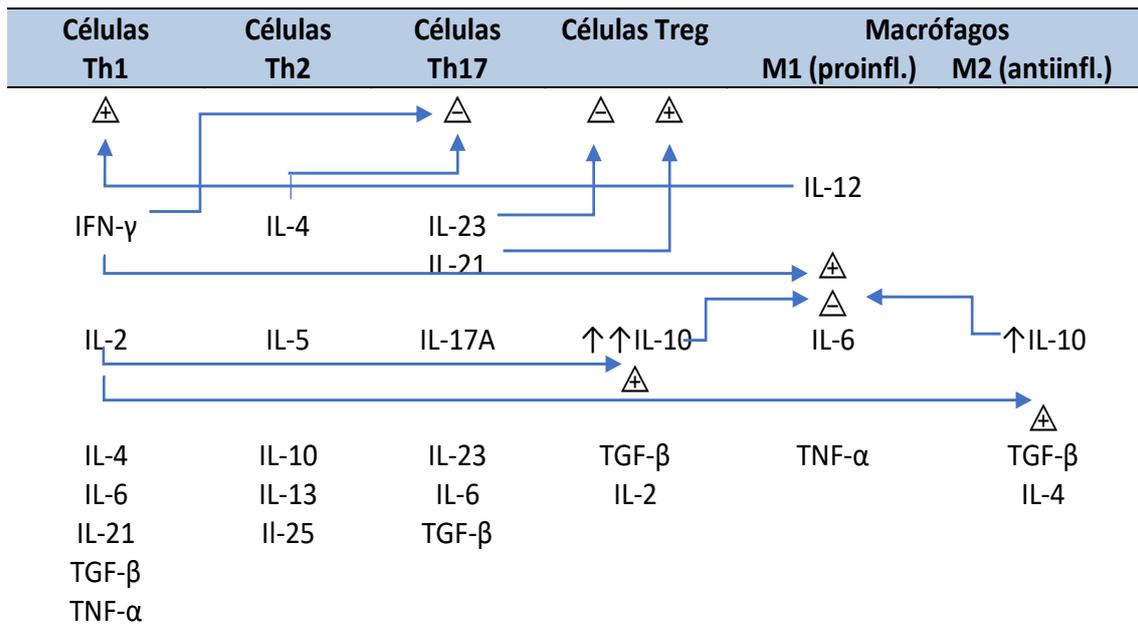


Tabla 2: Interacción entre las células implicadas en la inflamación de la EII. IL: Interleuquina; **IFN-γ**: Interferón-γ; **TGF-β**: factor de crecimiento transformante-β

Las vías de señalización intracelular involucradas en la respuesta inmune incluyen diversos mecanismos que se detallan a continuación (**Figura 2a**):

- a) Proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)
- b) Factores de transcripción
- c) Fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt)

a) Proteína quinasa activadas tgf-β por mitógeno (MAPK):

MAPK es activada por fosforilación y está compuesta por 3 grupos principales: ERK, también denominada p22/44, JNK y MAPK p38 [80]. En particular, MAPK p38 es clave en la modulación de diversos genes que controlan la infiltración de monocitos, inflamación intestinal aguda y secreción de agua y electrolitos intestinales [81]. Se ha demostrado que la actividad de MAPK p38, JNK y ERK aumenta en la mucosa de pacientes con EC activa, mostrando MAPK p38 un incremento más pronunciado [82]. Análisis inmunohistoquímicos de biopsias de mucosa inflamada muestran que la expresión principal de MAPK p38 está localizada en macrófagos y neutrófilos de la lámina propia [83]. Consistente con esto, en modelos de experimentación animal con EC, se ha observado un incremento de la fosforilación de p38. La activación de MAPK

p38 puede incrementar la secreción de IL-1 β y TNF- α , y éstas, a su vez, pueden activar la ruta MAPK p38 mediante mecanismos de retroalimentación positiva [84].

b) Factores de transcripción:

Se ha demostrado que existen vías de señalización intracelular que comprenden factores de transcripción como el factor transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) y la activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) desencadenan inflamación y controlan la expresión de genes específicos [74, 85]. En condiciones fisiológicas, NF- κ B, formado por la fracción p50 y p65 (también denominada RelA) permanece inactivo mediante la retención citoplasmática por una familia de inhibidores de κ B (I κ B α), las cuales enmascaran la secuencia de localización nuclear (NLS) de las proteínas NF- κ B y las mantienen secuestradas en un estado de inactivación. Tras diversos estímulos de activación, la enzima quinasa I κ B (IKK) fosforila la proteína I κ B α , que da lugar a la ubiquitinación y degradación de NF- κ B e induce la transcripción de genes esenciales para la inflamación, inmunoregulación, proliferación celular y supervivencia celular [86]. La activación clásica de NF- κ B puede ser iniciada por una amplia gama de estímulos que incluyen bacterias y componentes bacterianos como lipopolisacáridos (LPS), citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [87] y ROS [88].

Por otra, la unión de citoquinas con sus receptores de transmembrana induce la fosforilación de quinasa Janus (JAK), con la subsecuente activación de STAT citosólicas. Cuando se activa STAT3 se traslada al núcleo para promover la transcripción de los genes diana [89]. Se ha descrito que la unión de IL-23 con su receptor (IL-23R) induce la producción de IL-17 mediada por la fosforilación de STAT3 en células T CD4⁺ [90]. Las células Th17, además de producir IL-17, libera IL-21 y IL-23, importantes factores autocrinos, ya que activan el factor de transcripción STAT3 mediante sus receptores IL-21R e IL-23R, respectivamente [91, 92]. Aunque las células Th17 han sido implicadas en procesos inflamatorios, también pueden mostrar un efecto antiinflamatorio y proteger contra ciertas condiciones, principalmente mediante la producción de IL-22 que puede activar una respuesta proliferativa y anti apoptótica en tejidos a través de la activación de vías de señalización que involucran a STAT3 [93].

c) Fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt):

La activación de Akt está regulada por señales que involucran ROS, LPS, IL-1 β y TNF- α . Akt es capaz de activar iNOS y fosforilar IKK, que a su vez activa a NF- κ B. Se ha descrito que la activación de NF- κ B de manera dependiente de la vía PI3K/Akt lleva al incremento de la expresión de citoquinas involucradas en la EC [88]. Por otra parte, la activación de la vía PI3K/Akt en células T CD4⁺ lleva a la producción de IL-17 mediante la actividad de IL-23. Sin embargo, la activación de la vía PI3K/Akt, causada por IL-23, podría estar mediada por la fosforilación de moléculas de transducción como STAT3 y no estar asociada a la activación de NF- κ B [90].

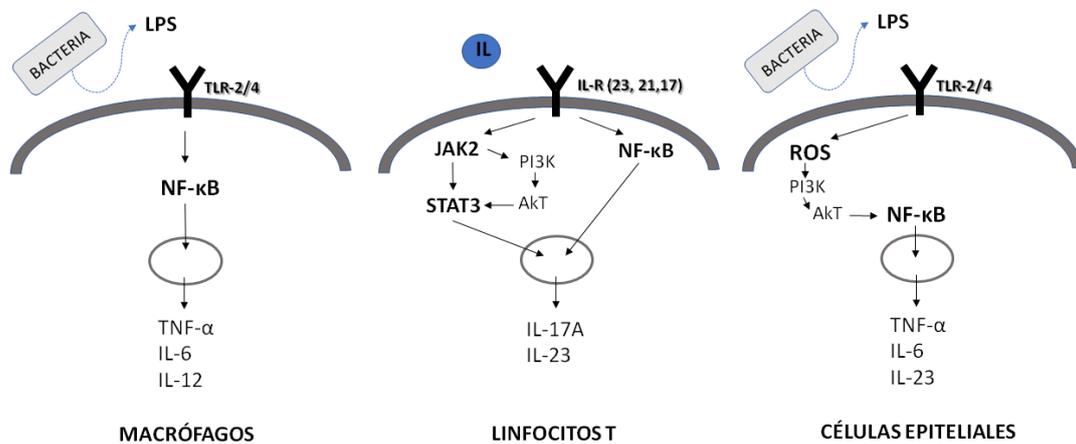


Figura 2a: Mecanismos inflamatorios y regulación del sistema inmune en EII. LPS: lipopolisacáridos; IL: Interleuquina; TLR: Receptor tipo-Toll; IFN- γ : Interferón- γ ; TNF- α : Factor de necrosis tumoral α ; STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3); JAK: Janus quinasa; PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

Hasta ahora, se ha sugerido que la CU es una respuesta inmunitaria aberrante impulsada por Th2 debido a elevados niveles de IL-4, TGF- β y, especialmente, IL-13 [94]. Por el contrario, la EC se ha asociado con respuestas aberrante de Th1 y a altos niveles de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β [95, 96]. Sin embargo, desde la descripción de Th17, la comprensión de la EII se ha expandido rápidamente debido a que estas células tienen un papel importante y controvertido en la patogénesis de esta enfermedad. Estudios *in vitro* demuestran que la IL-17A induce citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 [97, 98], mientras que en modelos de colitis mediados por transferencia de células T, la IL-

23, una de las principales citoquinas liberadas por Th17, es esencial en la promoción de la inflamación crónica. En modelos animales de colitis crónica y en humanos, tanto en EC como en CU, se ha observado un incremento de IL-23 e IL-17A en la mucosa del colon y en sangre periférica, junto con un aumento en el número y activación de linfocitos Th17 [99, 100].

Por otra parte, en procesos de inflamación crónica, como los que caracteriza a la EII, determinadas subpoblaciones de macrófagos, células dendríticas, así como células epiteliales, presentan un incremento en el número y actividad de receptores tipo-Toll (TLRs), que reconocen y se unen a patrones moleculares asociados a patógenos exógenos (PAMPs), y secretan citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-23, TNF- α) en la mucosa intestinal, tanto en CU como en EC [101]. Así mismo, determinados polimorfismos del gen *Tlr4*, que codifica el receptor de membrana TLR4, encargado del reconocimiento de lipopolisacáridos de las bacterias gram-negativas y del consiguiente incremento de citoquinas proinflamatorias vía NF- κ B, han sido relacionados con un incremento del riesgo de desarrollar EII [102].

Adicionalmente, la inflamación crónica relacionada con la EII conduce a alteraciones estructurales y funcionales del sistema nervioso entérico (SNE). Las alteraciones del SNE causadas por la inflamación incluyen una pérdida indiscriminada de neuronas y reducción de la liberación de neurotransmisores, entre otras características. En modelos animales se ha mostrado una reducción del recuento de neuronas mientéricas (HuC/D+) y la subpoblación no-nitrérgica de neuronas mientéricas (colinérgicas) (nNOS+) [103, 104], atribuida principalmente a la infiltración de células inmunes como eosinófilos, neutrófilos y células T [105].

3.3 RELACIÓN ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

El EO y la inflamación son procesos fisiopatológicos estrechamente vinculados entre sí. Las células inflamatorias liberan un arsenal de mediadores inflamatorios y especies reactivas en el sitio de la inflamación que conduce a un EO exacerbado. Al mismo tiempo, ROS y RNS pueden iniciar una cascada de señalización intracelular que incrementa la expresión de genes proinflamatorios [48] y generar oxidación de proteínas, lípidos y ADN, además de difundir hacia tejidos adyacentes y ocasionar daño y muerte celular [106, 107].

Algunos mediadores inflamatorios, como diversas citoquinas y TNF- α provenientes de células fagocitarias, pueden activar iNOS y producir NO \bullet . A su vez, TNF- α puede inducir la activación de NF- κ B y favorecer la generación de biomarcadores inflamatorios en el tejido colónico, como IL-1 β , TNF- α , PGE2 y NO \bullet [30]. En células mononucleares y en células epiteliales de la mucosa intestinal de pacientes con EC un incremento de NO \bullet y O $_2^{\bullet-}$, junto con citoquinas como TNF- α e IL-6, pueden activar las vías de señalización MAPK y NF- κ B. Por una parte, NF- κ B produce un incremento de la expresión de caspasa 3, moléculas de adhesión intracelular (ICAM), TNF- α e IL-6; mientras que la vía MAPK produce una activación de proteína activadora (AP-1) que lleva a un incremento de iNOS y por tanto de NO \bullet . Todo esto promueve la infiltración de neutrófilos y la perpetuación del daño tisular [24].

Por otra parte, células no fagocitarias, en presencia de estímulos inflamatorios como IL-6 o IFN- γ , activan la vía de señalización NF- κ B, incrementando la expresión de NOX4 y DUOX-2, y por tanto la producción de ROS [108-110]. Al mismo tiempo, los ROS son capaces de inducir inflamación mediante la activación de cascadas inflamatorias sensibles a oxidantes tales como NF- κ B, AP-1, STAT3 y MAPK, así como incrementar la expresión de receptores TLR2/4 con la consecuente activación de vías MAPK/NF- κ B [111], provocar daño en el ADN [112] y promover la activación del inflamasoma [113].

Los estudios que relacionan la terapia con antioxidantes y los compuestos naturales pueden tener efectos beneficiosos para los pacientes con EII ya que pueden influir en esta relación entre EO e inflamación [114].

3.4 INFLAMASOMAS

Recientemente se ha identificado que los inflammasomas y su actividad son necesarios para la homeostasis intestinal y fundamental para regular el sistema inmune intestinal [115]. Los inflammasomas forman parte de la inmunidad innata, la cual no sólo constituye la primera línea de defensa, sino que también es capaz de promover el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa [116]. El sistema inmune innato, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores TLR, son capaces de identificar PAMPs, mientras que las señales dañinas endógenas o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) son reconocidas por receptores citosólicos denominados receptores tipo-NOD (NLR), conllevando la activación de una respuesta inflamatoria [117]. A continuación, se detallan las principales características, mecanismos e implicaciones de inflammasomas en la EII, específicamente en la EC:

- a) Características de los inflammasomas
- b) Vías de señalización de NLRP3/IL-1 β
- c) Rol patogénico del inflammasoma NLRP3 en EII
- d) Inflammasoma NLRP3 como nueva diana terapéutica

a) Características de los inflammasomas

Los NLR son receptores citosólicos que regulan la inflamación y la apoptosis. Estructuralmente están constituidos por tres dominios: una región C-terminal, que contiene una secuencia rica en leucinas (LRR), mediante la cual se une a sus ligandos específicos, una región central que presentan un dominio de unión a nucleótidos, responsable de la oligomerización (NOD) y dependiente de ATP y un dominio de pirina N-terminal (PYD) [118]. Hasta la fecha, se han identificado ocho subtipos de inflammasomas; pertenecientes a la familia NLR, como por ejemplo NLRP1, NLRP3, NLRP6 y NLRC4, mientras que otros pertenecen a la familia ALR como AIM-2 (ausente en melanoma 2), también denominado PYHIN [116]. Sin embargo, la familia de los inflammasoma NLR es más específica para la maduración de las citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β e IL-18 [117].

NLRP3, hasta ahora el inflamasoma mejor caracterizado, es un complejo multiproteico conformado por la proteína adaptadora tipo “speck” asociada a apoptosis (ASC), que contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasa (CARD), y por cisteína-proteasa caspasa 1. ASC, a través de su dominio CARD, recluta y activa la caspasa 1. Finalmente, la caspasa 1 activada es la responsable de la maduración de pro-IL-1 β y pro-IL-18 para obtener las formas biológicamente activas, IL-1 β e IL-18 respectivamente [119]. NLRP3 se localiza asociado a la membrana mitocondrial y en la región perinuclear de las células, mientras que ASC, que se encuentra predominantemente en el núcleo, se asocia a las mitocondrias durante la activación del inflamasoma para su posterior unión con NLRP3 [120]. Sin embargo, algunos autores indican que NLRP3 es citosólico y no está asociado a ningún organelo específico [121]. Finalmente, para su ensamblaje y activación, NLRP3 requiere de diversos estímulos, como el flujo de cationes, captación de Ca²⁺ mitocondrial, acumulación de ROS/ROS mitocondrial (mtROS) y liberación de cathepsina B [116-118, 122, 123] (**Figura 3**).

Otro receptor citosólico tipo NOD, menos descrito, pero igualmente implicado en la regulación de la inflamación es el NLRP6. NLRP6 se expresa fuertemente en células epiteliales intestinales y en células caliciformes y su ensamblaje en el compartimento epitelial colónico podría resultar en la producción local de IL-18 que, a su vez, estimularía la regeneración y la función de la barrera epitelial [124]. En células epiteliales, la activación de NLRP6 protege de la colitis inducida por productos químicos mediante la prevención de desequilibrios microbianos intestinales, a través de la secreción basal de IL-18. [124], mientras que en ratones deficientes (knock-out) en NLRP6, se ha determinado una mayor susceptibilidad a la colitis inducida químicamente, indicando la importancia de la función NLR en el mantenimiento de la homeostasis intestinal para la prevención de una inflamación aberrante [125]. Adicionalmente, se ha descrito que la activación de NLRP6 en células caliciformes protegería de la colitis inducida por *Citrobacter rodentium* mediante la regulación de la producción de moco [126].

Recientemente, una revisión reevalúa el rol de IL-1 β y de IL-18 en EII. IL-18, que induce IFN- γ y promueve la respuesta Th1, por una parte, podría inducir citoquinas proinflamatorias y ser un factor de riesgo para la EII, pero también podría brindar protección contra la colitis y/o el cáncer asociado a colitis gracias a la activación de

células Th1 y célula natural killer (NK) que median una respuesta de proliferación y reparación en el tracto intestinal cuando el epitelio está lesionado. Respecto a la IL-1 β , los autores concluyen que aunque esta citoquina ha sido asociada al desarrollo de la inflamación, también podría estar implicada en la protección intestinal, al menos bajo ciertas condiciones como infección intestinal, debido a su capacidad de promover la fagocitosis [127].

b) Vías de señalización NLRP3/IL-1 β

La IL-1 β puede ser producida por diferentes tipos celulares, incluyendo, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, epiteliales y dendríticas. Esta citoquina se expresa en el citoplasma como proforma biológicamente inactiva y necesita ser procesada proteolíticamente por la caspasa 1 para su activación. Por su parte, la caspasa-1, se encuentra de forma inactiva en citoplasma, requiriendo del ensamblaje con inflamomas para su activación. Junto con su rol en la activación de IL-1 β , la caspasa 1 puede desencadenar piroptosis, un tipo de muerte celular programada asociada a inflamación [128].

En paralelo, el inflamoma NLRP3, que se expresa en niveles bajos o basales, particularmente en células fagocíticas no estimuladas, puede activarse y actuar en respuesta a señales exógenas y endógenas [115]. Se ha descrito que para su activación se requieren dos pasos o señales:

- **Paso 1:** Consiste en lo que se conoce como “priming” o señal pre estimuladora (señal 1), que ocurre cuando las células son activadas mediante un PRR o un receptor de citoquinas, que activa a NF- κ B y que es necesario para inducir la expresión del receptor NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18 [129].
- **Paso 2:** El segundo paso (señal 2) está asociado a modificaciones postranscripcionales que permiten el ensamblaje del inflamoma [122]. Esto puede ocurrir en respuesta a estímulos por LPS de origen microbiano, señales de peligro endógeno y por estímulos exógenos no microbianos, tales como ROS [130, 131]. Adicionalmente a las vías moleculares postranscripcional que controlan la activación de NLRP3, se han identificado mecanismos de regulación

por procesos que involucran la deubiquitinación de inflamasoma [132]. La ubiquitinación de NLRP3, mediante un inhibidor de la enzima deubiquitinadora (DUB), es capaz de generar un bloqueo en la activación de NLRP3 e inhibir el procesamiento y liberación de IL-1 β , tanto en macrófagos de ratón como de humanos [133].

Existe una gran diversidad de activadores de inflamasomas NLRP3, la mayoría de los cuales presentan como característica en común ser productores de ROS. Entre ellos se encuentran NADPH oxidasa [134], mtROS [135] y productores de ROS derivados de sistemas enzimáticos (COX y XO) [117]. La interrupción de la producción de ROS con inhibidores farmacológicos, generan un bloqueo de la activación de NLRP3, sugiriendo que la generación de ROS es requerida para la activación de la cascada de señalización asociada a inflamasoma [113]. Al mismo tiempo, se ha indicado que una vez activado el inflamasoma NLRP3 hay una infiltración de células inflamatorias que producen y amplifican la producción de ROS, causando un EO local severo y perpetuando la inflamación [136] (**Figura 3**).

Los eventos acontecidos posteriores a la activación de inflamasoma están poco estudiados, pero algunos estudios muestran que el complejo proteico se elimina mediante autofagia [137, 138].

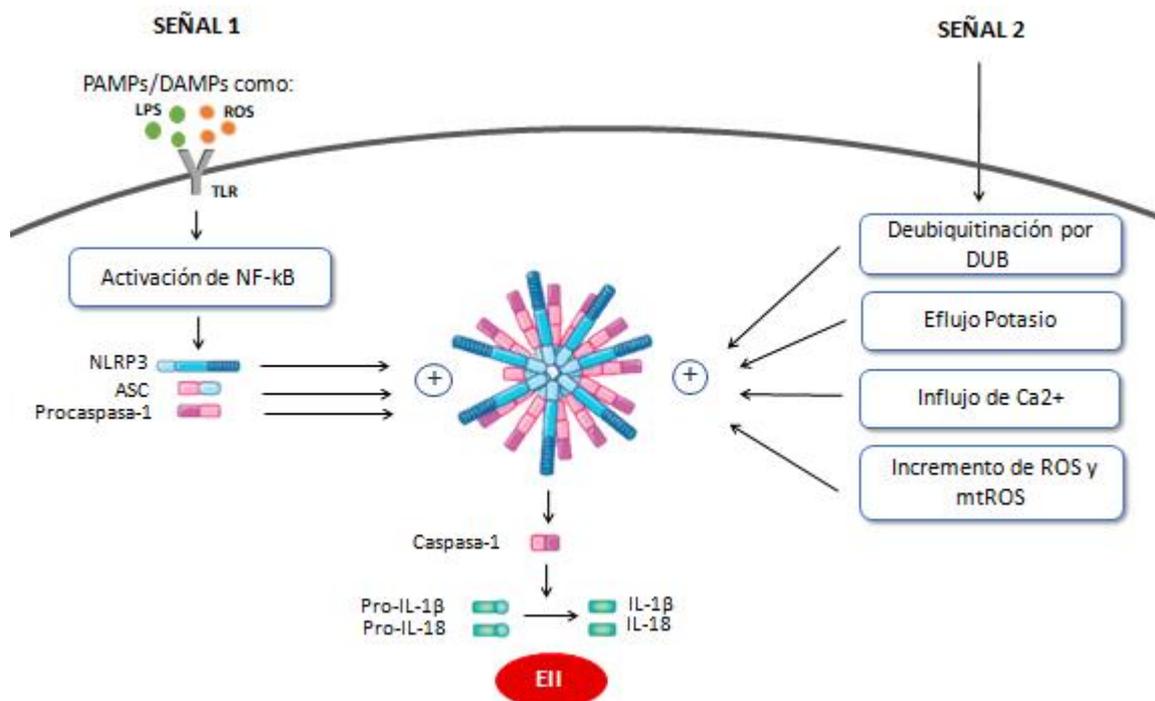


Figura 3: Componentes indispensables para ensamblaje y activación de inflamasoma NLRP3 (Obtenido y Modificado de Shao y cols., Heid y cols., Py y cols.) [132, 135, 139] **DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño; **PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos exógenos; **LPS:** Lipopolisacáridos; **TLR:** Receptor tipo Toll; **DUB:** enzima deubiquitinadora; **mtROS:** ROS mitocondrial.

c) Rol patogénico del inflamasoma NLRP3 en la EII

Como ha sido descrito previamente, el papel central del inflamasoma NLRP3 es activar la caspasa 1, que tiene por función promover a los precursores de IL-1 β e IL-18 a sus formas biológicamente activas. Ambas interleuquinas desempeñan un rol fundamental en la actividad de células *Treg* y en la diferenciación/amplificación de las células Th17 y Th1, las cuales están involucradas de manera crítica en el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa, en la inflamación crónica y en el desarrollo de tolerancia [116]. En concreto, se ha demostrado recientemente que IL-1 β , activada por el inflamasoma NLRP3, puede promover la diferenciación de las células Th17 y mejorar la proliferación de células Th1 [140], prolongar la supervivencia de células T y aumentar la producción de anticuerpos por la proliferación de células B [141]. Además, se ha descrito que IL-18 puede acrecentar la proliferación de células Th1 e incrementar la producción de IFN- γ [142] (**Figura 3**). El desequilibrio entre las células Th17 y las células *Treg*, mediado por la maduración de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β a través de

inflammasoma, se ha considerado como un nuevo paradigma en la patogénesis y desarrollo de las enfermedades autoinmunes [143-145]. Al mismo tiempo, en el epitelio, el inflammasoma es esencial para la regulación de la permeabilidad y la regeneración epitelial, debido a su capacidad de detectar microbios comensales, mientras que su activación excesiva dentro de la lámina propia podrían contribuir a la inflamación intestinal grave [146].

Estudios genéticos en individuos de ascendencia europea han evaluado mutaciones en el gen NLRP3, situado en el cromosoma 1q44 e implicado en la susceptibilidad de enfermedades autoinmunes como el Síndrome de Muckle-Wells o Artritis Reumatoide (AR). Estos estudios han detectado un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) fuertemente asociados con el riesgo de EC, observando asociaciones significativas entre SNPs, expresión de NLRP3 y producción de IL-1 β [147], con diferencias por sexo en el patrón de susceptibilidad genética [148]. En paralelo, un estudio realizado por Jarry y cols. en un modelo *ex vivo* de mucosa inflamada de pacientes con EC activa de larga duración, mostró un incremento de la producción de citoquinas derivadas de Th1, como IFN- γ e IL-18, que se correlacionan con la activación de caspasa 1 e inflammasoma y con la intensidad de inflamación intestinal [142]. En células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EC se ha observado un incremento significativo tanto en la activación del inflammasoma como de la producción de IL-1 β , mientras que en muestras de pacientes con CU las diferencias sólo son observadas en presencia de una enfermedad de larga duración [149].

En trabajos publicados en modelos animales, se ha detectado que la activación del inflammasoma NLRP3 es un mecanismo crítico en la inflamación intestinal en colitis inducida con DSS [150]. Del mismo modo, la supresión de la activación del inflammasoma mediada por una enzima denominada IRGM (GTPasa M relacionada con inmunidad) ha sido descrita como un componente protector de piroptosis e inflamación intestinal en un modelo experimental de EC [151].

d) Inflamasoma NLRP3 como nueva diana terapéutica

Debido al papel primordial en la patogénesis de la inflamación y autoinmunidad, es posible indicar que NLRP3 puede ser un elemento diana para el estudio de nuevos agentes terapéuticos. La comprensión de los mecanismos intrínsecos de NLRP3 en enfermedades autoinmunes ha conllevado al desarrollo de nuevos “target” terapéuticos con el fin de inhibir específicamente la activación del inflamasoma NLRP3 y/o sus mecanismos relacionados con su activación. A continuación, se mencionan algunos de los agentes descritos recientemente en la literatura dirigidos al tratamiento de las enfermedades autoinmunes:

- **Inhibición IL-1:** Pralnacasan, un inhibidor de la enzima convertidora de IL-1 (ICE), es capaz de inhibir la producción de IL-1 β , logrando remisión histológica en modelos experimental de EII y en Osteoartritis [150, 152].
- **Secuestradores de NLRP3, ASC y Caspasa 1:** La histona deacetilasa 6 (HDAC6) muestra una inhibición de la activación del inflamasoma NLRP3 a través de su interacción directa con NLRP3 ubiquitinado [153].
- **Inhibidores de receptores GPR:** Los ácidos grasos omega 3, incluidos el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) han mostrado inhibir los receptores GPR y sus mecanismos de señalización implicados en la activación y ensamblaje del inflamasoma [154].
- **Inhibidores de receptor purinérgico P2X7:** El uso de antagonistas no selectivos del receptor purinérgico P2X₇ atenúa la nefritis lúpica murina al inhibir la activación de la vía NLRP3/ASC/caspasa 1 [155].
- **Quelantes de Cobre:** Se ha identificado que el inflamasoma NLRP3 requiere de cobre intracelular para su activación. Un quelante de cobre clínicamente probado, el tetratiomolibdato, es capaz de inhibir NLRP3 a través de NF- κ B [156].
- **Secuestradores de ROS:** Quercetina, un importante flavonoide, puede inhibir la activación de NLRP3 mediante la protección de la integridad mitocondrial e inhibición de la liberación de mtROS, evitando la presencia de una de las principales señales de daño para la activación del inflamasoma [157].

4. MODELO ANIMAL

4.1 MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

El uso de animales es fundamental para abordar las preguntas de investigación básica y traslacionales en la EII. Los modelos experimentales, aunque no reproducen con exactitud la etiopatogenia de la EII, permiten comprender aspectos relacionados con la aparición del brote inflamatorio y el curso de la enfermedad, obtener información a nivel molecular y ser especialmente útiles en las pruebas preclínicas de diversos compuestos químicos o naturales en términos de sus efectos antiinflamatorios y/o antioxidantes [158]. Básicamente, los modelos animales para el estudio de la EII pueden clasificarse en tres categorías (**Figura 4**):

- Modelos espontáneos
- Modelos de transferencia celular
- Modelos inducidos

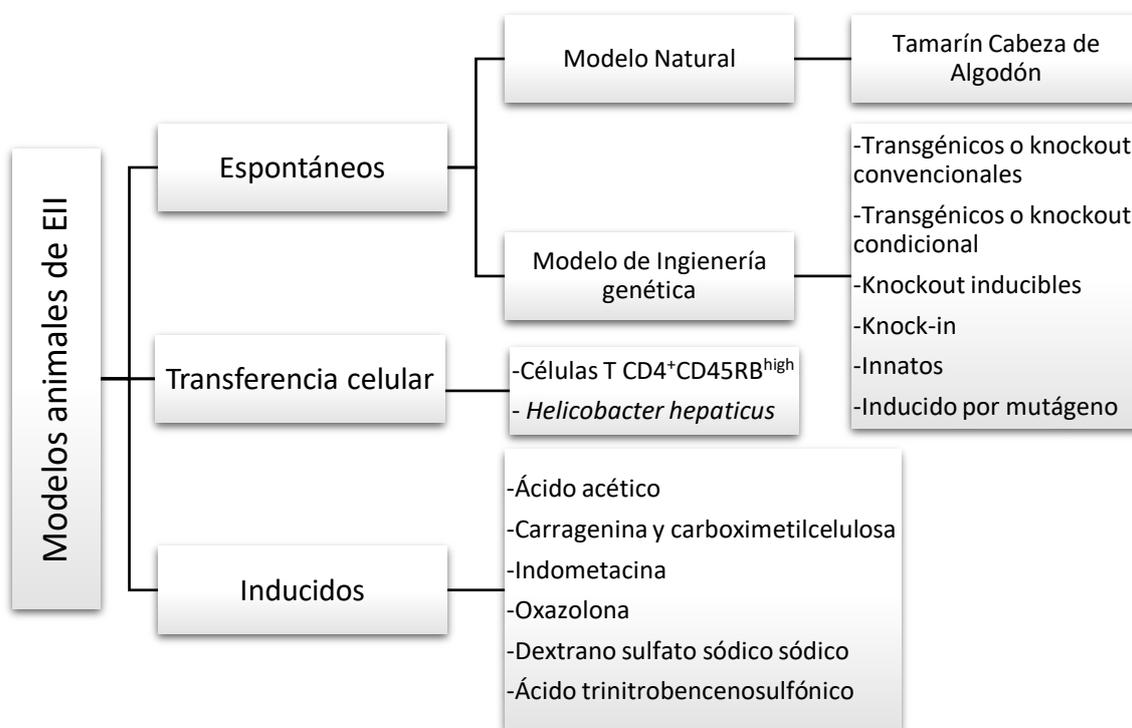


Figura 4: Modelos Animales de EII.

a) Modelos espontáneos

Representan una aproximación razonable al estudio de los factores que predisponen a padecer EII. En estos modelos experimentales, mutaciones en genes claves del sistema inmune conducen a procesos inflamatorios intestinales de diversa índole. Los modelos experimentales espontáneos engloban los modelos naturales o por manipulación genética [159]. De esta última, se ha informado que más de 74 tipos de cepas de ratones modificadas genéticamente desarrollan colitis y/o ileítis de forma espontánea, y de los más de 160 genes de susceptibilidad de EII descritos en el genoma humano, 20 tipos de modelos de ratones llevan los genes de susceptibilidad identificados en el humano. Además, más de 790 tipos de ratones modificados genéticamente, aumentan o disminuyen la susceptibilidad de desarrollar colitis cuando son inducidos químicamente [160]. Algunos modelos de EII espontánea se detallan a continuación:

- **Modelo natural:** Es el caso del tamarín cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*), un mono nativo de Colombia, que desarrolla una colitis espontáneamente cuando se mantiene bajo ciertas condiciones como: vivir en Estados Unidos, cautiverio y cambios de hábitos alimentarios [161, 162].
- **Modelo de ingeniería genética:** Estos al mismo tiempo pueden clasificarse en 9 subgrupos según la estrategia utilizada para la selección del gen [160, 163]:
 - **Transgénicos (Tg) o knockout (KO) convencionales:** Son modelos de ratones transgénicos diseñados genéticamente para sobreexpresar (Tg) o carecer (KO) de un gen de interés en todos los tipos de células. Algunos de los genes candidatos para el desarrollo de CU incluyen los genes que codifican para IL-10 y su receptor [164], *Ahr* [165], *Tlr α* [166], *Muc2* [167] y el receptor TCR α , que participa en el reconocimiento de antígenos por parte de las células T. Aproximadamente el 60% de los ratones KO para TCR α desarrollaron colitis espontáneamente mediada por Th2 a los 6 meses de edad [168]. En el caso de los modelos transgénicos, se ha observado que ratones Tg para IL-7, desarrollaron colitis crónica entre la 4 a 12 semanas de edad, con similitud

histopatológica a la CU en humanos [169]. En el desarrollo experimental de la EC, se distinguen algunos genes como *Agr2* [170], *Gpx1/2* [171] y algunos de los principales genes de susceptibilidad de EC como *Bach2*, represor transcripcional que regula la inmunidad tumoral y celular [172], y *Atg16l1*, que codifica para una proteína implicada en la autofagia [173]. Los ratones *Atg16l1* KO son altamente susceptibles a desarrollar una colitis aguda inducida químicamente [174]. A nivel sistémico, los ratones KO para IL-2 (y su receptor α y β) [175] desarrollan colitis, gastritis, hepatitis, pancreatitis, neumonía y anemia hemolítica.

- **Transgénicos (Tg) o knockout (KO) condicional:** También denominados modelos específicos celulares, son aquellos que sobreexpresa o carece de un gen de interés en un tipo de célula específica. Las células “target” son principalmente: células epiteliales, células T, células B, células T CD4⁺, células dendríticas, macrófagos y células Treg [160].
- **Transgénico negativo dominante (Dn):** Está diseñado genéticamente para sobreexpresar una proteína no funcional que interfiere con la función normal de una proteína diana por competición con su ligando o receptor. En ratones transgénicos portadores del receptor tipo II de TGF- β dominante negativo en células T CD4⁺ (CD4-dnTGF β RII), desarrollan espontáneamente inflamación a los 3-4 meses de edad, con un aumento de la expresión de las citoquinas Th1 y Th2 a nivel sistémico [176].
- **Knockout inducibles (iKO):** Este modelo permite eliminar un gen de interés en cualquier momento de la vida adulta del ratón. Por ejemplo, la delección inducible durante la vida adulta del ratón de factores de transcripción encargados de modular la respuesta inmune y diferenciación de células T, como Stat3 [177], o TAK1, quinasa intermediaria esencial en vías de señalización inmune innato [178], conduce a un rápido desarrollo de la colitis e ileítis.
- **Knock-in (KI):** Es aquel que lleva una mutación en un gen de interés para imitar el polimorfismo dentro del gen de susceptibilidad de la EII. Por ejemplo, en ratones KI heterocigotos y homocigotos con polimorfismo en el gen *Atg16l1*, exhiben una inducción autofágica defectuosa en macrófagos, junto con un aumento de la respuesta de citoquina inflamatoria (IL-1 β) y colitis [179].

- **Modelos innatos:** Basados en ratones con deficiencia inmunitaria. En este modelo, los ratones que carecen de un gen de interés (KO), no desarrollan inflamación intestinal en condiciones de inmunidad suficiente, pero el desarrollo puede inducirse cuando se cruzan con ratones inmunodeficientes. Por ejemplo, el desarrollo de la colitis experimental surge de la descendencia de cruce de ratones KO para genes de activación recombinantes (*Rag2*), carentes de células T y B y por tanto inmunodeficiente, con ratones KO para NFATc2, factor nuclear que controla la entrada de calcio a linfocitos T y que participa en su diferenciación [180, 181]
- **Inducido por mutágeno:** Los modelos inducidos por mutágenos llevan una mutación funcional aleatoria por tratamiento con N-etil-N-nitrosourea (ENU). Por ejemplo, un miembro de la familia de las proteínas YIPF, denominada YIPF6, encargada de mantener la morfología del aparato de Golgi y regular el sistema de transporte endomembranoso [182], ha sido involucrada en el desarrollo de ileítis y colitis. Se ha determinado que ratones mutantes *Yipf6* por ENU, son extremadamente sensibles a DSS y desarrollan inflamación intestinal espontánea a los 16 meses de vida [183].

b) Modelos de transferencia celular

El modelo de colitis por transferencia adoptiva de células T fue establecido por Powrie y cols., quien definió que la inflamación y lesión intestinal ocurre tras la transferencia de células T CD4⁺CD45RB^{high} naïve a huéspedes inmunodeficientes, por ejemplo, a ratones *Rag*^{-/-}. La reacción acontece debido al rol que juega la microbiota intestinal en proporcionar señales estimulantes a las células T para su activación, expansión y producción de mediadores inflamatorios [184, 185]. Otro modelo descrito de inflamación intestinal por transferencia celular es aquella por infección con la bacteria intestinal murina *Helicobacter hepaticus*. Cuando se combina la infección por *H. hepaticus* con transferencia de células T en ratones, se induce una colitis exacerbada [186]. Este modelo de transferencia celular proporciona una progresión predecible y repetible de las lesiones inflamatorias intestinales mediada por el sistema inmunitario,

al igual como ocurre en personas con EII, destacando la contribución de las células T a la patogénesis de la enfermedad [187].

c) **Modelos inducidos**

Modelos basados en la administración de agentes químicos, capaces de inducir inflamación intestinal aguda o crónica semejante a la colitis humana. Este tipo de modelo adquiere relevancia para la fisiopatología de la EII, además de ser un modelo cuyo procedimiento es sencillo, de rápida acción, relativamente económico y reproducible [188]. La colitis experimental puede inducirse mediante la administración oral, por vía subcutánea o mediante la administración de enemas intracolónicos. En general, se ha publicado que la colitis inducida por vía oral cursa con una fase aguda que puede durar varias semanas, mientras que la colitis inducida por enemas se limita a unos 3 días aproximadamente posinducción y su evolución tiende a resolverse de forma espontánea, sin aparición de nuevos brotes [159]. A continuación, se detallan las principales sustancias utilizadas para inducir EII en modelos animales:

- **Ácido acético (AcOH):** AcOH induce una inflamación aguda del colon que reproduce características típicas de la CU. La lesión colónica depende de las concentraciones y la duración de la exposición a AcOH. La acidificación celular masiva genera cambios relacionados con necrosis, edema, isquemia, lesiones epiteliales e inflamación local que se limita a la mucosa y submucosa. La inflamación en este modelo está asociado a la activación de NF- κ B y daño oxidativo [189, 190]. Actualmente, para la inducción de colitis se utiliza una concentración de AcOH diluido en agua o solución salina al 2 o 3%, pudiendo llegar a concentraciones de 7.5% en un volumen de 1.5 a 2 ml mediante la administración rectal en ratas Wistar macho. La pérdida de peso, la disminución de la producción de moco y el aumento del peso colónico son las manifestaciones comunes de este modelo [191, 192].
- **Carragenina y carboximetilcelulosa:** Son polisacáridos sulfatados de alto peso molecular extraídos de algas marinas y que se utilizan como espesantes y emulsionantes en la industria alimentaria [193]. Modelos animales han sido desarrollados con estos

aditivos alimentarios mediante la administración oral, en el agua de beber, a una concentración que varía entre el 1% y el 10% y durante un tiempo puede fluctuar entre 10 y 35 días [194-196]. Los modelos animales tratados con carragenina desarrollan síntomas relacionados con CU, que incluyen pérdida de pliegues haustrales, granularidad de la mucosa, abscesos de la cripta, infiltración linfocítica, congestión capilar, pseudo pólipos y estenosis [196]. Chassaing y cols., demostraron que ratones IL-10^{-/-} expuestos a carboximetilcelulosa y polisorbato-80 (otro emulsionante de uso común en la industria alimentaria) desarrollan una mayor permeabilidad intestinal y un adelgazamiento significativo de la capa de mucina, lo que lleva a una mayor proximidad de la microbiota al epitelio intestinal [197], mecanismos previamente descritos relacionados con la etiopatogenia de la EII.

- **Indometacina:** La depleción de PG y un incremento del EO, asociado a una disminución de enzimas antioxidantes en la membrana del borde del cepillo, puede desempeñar un papel clave en la patogénesis de la enteritis inducida por antiinflamatorio no esterooidal (AINES), como la indometacina [198], repercutiendo negativamente en el mantenimiento de la función mucosa. Los modelos inducidos por indometacina muestran características generales e histológicas que imitan a la EC. Los protocolos descritos, para inducir la inflamación a nivel del intestino delgado, comúnmente usan ratas, y administran entre 2 y 3 inyecciones subcutáneas de indometacina a una concentración entre 7,5 mg/kg y 10mg/kg, de forma continua o días alternos [199-201]. Se ha descrito que la indometacina produce, entre el séptimo a décimo día desde su administración, cambios tanto en la serosa como en la mucosa del íleon (hiperemia y/o sangrado petequeal, erosión, lesiones adhesivas y hemorrágicas en la serosa y el mesenterio), junto con una pérdida masiva de la capa epitelial, edema en la submucosa e infiltrado inflamatorio mixto transmural [202].

- **Oxazolona:** La administración de 150ml de oxazolona, un agente de haptización, por vía intrarrectal a una concentración de 7.5 mg/ml en etanol (EtOH) al 50%/H₂O induce colitis aguda mediada por Th2 [203]. Las manifestaciones clínicas de este modelo son pérdida de peso, heces blandas con pus y sangre. Se ha descrito que la colitis inducida por oxazolona daña la barrera de la mucosa intestinal y desencadena una

respuesta inmunológica típica de CU. La inspección histológica del colon revela una afluencia mixta de células inflamatorias en la lámina propia, la destrucción de la mucosa, pérdida de criptas, edema, fibrosis, pequeños focos de úlcera y secreción de IL-4 y IL-13 por células Th2 CD4⁺ y células NK [204].

- **Dextrano sulfato sódico (DSS):** El DSS es un polímero sulfatado, soluble en agua y con un peso molecular muy variable (5-1400 kDa). El DSS es tóxico para las células epiteliales intestinales y altera la integridad de la mucosa, con pérdida de criptas, infiltración de células inflamatorias en la mucosa y submucosa, edema de la submucosa, erosión y ulceración. La gravedad de la inflamación intestinal inducida por la administración de DSS difiere según peso molecular. El DSS de 5 kDa induce una colitis leve con predominio en el ciego y colon superior, mientras que la administración de DSS de 40 kDa causa una colitis grave en la parte más inferior del colon [205]. La administración de 3-10% de DSS se realiza por vía oral, en el agua de beber y en cepas de ratones C57BL/6, machos de 8 a 16 semanas de edad [206]. Específicamente, la colitis aguda se induce mediante la administración de DSS al 3.5% durante 7 días o a 3.5% durante 5 días [206]. Para un modelo murino de colitis crónica, se realiza la administración de DSS de forma cíclica. La bibliografía sugiere tres ciclos al 2% (p/v) de DSS durante 7 días con intervalos de 14 días entre ciclos, generando una inflamación intestinal crónica caracterizada por un período de inactividad y reactivación de la enfermedad [188].

- **Ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS):** En La década de las 80, Morris y cols. describieron por primera vez la inflamación crónica en ratas mediante la inducción, por administración intrarrectal, de un agente heptano denominado TNBS en solución EtOH. Los estudios valoraron la presencia de inflamación intestinal cada semana por 8 semanas consecutivas, determinando una inflamación muy marcada las primeras 2 semanas posinducción, con una tendencia a la remisión después de la sexta semana.

Las características del modelo desarrollado por Morris y cols. se indican en la **Tabla 3** [207]:

Metodología del Modelo				Resultados	
				Clínicos	Histológicos
Tipo	Rata Sprague-Dawley	Vía	Intracolónica	-Pérdida de peso	-↑ peso de tejido colónico
Sexo	Hembra	Dosis	Única dosis 30mg por rata en 50% de EtOH/0.25ml	-Diarrea en 90% de los casos	-Engrosamiento de la pared intestinal
Peso	250 – 300g	Tiempo	De 1 a 8 semanas posinducción	-3% de mortalidad	-Inflamación transmural
Edad	s/i				-Infiltración por leucocitos PMN
					-Edema
					-Disrupción de las criptas
					-Granulomas (semana 3)
					-Úlceras, sin perforación (semana 8)
					-↑MPO

Tabla 3: Modelo de Inflamación colónica propuesto por Morris y cols. s/i: Sin información; **MPO:** Mieloperoxidasa; **PMNs:** Polimorfonucleares. (Obtenido y modificado de Morris y cols.) [207]

Actualmente, la administración de TNBS o DNBS (ácido dinitrobenzenosulfónico) empleados en este modelo se realiza a concentraciones variables de EtOH y dosis [188, 208]. En general, la inflamación intestinal de estos agentes tienen rasgos característicos de la EC en humanos, incluyendo: severa inflamación transmural, diarrea, pérdida de peso, inducción de IL-12 mediada por Th1 [209, 210] y activación de inflammasoma mediada por caspasa 1 [211].

4.2 MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE CROHN INDUCIDO POR TNBS

Entre los modelos de colitis experimental más empleados en la actualidad destacan la colitis inducida por TNBS y por DSS [211-216]. Estos modelos, son útiles para evaluar la eficacia de tratamientos profilácticos o terapéuticos, así como para estudiar los efectos sobre la salud intestinal de diversos componentes nutricionales [206]. El TNBS es un método económico y relativamente rápido en desencadenar un proceso inflamatorio. La inflamación generada simula estrechamente diversos aspectos clínicos, histopatológicos, moleculares y características inmunitarias de la EC en humanos [75, 84, 85, 215, 217, 218]. Debido a esto, en la presente investigación el TNBS ha sido seleccionado como modelo experimental agudo de EC. A continuación, se detallan las características de este modelo (**Tabla 4**):

- a) Especie, cepa y dosis
- b) Mecanismos de acción
- c) Modelos de inflamación aguda y crónica
- d) Fisiopatología
- e) Relevancia del modelo en el estudio del estrés oxidativo e inflamación

a) Especie, cepa y dosis

La susceptibilidad a la inflamación intestinal por TNBS varía entre diferentes cepas de ratones. Mientras que las cepas de ratones C57BL/6 y DBA/2 son resistentes, C3H/HeJ, BALB/c y SJL/J son susceptibles a la enfermedad [219]. Se ha demostrado que la susceptibilidad a CU y EC de estas cepas está determinada genéticamente por el cromosoma 9 (más fuertemente asociado a machos) y en el cromosoma 11 (más asociado a hembras). El locus asociado al cromosoma 11, gen p40 (IL)-12, es un regulador de IL-12, la cual es reconocida como un mediador clave en la respuesta inflamatoria intestinal [210].

La vía de administración del TNBS más frecuente para inducir inflamación es mediante colon. La concentración de TNBS utilizada, junto con EtOH, varía ampliamente en la literatura. En general, las dosis utilizadas se encuentran en un rango de 50 a 150

mg/kg de peso corporal, mientras la concentración de EtOH puede variar entre un 25% y un 50% [85, 103, 217, 220, 221]. Por otro lado, la inducción de la inflamación aguda con una única dosis de TNBS en altas concentraciones (>150mg/kg) está acompañada, en la mayoría de los casos, por una alta tasa de mortalidad [222]. Del mismo modo, dosis inferiores a las descritas han sido utilizadas en repetidos ciclos con el fin de provocar brotes de inflamación [67, 104, 223].

b) Mecanismos de acción

La administración de EtOH es un requisito para el modelo experimental inducido por TNBS. Las propiedades cáusticas de la solución TNBS-EtOH pueden causar lesiones extensas agudas en el colon. Además, el EtOH es capaz de romper la barrera mucosa del tejido intestinal, aumentar la permeabilidad y permitir la penetración de TNBS en la lámina propia, actuando como un antígeno luminal. A continuación, el TNBS se acopla a proteínas de alto peso molecular localizadas en la mucosa colónica y a proteínas microbianas intestinales, para iniciar la respuesta inmunológica. De este modo se desencadena una respuesta inmune innata y adaptativa del huésped, dando lugar al desarrollo de una inflamación grave, granular y transmural, propias de la EC [207, 208].

c) Modelos de inflamación aguda y crónica

Desde su primera descripción como modelo de daño intestinal, diversos estudios han determinado que el TNBS causa una inflamación colónica aguda, caracterizada por pérdida de peso significativa los primeros días de la inducción, daño histológico [85] e inflamación [218], la cual remite o se cura casi completamente a partir de la tercera semana posinducción [75, 207, 218, 223] (**Figura 5**). Sin embargo, la colitis quiescente puede reactivarse mediante la reexposición al antígeno. Appleyard & Wallace [223] mostraron que la administración de una pequeña cantidad de TNBS por vía intravenosa durante 3 días después de 6 semanas de la inducción rectal con TNBS, las ratas presentan un brote inflamatorio en el colon distal. Recientemente, diversos autores han descrito modelos de inflamación crónica mediante una primera dosis de sensibilización de TNBS a través de uso tópico o rectal para luego una administración por vía

intracolónica o intravenosa [67, 75, 104, 217]. Estos resultados indican que la readministración de TNBS, seguido por dosis a repetición, genera estadios de brote y remisión, imitando la clínica en humanos con EC.

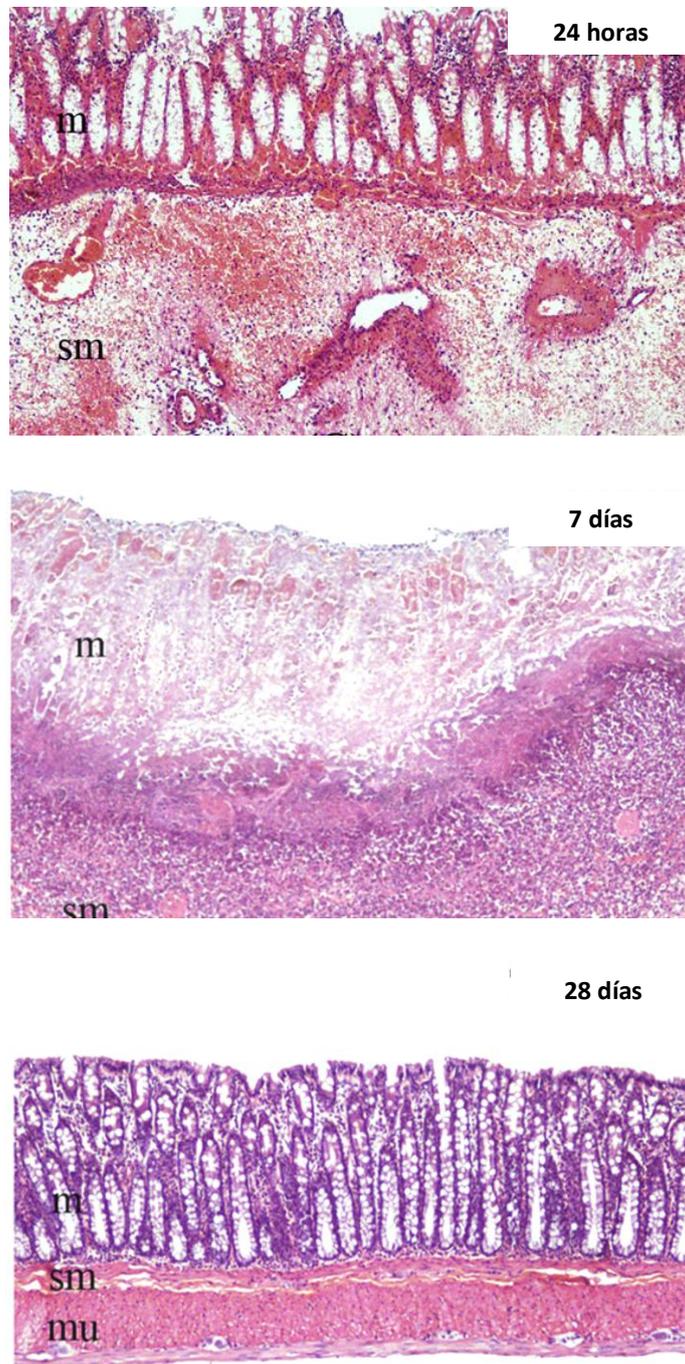


Figura 5: Evolución histológica de la inducción de EC mediado por TNBS. (Obtenido de Vicentini y cols.) [103].

d) Fisiopatología

En primera instancia, el TNBS induce un incremento de quimioquinas (citoquinas quimioatrayentes) como MIP-1 α , MCP-1, MIP-2 y Gro- α , que participan en el reclutamiento de leucocitos en el tejido intestinal [75, 224]. A continuación, el TNBS genera una respuesta inflamatoria aguda mediada por granulocitos como neutrófilos, lo cual se ha confirmado en diversos estudios por un incremento de la actividad de MPO en el tejido colónico [85, 215, 220]. Posteriormente, se ha descrito que en fase crónica (lograda por repetidas dosis de TNBS), existe una infiltración de linfocitos TCD4⁺. Dado que la colitis tipo Crohn inducida por TNBS está mediada por linfocitos Th1, es posible observar además un incremento en la producción de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-12, que jugarían un rol clave en el mantenimiento y perpetuación de la enfermedad [75, 220]. Además de las células Th1, las células Th17 también desempeñarían un papel importante en la patogénesis de la EC. Varios estudios han descrito la activación de la vía Th17/IL-23 junto con un incremento de IL-17A e IL-22 en la inflamación inducida por TNBS [225, 226]. El rol de las células Th17, que expresan el receptor IL-23R en su superficie, está fuertemente apoyado por estudios recientes de asociación de genoma, que demuestran que *Il-23r* y otros genes involucrados en la diferenciación de células Th17, son genes de susceptibilidad genética para la EC [227]. Adicionalmente, está ampliamente aceptado que la transcripción de citoquinas inflamatorias derivadas de Th1 y Th17 dependen de la activación de NF- κ B [67, 85, 220, 228], que está vinculada a una cascada secuencial que incluye la fosforilación y degradación de I κ B α , así como la translocación de la subunidad NF- κ B p65 (RelA) al núcleo [229]. Por su parte, IL-10, una citoquina antiinflamatoria, se encuentra disminuida en la inducción por TNBS [220], aunque algunos autores han descrito un aumento de IL-10 [67], muy probablemente por mecanismos compensatorios.

Recientemente, ha sido descrito en un modelo experimental con TNBS la existencia de una sobrerregulación del complejo inflamasoma NLRP3/ASC. Este complejo proteico participa en procesos inflamatorios mediante su activación para promover la maduración de citoquinas IL-1 β e IL-18 dependiente de caspasa-1, y favorecer la inflamación [221, 230].

Una vez que las células inflamatorias se infiltran en la mucosa colónica son capaces de generar EO, produciendo ROS y RNS. Algunos marcadores sanguíneos de EO tales como tioles y proteínas carboniladas están alterados en animales tratados con TNBS. Se evidencia en este modelo una reducción en la concentración de tioles y un aumento en los niveles de proteínas carboniladas tan sólo a las 24 horas y a los 7 días posinducción, comprobando un estado oxidativo en estos períodos [103]. Al mismo tiempo, se ha descrito una subregulación de mecanismos antioxidantes, tales como una reducción en la expresión de HO-1 y de Nrf-2 en ratones con TNBS [67]. Sin embargo, otros autores han demostrado una sobrerregulación de HO-1 en tejido inflamado, pero no en sitios proximales ni en modelos de inflamación crónica. Estos resultados indicarían una inactivación temprana del sistema de defensa endógeno y antioxidante, mediada por reguladores postranscripcionales que conducirían a una inhibición de la expresión de HO-1, favoreciendo las recidivas propias de la cronicidad en la EC [104].

Finalmente, la alteración observada en IECs, que forman parte importante de la barrera y homeostasis intestinal, sería crucial en la patogénesis de la enfermedad. Se ha informado que la apoptosis de las IECs estaría mediada por la activación de caspasa-3 [84, 217]. Posiblemente, los ROS propiciarían un incremento significativo en la expresión de proteínas Bax y una ligera elevación de proteínas antiapoptóticas, aumentando el ratio Bcl-2/Bax [217, 231]. Conjuntamente, estudios realizados por Xu y cols. [220] sobre los niveles de proteínas de uniones estrechas, como ocludina o Zonulina-1 (ZO-1), han mostrado una disminución en el modelo de EC por TNBS, lo cual favorecería la permeabilidad intestinal y la translocación bacteriana.

e) Relevancia del modelo en el estudio del estrés oxidativo e inflamación

Debido a los mecanismos previamente descritos, tales como inflamación mediada por Th1 /Th17, procesos inflamatorios, apoptosis de IECs y presencia de EO, la colitis inducida por TNBS es una herramienta útil para el estudio patogénico de la EC, ya que comparte propiedades significativas con la EC en humanos. Asimismo, el uso de modelos experimentales permite una valoración preclínica de la seguridad y eficacia de nuevas terapias tales como inmunosupresores, terapias biológicas o componentes

bioactivos [232], cuyo enfoque terapéutico coincide con los mecanismos patogénicos o vías moleculares implicados en este modelo animal [233].

Ref.	Animales			Modelo	Inducción con TNBS					Resultados		
	Cepa	Sexo	Edad (s) Peso (g)		Vía	Dosis	EtOH %	N° de Veces	Tiempo	Clínicos	Histológicos	Moleculares
[207]	Rata Sprague-Dawley	♀	s/i 250-300	A	IC	30 mg/rata	50	1	Hasta semana 8	-Diarrea -↓Peso corporal	-↑Peso tejido colónico -Adhesión, úlcera (octava semana) -↑ MPO en tejido colónico -↑daño histológico -Inflamación transmural -Granuloma (tercera semana)	s/i
[85]	Rata Wistar	♂	s/i 180-220	A	IC	10 mg/rata	50	1	Hasta día 2	-Piloerección -Postración -Hipomotilidad -↓Peso corporal	-↑Peso tejido colónico -Adhesión, necrosis, edema, úlcera y hemorragia. -↑ MPO en tejido colónico -↓Arquitectura de la mucosa -↓ Capa de mucina -Infiltrado mixto	-↑COX-2 -↑iNOS -↑MAPKs (pJNK, p38, pERK1/2) -↓IκBα -↑p65
[84]	Ratón BALB/c	♀	8 - 10 18-20	A	IC	0.1 ml al 2.5% (p/v)	50	1	Hasta día 3	-↓Peso corporal	-Edema, úlcera y engrosamiento de la pared intestinal. -↓Células epiteliales -Infiltrado inflamatorio en la lámina propia	-↑p38 MAPKs -↑VPS4B en IEC -↑Caspasa 3 -↑PARP
[217]	Ratón C57BL/6J	♂	8 - 12 20-25	A	IC	2 a 2.5 mg/ratón	50	1	Hasta día 2	-↓Peso corporal	-Hiperemia, necrosis, fibrosis y úlcera -↓Células caliciformes -Infiltrado inflamatorio	-↑ citoquinas Th1: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-1β, IL-6 -↑ citoquinas Th17: IL-17 y IL-23 -↑ Apoptosis de IECs -↑ permeabilidad -↓Ratio Bcl2/Bax -↑Caspasa-3

Ref.	Animales			Modelo	Inducción con TNBS					Resultados		
	Cepa	Sexo	Edad (s) Peso (g)		Vía	Dosis	EtOH %	N° de Veces	Tiempo	Clínicos	Histológicos	Moleculares
[215]	Ratón BALB/c	♂	8 a 10 22-28	A	IC	4 mg/ratón	30	1	Hasta día 7	s/i	-Úlcera -Inflamación de la mucosa -↑ MPO en tejido colónico -↑ Daño microscópico (células caliciformes, abscesos, destrucción mucosa, engrosamiento capa muscular)	s/i
[225]	Ratas Wistar	♀	210 -250	A	IC	25 mg/rata	50	1	s/i	-↓ Peso corporal	-↑ peso tejido colónico -Edema, úlcera, hemorragia -Destrucción de las glándulas epiteliales. -↓ Células caliciformes -Infiltración intensa de la mucosa y submucosa. -Células positivas para TNF- α , linfocitos TCD3, CD4, CD8 y CD45, CD11b, IL-17, IL-22 en mucosa y submucosa por IHQ	-↑ IL-17 -↑ IL-22
[221]	Rata Sprague-Dawley	♀	s/i 160-180	A	IC	80 mg/kg	50	1	Hasta día 7	-↓ Peso corporal -↑ DAI -Diarrea	-Engrosamiento del colon -Edema, úlcera e hiperemia. -Infiltración de la mucosa por neutrófilos -↑ MPO en tejido colónico - ↑ NF-kB p65 en núcleo por IHQ -↓ I κ B α por IHQ	-↑ TNF- α , IL-6 en tejido. -↑ pro-IL-1 β , IL-1 β p17 maduro, pro-IL-18, IL-18 p18 maduro en tejido. -↑ NLRP3 -↑ Caspasa 1

Ref.	Animales			Modelo	Inducción con TNBS					Resultados		
	Cepa	Sexo	Edad (s) Peso (g)		Vía	Dosis	EtOH %	N° de Veces	Tiempo	Clínicos	Histológicos	Moleculares
[103]	Rata Wistar	♂	9-12 300-390	A	IC	0.3 ml al 5% (p/v)	30	1	Hasta día 1, 7 y 28	-↓Peso corporal	-Necrosis, úlcera y engrosamiento de la pared intestinal. -↑MPO en tejido colónico -↑Daño microscópico -↓Neuronas HUC/D) y nNOS-	-↓Concentraciones -↑Proteínas Carboniladas
[218]	Ratón C57BL/6J	s/i	8 a 10	A	IC	150μL de 2.5% (p/v)	50	1	Hasta día 2, 7 y 20	-↓Peso corporal -↑DAI -Heces sanguinolentas -Diarrea	-↑Ratio peso/Longitud del tejido colónico -Congestión vascular -Depósitos de fibrina -Edema y necrosis. -Infiltrado transmural de células mononucleares.	-↓DP8, DP9 sérico y en tejido colónico. -↓Enzima DPP IV/CD26
Todos los resultados son revertidos el día 20.										-↓Peso corporal -Bradiquinesia -↓ingesta alimentaria. -Heces sanguinolentas y con mucosidad -Diarrea	-↓Longitud tejido colónico -Erosión, necrosis e hiperemia -Inflamación de la mucosa -↑ MPO en tejido colónico -↓T-SOD	-↑Endotoxina y TNF-α en tejido colónico y suero -↓IL-10 en tejido colónico y suero -↓ZO-1 y Ocludina -↑TLR-4 -↓NF-kB p65 e kBα -↑plkBα
[220]	Rata Sprague-Dawley	♂	s/i 180-220	A	IC	20 mg/rata	50	1	Hasta día 10			

Ref.	Animales			Modelo	Inducción con TNBS					Resultados		
	Cepa	Sexo	Edad (s) Peso (g)		Vía	Dosis	EtOH %	N° de Veces	Tiempo	Clínicos	Histológicos	Moleculares
[230]	Rata Wistar	♂	8 s/i	A	IC	10 mg/rata	50	1	Hasta día 2	-↓Peso corporal -Heces sanguinolentas -Diarrea	-Acortamiento tejido colónico -↑Relación peso/talla de tejido colónico. -Necrosis, edema, úlcera y hemorragia. -Infiltración de la mucosa por neutrófilos -↑ MPO en tejido colónico -↓ Glándulas -Destrucción de las glándulas epiteliales	-↑IFN-γ e IL-10 en tejido -↑iNOS -↑COX-2 -↑pSTAT3 -↓IκBα -↑NLRP3 -↑ASC -↑Pro-caspasa 1 -↑Caspasa escindida -↑IL-1β e IL-18
[223]	Rata Wistar	♂	s/i 175-200	C	IC IV	60 mg/ml 5 mg/Kg	50	1 3	6 semanas 3 días consecutivos	-Heces sanguinolentas -Debilidad	- Engrosamiento del colon - Adhesión, úlcera - ↑ MPO en tejido colónico - Inflamación transmural.	-Sin cambios en RMCP plasmático.
[75]	Ratón BALB/c	♂	6 – 8 s/i	C	IC IC	3 mg/ratón	50	1 1	Hasta día 10 Hasta día 18	-↓Peso corporal -Diarrea -Heces sanguinolenta -Prolapso rectal	-Engrosamiento del colon -Hiperemia, necrosis, úlcera, fibrosis -↓ Células caliciformes -Infiltración transmural por neutrófilos y linfocitos -↑ MPO en tejido colónico en la 1° dosis	-↑citoquinas quimiotácticas: MIP-1α, MCP-1, MIP-2, and Gro-α en 1° dosis -↑TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 en tejido colónico y suero. -↓IL-10 en tejido -↑SAA sérica -↑Linfocitos TCD4+ en lámina propia -↑IFN-γ e ↓IL-4

Ref.	Animales			Modelo	Inducción con TNBS					Resultados		
	Cepa	Sexo	Edad (s) Peso (g)		Vía	Dosis	EtOH %	N° de Veces	Tiempo	Clínicos	Histológicos	Moleculares
[104]	Rata Sprague-Dawley	♂	s/i 200-220	C	IC	10	25	1	Hasta día 14	-Debilidad	-Hiperemia	-↑ Expresión de mARN y proteínas de HO-1
					IC	10 mg/rata		2	Cada 2 semanas hasta día 2, 4, 8	-Diarrea - Heces sanguinolenta	-↓ Neuronas Mientéricas (HUC/D)	
[67]	Ratón BALB/c	♀	8 18-22	C	UT	3,75 mg/ratón	50	1	Día 0	-↓ Peso corporal	-Acortamiento tejido colónico	-↑ TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-10.
					IC	0,75 mg/ratón			Cada semana		-↑ peso tejido colónico	-↑ COX-2
					IC	1,0 mg/ratón		3	por 3 semanas		-Inflamación	-↑ iNOS
					IC	2,5 mg/ratón					-↓ Arquitectura de la mucosa	-↑ NF-κB-p65
[234]	Ratón Balb/c	s/i	7-8	C	IC	0.5 mg/ratón	30	6	Cada 1 semana	-↓ Peso corporal	-Engrosamiento del colon	-↑ CD86 (macrófagos)
						0.75 mg/ratón	45				-Inflamación intensa	-↑ CD206 (macrófagos M2)
						1.0 mg/ratón	45					
						mg/ratón						

Tabla 4: Resumen de los principales modelos animales de EC inducida por TNBS. s/i: Sin información; A: Agudo; C: Crónico; IC: Intra-colónica; SB: subcutáneo; IV: Intravenosa; UT: Uso tópico; RMCP-II: Proteasa II de mastocitos de ratas; IECs: células epiteliales intestinales; FITC: isotiocianato de fluoresceína; Bcl-2: Células B-Linfoma 2; Bax: proteína x asociada a Bcl-2; DAI: Índice de actividad de la enfermedad DP: Dipeptidilpeptidasa; DPP IV/CD26: enzima dipeptidilpeptidasa del gen CD26; MPO: Mieloperoxidasa; T-SOD: Superóxido Dismutasa Total; ZO-1: Zonulina; TLR4: Receptor 4 tipo-Toll; nNOS: Neuronas mesentéricas NO nitrérgicas; MIP-1α: Proteína inhibitoria de macrófagos-1α; MCP-1: Proteína quimio-atrayente de monocitos; MIP-2: Proteína inhibitoria de macrófagos-2; Gro-α: Oncogen regulador de crecimiento; SSA: Proteína amilode sérica; IFN-γ: Interferón-γ; TCD4+: Linfocitos T CD4; Nrf-2: Factor-2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; NLRP3: Receptor p3 tipo NOD; ASC: Proteína tipo speck asociada a apoptosis; IHQ: Inmunohistoquímica.

5. TRATAMIENTOS EN LA EII

5.1 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS EN LA EII

El arsenal terapéutico del que se dispone actualmente para el tratamiento de la EII se basa en una amplia variedad de fármacos como aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores y terapias biológicas, que tienen como fin lograr y mantener la remisión, así como prevenir las recidivas y la progresión de la enfermedad [235]. En general, el efecto terapéutico de estas drogas es en parte por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes [24].

La gran variedad de agentes terapéuticos, que a continuación se detallan, es un reflejo de la complejidad y heterogeneidad de la EII, pero también de la eficacia subóptima de los tratamientos:

- a) Aminosalicilatos
- b) Corticoides
- c) Inmunosupresores
- d) Biológicos

a) **Aminosalicilatos**

Los aminosalicilatos son un grupo de fármacos que incluyen en su estructura molecular el ácido 5-amino-salicílico (5-ASA), derivado del ácido acetilsalicílico. La molécula 5-ASA ejerce su efecto antiinflamatorio directamente sobre la mucosa intestinal, sin presentar efectos sistémicos. Para dicho fin, existen diferentes estrategias que permiten transportar el 5-ASA hasta el lugar de liberación a concentraciones terapéuticas. Dentro de las estrategias más utilizadas se encuentran: i) Conjugados de 5-ASA unidos mediante un enlace azo a otra molécula que actúa como transportadora, que requiere de la acción de las bacterias colónicas azo-reductasas para su ruptura y liberación. ii) Recubrimiento con polímeros que presentan un sistema de liberación dependientes de pH (≥ 6 se degrada en yeyuno, íleon y ciego y ≥ 7 se degrada en íleon terminal y colon derecho) o independientes de pH (microesferas semipermeables de etilcelulosa sensibles a la humedad con una liberación regulada a lo largo de todo el

tracto intestinal). iii) Administración tópica en forma de supositorios, espuma o suspensión rectal, permitiendo alcanzar altas concentraciones a nivel local y limitando efectos sistémicos.

Mecanismos de acción: A pesar de la variedad de preparaciones farmacéuticas, los mecanismos que subyacen las acciones terapéuticas siguen sin estar claras. Diversas dianas terapéuticas han sido atribuidas a 5-ASA [236]. Por una parte, muestra acciones antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, debido a su capacidad de eliminar ROS y regular positivamente sistemas antioxidantes endógenos, probablemente por su estructura fenólica [237]. En paralelo, 5-ASA presenta una actividad antiinflamatoria, ya que disminuye la actividad NF- κ B y por tanto la expresión de citoquinas proinflamatorias [238]. Ha sido descrito que 5-ASA puede aumentar la actividad de HO-1 en el tejido colónico e incrementar componentes antioxidantes y antiinflamatorios como la bilirrubina y CO [65]. También ha sido sugerido que 5-ASA podría activar el receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- γ) en colonocitos, involucrados en la inflamación, proliferación y apoptosis celular [239].

b) Corticoides

Los glucocorticoides (GC) son sintetizados de forma natural por la corteza suprarrenal gracias al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Los patrones de liberación de los GC siguen el ritmo circadiano, manteniendo una síntesis diaria de 10 a 20 mg/día y aumentando en situaciones de estrés metabólico, trauma o hipoglicemia. Las principales formas farmacológicas y vías de administración de los GC utilizados en la EII son: i) GC sistémicos, como la prednisona, metilprednisolona y deflazacort de uso oral y metilprednisolona e hidrocortisona de uso parenteral. ii) GC orales de baja biodisponibilidad, denominados corticoesteroides de “segunda generación” tales como la budesonida y beclometasona. iii) Corticoides tópicos de administración rectal, en los cuales se encuentran los de uso convencional como los de segunda generación, pero con mayor riesgo de toxicidad [240].

El desarrollo de GC orales de baja biodisponibilidad, caracterizado por una alta actividad antiinflamatoria, son actualmente una opción al uso de GC sistémicos, debido a que estos últimos presentan diversos efectos adversos tales como alteraciones

oftálmicos, dermatológica, metabólicas, gastrointestinales, musculoesquelética, cardiovasculares, del sistema nervioso central, entre otras [241].

Mecanismo de acción: Los GC exógenos se transportan en la sangre unidos a proteínas como la globulina y, en menor medida, a la albúmina. Primeramente, intervienen sobre la fase vascular de la inflamación, disminuyendo la vasodilatación y la permeabilidad vascular [240]. Los GC libres son capaces de difundir pasivamente a través de la membrana plasmática para unirse a receptores citosólicos, dimerizar y translocarse al núcleo, donde se unen a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), aumentando la transcripción de genes que codifican proteínas antiinflamatorias y reprimiendo la expresión de genes inflamatorios [242]. Además, los GC actúan disminuyendo la migración celular, proliferación de linfocitos T e inhiben la actividad de neutrófilos y eosinófilos, reflejado en una disminución de MPO y contenido sérico de elastasa en neutrófilos [243].

c) Inmunosupresores

Los inmunosupresores (IS) son fármacos que reducen la actividad del sistema inmune, disminuyen la inflamación, pero también incrementan el riesgo de infecciones oportunistas. Los IS generalmente utilizados en la EII, son: tiopurinas, metotrexato, ciclosporina o calcineurínicos:

- **Tiopurinas:** Las tiopurinas (**Azatioprina** [AZA] y **Mercaptopurina** [6-MP]) son fármacos que actúan como agonistas competitivos en la síntesis de purinas, inhibiendo la producción de ácidos nucleicos. Presentan un efecto antiproliferativo e inhibitorio sobre las células del sistema inmune e influyen sobre la inmunogenicidad de los fármacos biológicos que se expondrán más adelante. AZA y 6-MP son profármacos que deben ser metabolizados para ejercer su función. En el hígado, AZA es metabolizada a 6-MP por un mecanismo no enzimático mediado por glutatión transferasa. Posteriormente, 6-MP puede metabolizarse a su metabolito activo, 6 tioguanina-nucleótido (6-TGN), responsable de la eficacia clínica pero también de mielotoxicidad, y en metabolitos inactivos tales como 6-metilmercaptopurina y 6-metilmercaptopurina ribonucleótido, responsables de hepatotoxicidad. Los efectos adversos de las tiopurinas pueden dividirse en efectos adversos independientes de la dosis, como intolerancia

digestiva, pancreatitis, fiebre, artralgias, mialgias, exantema y posible hepatotoxicidad y efectos adversos dosis-dependientes, como la mielotoxicidad [244].

- **Metotrexato (MTX):** Es un análogo antagonista del ácido fólico. Debido a su acción en el bloqueo de enzimas claves en el metabolismo de purinas y pirimidinas (dihidrofolato reductasa y timidilato sintetasa), es capaz de inhibir la síntesis de ADN y, por tanto, la proliferación celular. Además, ha sido descrito que MTX puede incrementar la adenosina extracelular, inhibiendo la migración y activación de monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y células dendríticas [235]. Al igual que las tiopurinas, el tratamiento con MTX disminuye la inmunogenicidad de los fármacos biológicos. Los efectos adversos descritos son: hepatotoxicidad, mielotoxicidad, estomatitis, alopecia, esteatosis hepática o fibrogénesis [245].

- **Calcineurínicos:** Los inhibidores de la calcineurina, como **Ciclosporina (CyA)** y **tacrolimus**, son fármacos tradicionalmente utilizados para prevenir el rechazo en los trasplantes de órganos, aunque posteriormente fueron introducidos en diferentes enfermedades inmunomediadas. El mecanismo que subyace a la acción de CyA es mediante el complejo CyA/ciclofilina que inhibe la calcineurina fosfatasa citoplasmática, que es esencial para la activación del factor nuclear de células T activas (NFAT), inhibiendo la transcripción de citoquinas proinflamatorias (IL-2, TNF- α , IL-6). Por su parte, tacrolimus se une a proteínas intracelulares de linfocitos T (proteínas ligadoras de FH), previniendo la activación de calcineurina e irrumpiendo las señales de transcripción para interleuquinas, TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente, ha sido descrito que la CyA inhibe fuertemente la activación del inflammasoma NLRP3, aunque esta inhibición parece ser independiente de ciclofilina [113].

Los inhibidores de calcineurina pueden ser potencialmente tóxicos a altas dosis, asociándose a toxicidad renal, hipertensión, linfoma, infección parestesia, dolor de cabeza, anafilaxia, convulsiones, entre otras [246].

d) **Terapia biológica**

El término agente o producto biológico se refiere en la mayoría de los casos a compuestos producidos por células vivas mediante la tecnología de ADN recombinante. Las técnicas de ADN recombinante e hibridoma, desarrolladas en las décadas de los 70 y 80, han permitido el desarrollo de estos agentes, dentro de los cuales podemos encontrar los anticuerpos monoclonales (AcMs) [247]. Los AcMs son moléculas de alto peso molecular, resistentes a la actividad proteolítica intestinal y con limitada permeabilidad intestinal. Debido a su gran tamaño, el aclaramiento renal es casi inexistente y su catabolismo está restringido al torrente sanguíneo y espacio extracelular mediante proteólisis, tasas de reciclaje por interacción con receptor Fc neonatal (FcRn) y endocitosis mediada por receptor. Todos los AcMs aprobados actualmente son de la clase IgG. La farmacocinética, puede estar afectada por la estructura del anticuerpo monoclonal e ingeniería, factores del huésped, medicamentos concurrentes e inmunogenicidad [235]. Actualmente, han sido desarrolladas nuevas terapias dirigidas a vías proinflamatorias alternativas como eje IL-12/23, IL-6, inhibidores de JAK, estimuladores de TGF- β o compuestos dirigidos a inhibir la adhesión y migración de leucocitos en la mucosa intestinal [96] (**Tabla 5**).

- **Inhibidores de citoquinas proinflamatorias**

- **Anti-TNF- α :** El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que interviene en la fase aguda de procesos inflamatorios y tiene un papel clave en la etiopatogenia de la EII. Es producido por una gran variedad de células, especialmente por macrófagos y linfocitos T, pero también por fibroblastos, neuronas y células musculares lisas. La unión de TNF- α a su receptor TNFR1 provoca la activación de NF- κ B induciendo la transcripción y expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, así como moléculas de adhesión [248]. La introducción de terapia de AcMs dirigidos contra TNF- α (anti- TNF- α), tales como **Infliximab**, que se aprobó por primera vez en 1998 para EC y 2005 para CU, son actualmente usados en la práctica clínica para la inducción de la remisión así como para mantenimiento [96]. Los AcMs contra TNF- α sérico y de membrana, disminuyen la inflamación y lleva a una recuperación de la mucosa intestinal, así como beneficios clínicos como una menor tasa de hospitalización,

procedimientos quirúrgicos y una mejor calidad de vida [249]. Otros efectos descritos asociados a esta terapia son la disminución de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y macrófagos CD68, asociado a una reducción en la expresión de IFN- γ , sin afectar la expresión de citoquinas antiinflamatorias de IL-10 e IL-4. Adicionalmente, se han descritos otros efectos como la inhibición de la actividad de neutrófilos y disminución de las moléculas de adhesión celular de leucocitos y el número de infiltrado celular en la lámina propia [250, 251]. Sin embargo, estos fármacos tienen varias limitaciones y efectos secundarios graves: Son inyectables (intravenosos o subcutáneos), muestran eficacia solo en un subconjunto de pacientes (un tercio de los pacientes no muestran beneficios), son inmunogénicos, causando reacciones alérgicas y una pérdida secundaria de respuesta (en aproximadamente otro tercio de los casos), son de alto coste y pueden provocar la reactivación de infecciones, como tuberculosis o hepatitis B, así como aumentar el riesgo de algunos tipos de cáncer [96]. Actualmente existen diversos agentes terapéuticos anti-TNF- α , como **Infliximab** [252, 253], **Adalimumab** [254, 255], **Certolizumab Pegol** [256], **Golimumab** [257] (**Figura 6**):

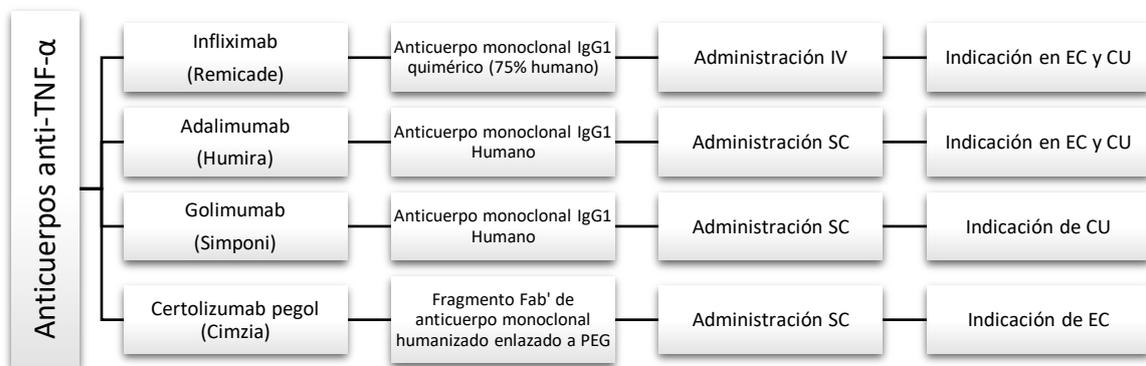


Figura 6: Drogas Biológicas anti-TNF- α y sus características. PEG: Polietilenglicol; IV: Intravenoso; SC: subcutáneo

- **Anti-IL-6:** La IL-6, sintetizada por una variedad de células inmunes, es una citoquina que mediante su receptor IL-6R y su forma soluble sIL-6R, cumple un potente rol en la respuesta inmune innata y adaptativa. Puede ejercer un rol proinflamatorio y antiinflamatorio [258]. Induce la síntesis hepática de proteínas de fase aguda y promueve la diferenciación de células T naïve a células Th17 al mismo tiempo que inhibe

a células Treg. La desregulación del balance Th17/Treg por IL-6 es clave en la cronicidad de la EII [259]. **Tocilizumab**, administrado intravenosamente y **PF-04236921**, de uso subcutáneo, son anticuerpos humanos anti-IL-6R y anti-IL-6 respectivamente, propuesto para inducir la remisión clínica en EC en aquellos pacientes que han fracasado a terapia anti-TNF- α [260, 261].

- **Anti IL-12/IL-23:** La IL-12 e IL-23 son citoquinas proinflamatorias secretadas por células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos). Ambas citoquinas son proteínas heterodiméricas, compartiendo en común la subunidad p40. La unión de la fracción p40 de IL-12 e IL-23 a sus receptores activa mecanismos mediados por JAK, activando factores de transcripción STAT [262] y favoreciendo la diferenciación de células T naïve a Th1 y Th17, manteniendo la respuesta inflamatoria por secreción de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-17 y TNF- α por parte de macrófagos, neutrófilos y células NK [263]. **Ustekinumab** y **Briakinumab** son un anticuerpo humano IgG1 que bloquea la fracción p40 (anti-p40) de IL-12 e IL-23. Es administrado intravenosamente y ha sido mostrado a ser efectivo tanto en la inducción como en la mantención de la EC [264]. Otros biológicos como Risankizumab, bloquea la subunidad p19 de la IL-23 y está orientado a pacientes con EC moderada a severa [265]

- **Dianas hacia vías de señalización**

- **Janus Quinasas (JAK):** Las citoquinas, al unirse a su receptor específico, activan vías de señalización intracelulares, como por ejemplo las JAK/STAT. Existen 4 quinasas JAK: JAK-1, JAK-2, JAK-3 y tirosina-quinasa 2 (TYK2). Como resultado de la activación, STAT se transloca al núcleo y modula la transcripción de genes en células inmunes. La inhibición de JAK por pequeñas moléculas, puede inhibir citoquinas proinflamatorias involucradas en la EII tales como IL-2, IL-6, IL-12, IL-21, IL-23 e IFN- γ [266]. **Tofacitinib**, un inhibidor de JAK oral, que inhibe principalmente JAK1, JAK2 y JAK3, ha sido estudiado en CU, mientras que Filgotinib un inhibidor oral selectivo de JAK1, ha sido evaluado para pacientes con EC. Los efectos secundarios de inhibidores de JAK están asociados a hipercolesterolemia e infecciones [267, 268].

- **Dianas hacia vías antiinflamatorias**

- **TGF- β 1:** TGF- β 1 es una citoquina producida por células inmunes. Participa en varios mecanismos antiinflamatorios, ya que suprime la activación de macrófagos y células T efectoras y estimulan la diferenciación de las células Treg. La unión de TGF- β 1 a su receptor de transmembrana TGF β R1 y TGF β R2, activa y fosforila, entre otras, a SMAD7, un regulador intracelular negativo de TGF- β 1. En pacientes con EII, una disminuida capacidad antiinflamatoria podría estar mediada por un incremento en los niveles de SMAD7. El fármaco **Mongersen**, un oligonucleótido oral “antisentido” de SMAD7, evaluado principalmente en EC, podría facilitar la degradación de SMAD7 y por tanto restaurar la señalización antiinflamatoria de TGF- β 1. Al igual que otras drogas, no está exento de complicaciones y efectos adversos [269].

- **Dianas hacia adhesión, tráfico y migración de células inmunes**

- **Moléculas de Adhesión, Integrinas:** La migración y retención de linfocitos en el epitelio intestinal está mediada por moléculas de adhesión expresadas en linfocitos, endotelio, epitelio y matriz extracelular (moléculas de adhesión celular [CAM], integrinas, selectinas y cadherinas). Específicamente, los linfocitos T activados expresan la integrina $\alpha_4\beta_7$ para la estimulación específica en la mucosa intestinal. El bloqueo de la adhesión de linfocitos al endotelio podría aliviar la reacción inmunitaria inadecuada en la EII, deteniendo el reclutamiento de células T en la mucosa inflamada [270]. Vedolizumab, administrado intravenosamente, es un AcM humanizado que se une específicamente a la integrina $\alpha_4\beta_7$, inhibiendo la unión de linfocitos T con la molécula de cito-adhesión adresina mucosal 1 (MAdCAM-1). Los datos de seguridad de más de 4000 personas por año de exposición a **Vedolizumab** demuestran que el tratamiento con Vedolizumab es bien tolerado en pacientes tanto en pacientes con CU como con EC de actividad moderada a severa [271].

- **Moduladores del receptor de esfingosina**

- **Esfingosina 1-Fosfato:** Los esfingolípidos son moléculas de señalización involucradas en la proliferación celular, viabilidad, motilidad, migración y tráfico de linfocitos. La esfingosina-1-fosfato (S1P) es la forma fosforilada de esfingosina, derivada

del catabolismo endógeno de esfingolípidos. La unión de S1P a su receptor S1P1-5 induce la salida de células inmunológicas desde los órganos linfoides hacia los vasos linfáticos [272]. Adicionalmente, los receptores de S1P también regulan la función vascular y juega un rol clave en la mantención de las uniones celulares endoteliales. Ozanimod, una molécula oral agonista de S1P1 y S1P5, disminuye los linfocitos circulantes al secuestrarlos en órganos linfoides secundarios, lo que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria. Recientemente, resultados preliminares de ensayos clínicos han mostrado una alta tasa de remisión clínica en pacientes con CU [273].

Célula	Vías de señalización y citoquinas	Efecto	Fármaco
Linfocitos T helper o efectoros ↓	Señalización intracelular JAK/STAT	Inhibición	Tofacitinib Filgotinib
	Unión $\alpha_4\beta_7$ / MAdCAM-1 Unión SP1/SP1R	Inhibición Inhibición	Vedolizumab Ozanimod
Th0	TGF β	Estimulador de TGF- β	Mongersen
Th1	INF- γ	Anti-IFN- γ	Eldelumab
	TNF- α	Anti-TNF- α	Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab Pegol
Th0	IL-4	Anti-IL-13	Anrukizumab
Th2	IL-5 IL-13		
Th17	IL-17	Anti-IL-17	Secukinumab,
	IL-21 IL-22		Vidofludimus, Brodalumab
Macrófagos	IL-6	Anti-IL-6	Tocilizumab
	IL-12	Anti-IL-12	Ustekinumab
	IL-23	Anti-IL-23	Ustekinumab, Risankizumab
CPA	TGF- β	Estimulador de TGF- β	Mongersen
CD	TNF- α	Anti-TNF- α	Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab Pegol

Tabla 5: Principales dianas de fármacos biológicos utilizados en EII. Th: Linfocitos T helper; CPA: Células Presentadoras de Antígeno; CD: Células Dendríticas (*Obtenido y modificado de Catalán-Serra & Brenna, 2018*) [96].

5.2 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS ANTIOXIDANTES/ANTIINFLAMATORIOS EN LA EII

5.2.1 NUTRACÉUTICOS Y COMPONENTES BIOACTIVOS

Los nutraceuticos, definidos como extractos de alimentos que proporcionan beneficios para la salud, han sido ampliamente estudiados debido a las asociaciones descritas sobre protección cardiovascular y su uso en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Por ejemplo, en hipercolesterolemia o en alguna alteración del perfil lipídico, el uso de nutraceuticos se encuentra indicado a nivel de prevención primaria. La combinación de dos o más nutraceuticos con diferentes mecanismos de acción es sugerido con el fin de reducir las dosis de tratamiento convencional y obtener un efecto aditivo o sinérgico [274].

Los probióticos, considerados como nutraceuticos por ser de origen natural y con propiedades activas, podrían ser considerados parte de la estrategia terapéutica en el tratamiento de la EII debido a su rol sobre la microbiota intestinal y su interacción con el sistema inmune [275]. Otros ejemplos de nutraceuticos son el ácido α -lipoico, coenzima Q10, L-arginina, melatonina, minerales como el cromo, potasio y magnesio, aceite de oliva, ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA), esteroides vegetales, polifenoles o sustancias fenólicas, entre otros. Respecto a la tolerancia y seguridad de los nutraceuticos, aunque en general su uso es ampliamente aceptado en diversas condiciones fisiopatológicas, existe consenso entre distintas entidades o instituciones como la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria y la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, así como de varias sociedades científicas, sobre su regulación e indicación por parte del profesional sanitario, debido a que son productos de fácil acceso pero que podrían presentar interacción fármaco-nutriente y ser fácilmente mal utilizados [276].

Los polifenoles son nutraceuticos naturales que pueden ser sintetizados por las plantas y se encuentran presentes principalmente en frutas, verduras, té verde, aceite de oliva virgen extra, cacao y granos enteros [277]. Dentro de la amplia variedad de alimentos que presentan sustancias de esta familia química, las "superfrutas" contienen nutrientes excepcionalmente altos, una amplia gama de fitoquímicos bioactivos y

elevada actividad antioxidante. El término "superfruta" es un término acuñado para referirse a frutas exóticas (caracterizadas por su forma inusual y color o sabor poco común en comparación con lo que los consumidores están habituados) tales como bayas de acai, goji, maqui, arándanos, entre otros, los cuales han ganado popularidad y una atención mundial significativa en los últimos años debido a sus beneficios para la salud [278].

5.2.1 POLIFENOLES

Los polifenoles son compuestos aromáticos que contiene al menos un anillo de benceno y uno o varios hidroxilos en su estructura. Constituyen una gran variedad de compuestos y estructuras que van desde moléculas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas más complejas, como los taninos [277]. De los más de 8000 polifenoles que se han identificado hasta la fecha, es posible diferenciar 2 subfamilias: los flavonoides y los no flavonoides. Aproximadamente la mitad de los polifenoles pertenecen a la subfamilia de flavonoides. Los flavonoides se caracterizan por la estructura de 3 anillos, dos de los cuales son bencenos polihidroxilados [279].

Los polifenoles pueden además subdividirse o clasificarse atendiendo a su estructura molecular en: i) Ácidos fenólicos y sus subclases derivadas de ácidos hidroxibenzoicos, ii) Taninos hidrolizados y condensados, iii) Lignanós y ligninas iv) Flavonoides, son los más abundantes y son divididos principalmente en antocianinas y antoxantinas que incluyen los flavonoles, flavanoles, flavonas, isoflavonas y flavanonas, v) Estilbenos como el resveratrol [280, 281] (**Figura 7**).

Muchos de los compuestos fenólicos son responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal. Por ejemplo, las antocianinas son compuestos solubles en agua que son responsables de los tonos rojos, azules y violáceos característicos del vino tinto, frutas y hortalizas, incluyendo: arándanos, rábanos, grosellas, moras, frambuesas, arándanos, granadas, cerezas, ciruelas, fresas y uvas rojas. Otros polifenoles como las proantocianidinas (taninos condensados) y taninos hidrolizables confieren astringencia a algunos frutos [282]. Desde el punto de vista de

su actividad biológica, los polifenoles tienen propiedades para captar o neutralizar ROS, que le dan un gran poder antioxidante, importantes propiedades antiinflamatorias, así como modulación de múltiples eventos moleculares involucrados en la carcinogénesis [283]. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas que podrían tener un rol de sustitución hormonal y prevención de enfermedades coronarias en mujeres postmenopáusicas [284].

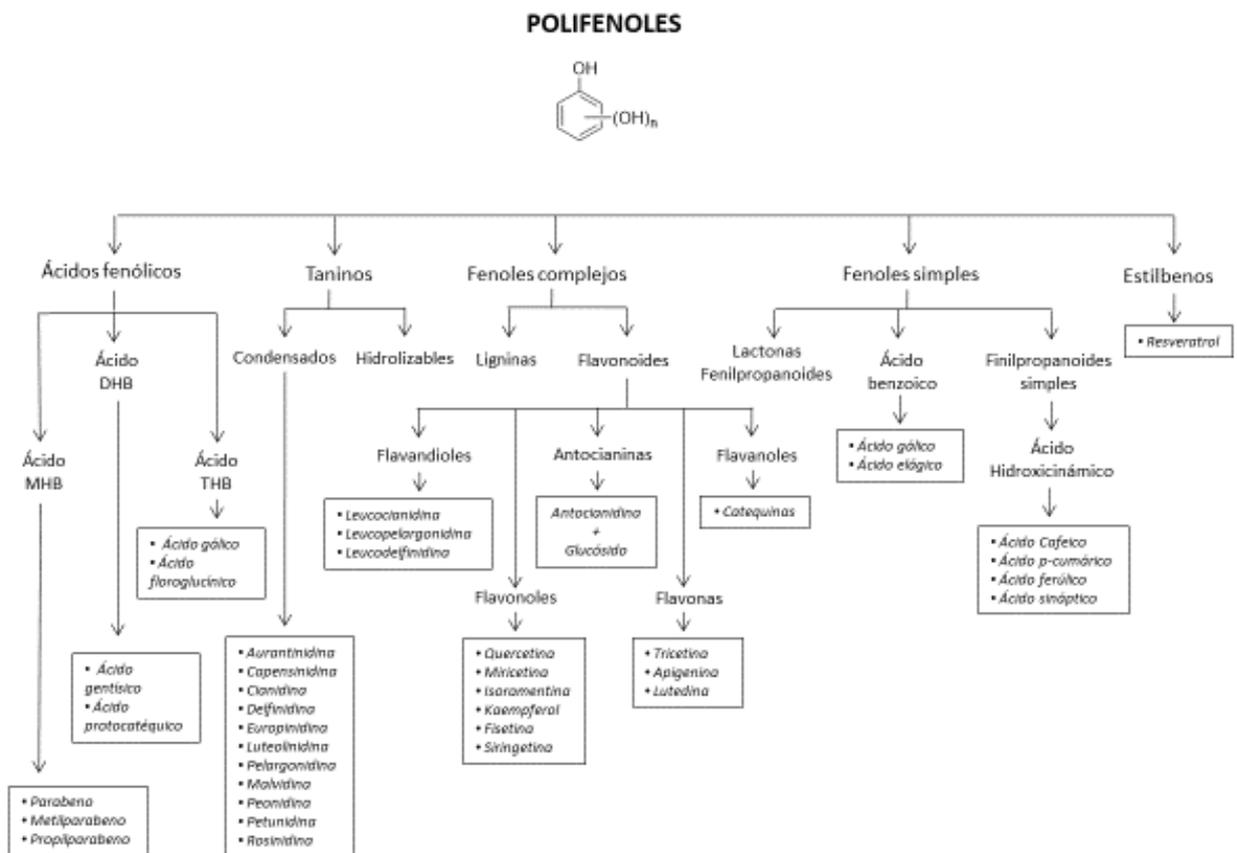


Figura 7: Clasificación de polifenoles. MHB: monohidrobenceno; DHB: dihidrobenceno; THB: trihidrobenceno

5.2.2 Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de bayas

Entre todas las frutas y vegetales, las bayas, especialmente aquellas con colores rojos o azul oscuro, tienen un alto contenido y diversidad de compuestos bioactivos, que incluyen principalmente flavonoides como antocianinas, así como ácidos fenólicos, ácido benzoico y derivados del ácido cinámico, estilbenos como resveratrol, lignanos, flavonoles y flavanoles, taninos condensados y taninos hidrolizables, vitaminas (vitaminas A, C, E), ácido fólico, alcaloides, carotenoides, xantonas y polisacáridos [285]. Al mismo tiempo, las bayas presentan una alta capacidad antioxidante (CA), evaluada mediante diversos ensayos [286]. El análogo de la vitamina E, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), es utilizado como estándar para evaluar la CA de una sustancia en estudio. La CA equivalente de Trolox (TEAC) es una medida de la fuerza antioxidante basado en Trolox y medido en unidades equivalentes de Trolox (TE). Los mecanismos por los cuales los antioxidantes pueden actuar son mediante la transferencia de electrones. o mediante la transferencia de átomos de hidrogeno y que además utilizan Trolox como antioxidante de referencia: Los ensayos que involucran reacciones por transferencia de electrones son: i) Difenil picrilhidrazilo (DPPH), definido por su capacidad de eliminar RL, ii) Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), ensayo empleado por reducción de oxidante ion Fe^{3+} , iii) 2,2'-azino-bis (ABTS), agente oxidante que actúa como un sustrato para peroxidasa, que muestra resultados similares a los obtenidos en la reacción DPPH. Por otro lado, la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC) es un ensayo que involucra una reacción de transferencia de átomo de hidrógeno [287-289].

Los compuestos fenólicos representan la mayor parte de la actividad antioxidante de frutas y verduras, especialmente las “superfrutas” de color azul-violáceos. El contenido total de estos compuestos (contenido total de polifenoles, CTP) se ha evaluado como una forma adecuada para estimar el potencial antioxidante de los alimentos a través de los distintos ensayos destinados para ello [290, 291] (**Tabla 6**). En línea con la abundancia de compuestos fenólicos en alimentos y su reconocida contribución a la actividad antioxidante total, se han observado correlaciones entre el CTP y CA [289, 292-294].

Los análisis de diferentes extractos de zumos de bayas (arándano, grosella negra, aronias y saúco) han mostrado una gran cantidad de componentes bioactivos (41 en total), donde las antocianinas representan un alto porcentaje de todos los compuestos fenólicos. Ensayos de CA, muestra que estas bayas tienen un alto potencial antioxidante dependiente de su contenido y variedad de compuestos polifenólicos, así como de la captación celular de estas sustancias [295]. La Murta (*U. molinae* Turcz.), una baya también conocida como murtila, es una planta nativa silvestre de las montañas del sur de Chile (entre la VII y X región) que contiene al menos 20 componentes polifenólicos, de los cuales el ácido cafeico, la quercetina y la delphinidina son los principales constituyentes. La CA de la murta ha mostrado un mayor poder antioxidante que otras bayas como los arándanos y se correlaciona con el CTP, pero no significativamente con el contenido total de antocianinas [296]. Las moras, por su parte, presentan el mayor contenido de sustancias fenólicas (28,1 mg/g de peso seco [PS]) comparadas con fresas, frambuesas y arándanos. Además, las moras exhiben valores casi dos veces más altos de CTP que las otras bayas estudiadas, mientras que los valores FRAP siguen el siguiente orden decreciente: moras > arándanos > fresas > frambuesas [293]. Las hierbas medicinales chinas como raíces, frutos, cortezas, entre otras, presentan un importante contenido fenólico y una relación significativa con efectos antioxidantes, lo que indica que los compuestos fenólicos son el principal contribuyente de la CA de estas hierbas. Además, una fuerte correlación entre el ensayo DPPH y el ensayo FRAP implica que los antioxidantes en estas hierbas son capaces de eliminar los RL y de reducir los oxidantes, respectivamente [291].

Ref.	Fruto	Total	POLIFENOLES					CAPACIDAD AO		
			Fenoles		Flavonoides			DPPH	ORAC	FRAP
			Ácidos fenólicos hidroxicinámico	Totales	Flavonol total	Antocianidinas totales	Antocianinas totales			
[295, 297]	Sáuco (elderberry)	19.5 mg/g	260.13 µg/ml	-	363.61 µg/ml	7440.85 µg/ml	13.74 mg/g PF	60.87 %	147 µmol/g PF	-
[287, 295, 297]	Grosella (Blackcurrant)	13.3 mg/g	332.4713 µg/ml	-	258.2913 µg/ml	7110.65 µg/ml	5.6 mg/g PF	73.55 %	101.4 µmol/g PF	-
[287, 289, 290, 295, 298, 299]	Arándano (Blueberry)	26.94 mg/g PS	539.6213 µg/ml	14,3 mg/g PS	255.6013 µg/ml	539.62 µg/ml 11.8 mg/g	2.01 mg/g	8.48 %	456 µmol/g PS	334 µmol/100 g PF
[289, 295, 297]	Aronia (Chokeberry)	20.1 mg/g 116 mg/g	2048.2 µg/ml	5.3 mg/g PS	78.51 µg/ml	3569 µg/ml 10.7 mg/g	14.8 mg/g	58.94 %	160.6 µmol/g PF	-
[287, 295]	Arándanos Europeos (Bilberry)	-	258.1 µg/ml	-	40.3 µg/ml	3269.4 µg/ml	-	43.17 %	-	48.3 mmol/100g

Ref.	Fruto	Total	POLIFENOLES					CAPACIDAD AO		
			Fenoles		Flavonoides			DPPH	ORAC	FRAP
			Ácidos fenólicos hidroxicinámico	Totales	Flavonol total	Antocianidinas totales	Antocianinas totales			
[293]	Mora (Blackberry)	28.1 mg/g PS	-	-	-	-	8.50 mg/g de PS	5.6	157.7 µmol/g 1235 µmol TE/100 g PF	
[278]	Acai (Acaiberry)	5.29 mg/g de PF	1.38 mg/g	0,91 mg/g de PF	0.16 mg/g de PS ^C	-	1.11 mg/g de PF	598 g/g	33.6 mmol/100g PF	220 µmol/g



Tabla 6: Contenido de polifenoles y capacidad antioxidantes de diversas bayas. PS: Peso seco; PF: Peso fresco. (Imágenes de frutas obtenidas de Afrin y cols [285]).

5.2.3 POLIFENOLES DE BAYAS Y SU IMPACTO EN LA SALUD

El EO juega un papel crucial en la fisiopatología de diferentes tipos de cáncer [300, 301], en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [302], en la progresión de enfermedades cardiovasculares como Diabetes Mellitus tipo 2 [303, 304] y en enfermedades inflamatorias como la AR y la EII [305]. Por otro lado, es ampliamente aceptado que una dieta basada en un alto consumo de frutas, verduras y otros alimentos vegetales ricos en nutrientes y compuestos bioactivos puede reducir el riesgo de enfermedades relacionadas con el EO [287].

Una creciente evidencia indica que las bayas contienen una amplia gama de compuestos bioactivos con un alta CA. La significancia biológica de los polifenoles y su actividad antioxidante consisten en la capacidad de eliminar ROS; proteger del daño del ADN, proteínas y lípidos provocados por ROS; inhibir enzimas oxidativas, incrementar la actividad de enzimas antioxidantes y modular mecanismos inflamatorios asociados a NF-kB e inflamasomas [306-309]. Por ejemplo, el consumo de arándanos, por su contenido de proantocianidinas, antocianinas, quercetina, ácido ursólico y estilbenos, ha sido asociado con la prevención y mejoría de las enfermedades crónico-degenerativas [308, 310].

Adicionalmente, se ha identificado y caracterizado la actividad antimicrobiana de diversas bayas [296, 311]. Los arándanos, usados como nutraceuticos, se utiliza actualmente para el tratamiento de infecciones urinarias, particularmente en infecciones recidivantes, por su capacidad de prevenir la adhesión de ciertas bacterias, incluida la *Escherichia coli*, a la pared del tracto urinario [311].

A continuación, se detallan las principales propiedades de las bayas sobre los siguientes mecanismos:

- a) Protección contra el daño oxidativo
- b) Protección contra el daño en el ADN
- c) Supresión de la inflamación

a) Protección contra el daño oxidativo:

Los hallazgos sobre las propiedades antioxidantes de polifenoles presente en una gran variedad de frutos, especialmente en bayas, estarían relacionadas con su capacidad de eliminar $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} y 1O_2 [289, 312]. Estudios *in vivo* con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han mostrado que la exposición de diferentes concentraciones de una amplia diversidad de zumos de bayas (arándano, grosella negra, aronias y saúco) genera una disminución en la oxidación intracelular después de 2 horas de la exposición [295]. La adición de extracto polifenólico de vino tinto a células HT-29, tratadas previamente con citoquinas, es capaz activar la ruta Nrf-2, no sólo por aumentar la expresión de HO-1, reconocida por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, sino también por incrementar la expresión de genes relaciones con GSH, importante enzima antioxidante que se encuentra disminuida bajo condiciones inflamatorias [313]. En modelos experimentales murinos, la inducción de lesiones hepáticas inducidas por dimetilnitrosamina (DMN) son atenuadas mediante la inducción de antioxidantes a través de las vías Nrf-2, HO-1 y glutatión S-Transferasa (GST α). Estos datos apoyan la idea de que las antocianinas pueden inducir un aumento de las defensas antioxidantes vía Nrf-2 [314].

En humanos, un estudio a doble ciego controlado con placebo mostró que la suplementación de 162 mg de antocianinas al día a 16 sujetos sanos durante 4 semanas se asoció con una disminución urinaria de productos de la peroxidación lipídica como F2-isoprostanos, en comparación con el grupo placebo [315]. Estas observaciones sugieren que el consumo de bayas puede mejorar el estado redox.

Por tanto, los polifenoles y flavonoides pueden interactuar con ROS y RNS y evitar su implicación sobre el daño y viabilidad celular (**Figura 2b**)

b) Protección contra el daño en el ADN:

Las antocianinas derivadas de frambuesas negras podrían ser responsables de procesos de desmetilación de genes supresores de tumores (CDKN2A, SFRP2, SFRP5 y WIF1) mediante la supresión de la actividad y expresión del ADN metil transferasa 1 (DNMT1) y DNMT3B en células de cáncer de y podrían corregir la hipermetilación del ADN en CU en modelo animal [316]. Por otro lado, en modelos experimentales de cáncer, se ha observado una reducción de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

(8-OHdG), un marcador de daño oxidativo en el ADN. En diversas líneas celulares de cáncer de colon, extractos de bayas como moras, frambuesa negra, arándano, arándano rojo, frambuesa roja y fresa, han mostrado inhibir la proliferación e inducir apoptosis [317], probablemente mediante la sobreexpresión de proteínas supresoras del crecimiento como WAF1 y de proteínas proapoptóticas como Bax [318].

c) **Inflamación:**

Se han descrito los beneficios de varias frutas nativas con alto contenido polifenólico, no sólo por presentar un efecto antioxidante, sino también por tener un efecto antiinflamatorio debido, al menos en parte, por su capacidad de disminuir el infiltrado de neutrófilos, inhibir la activación de NF- κ B tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* [319] y atenuar la actividad de iNOS y COX-2 [282]. En macrófagos murinos RAW 264.7 se ha observado que el tratamiento con resveratrol es capaz de disminuir la formación IL-6, iNOS y, por tanto, la generación de NO•. Además se ha descrito que el resveratrol también inhibe la translocación de NF- κ B p65 del citoplasma al núcleo y suprime la vía de señalización JAK/STAT [320], mientras que los polifenoles totales provenientes de extracto de arándanos han mostrado modular la expresión de iNOS y COX-2 en macrófagos RAW264.7 inducidos por LPS, a través de la vía de señalización NF- κ B [309]. Los extractos de fresa y de moras han mostrado disminuir Th1/Th2, llevando a la reducción de la relación de citoquinas pro/antiinflamatorias como IFN- λ , IL-2, IL-12/IL-10 y de TNF- α /IL-12 en macrófagos peritoneales y esplenocitos primarios murinos estimulados con LPS [321].

Las antocianinas extraídas de la batata morada exhiben importantes propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras. En modelos de ratas con lesión hepática crónica, la administración de antocianina atenúa la expresión de COX-2 e iNOS, presumiblemente a través de la inhibición de la translocación de NF- κ B. Estos datos implican que las antocianinas pueden inducir la disminución de la inflamación vía NF- κ B [314].

Por otro lado, los polifenoles, incluidos los flavonoides, los ácidos fenólicos, los alcoholes fenólicos, los estilbenos y los lignanos, pueden atacar las vías de señalización dependientes de TLR4 a través de la modulación de la expresión de TLR, inhibiendo la cascada de señalización TLR4/NF- κ B/STAT o interfiriendo con la oligomerización de TLR4 tras su estimulación [322] (**Figura 2b**).

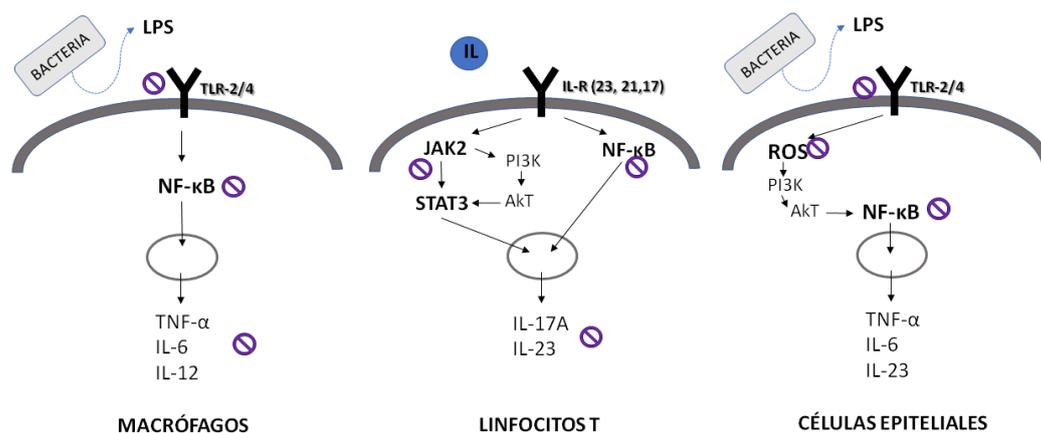


Figura 2b: Polifenoles y mecanismos de regulación del sistema inmune y vías inflamatorias en EII. LPS: lipopolisacáridos; IL: Interleuquina; TLR: Receptor tipo-Toll; IFN- γ : Interferón- γ ; TNF- α : Factor de necrosis tumoral α ; STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3); JAK: Janus quinasa; PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa; $\text{\textcircled{X}}$: Acción Inhibitoria de polifenoles.

5.2.4 POLIFENOLES Y SU RELACIÓN EN LA EII

Estudios epidemiológicos y experimentales recientes apoyan el papel beneficioso que ejercen el consumo de polifenoles dietarios en diversas enfermedades gastrointestinales, incluida la EII [30]. El uso de varias drogas naturales y sintéticas para el tratamiento de EII ha alcanzado una atención notable en los últimos años debido a que la administración crónica de las drogas utilizadas en la EII no es efectiva en todos los pacientes y pueden incrementar el riesgo de efectos adversos. Se ha enfatizado el papel de los nutraceuticos en la mejora de los síntomas de la EII en modelos de roedores mediante la modulación de mecanismos patogénicos que incluyen disbiosis, EO, aumento de citoquinas inflamatorias, desregulación del sistema inmunológico y vías de señalización de células inflamatorias[232]. Los nutraceuticos tienen un papel importante en los pacientes con EII como un enfoque preventivo para extender las fases de remisión, como una intervención terapéutica para suprimir la EII activa y posiblemente para reducir los efectos adversos de las drogas convencionales[323] .

Los suplementos antioxidantes modulan los mecanismos endógenos que disminuyen la producción de ROS o aumentan las enzimas antioxidantes. Una vía clave por la cual actúan varios antioxidantes es el Nrf-2 [324]. Recientes estudios han

demostrado que Nrf-2 confiere protección contra patologías asociadas a inflamación como la EII. Polifenoles como el resveratrol, puede activar Nrf-2 e inducir efectivamente la expresión del gen HO-1 y consecuentemente aumentar los niveles de la proteína HO-1 en líneas celulares de epitelio colónico pretratadas con estímulos inflamatorios [313].

En modelos animal de CU la administración de derivados de flavonoides como dosmalfato (400–800 mg/kg de peso corporal por vía oral) ha mostrado mejorar la colitis severa y reducir el grado de inflamación a través de la reducción de la infiltración de neutrófilos y los niveles de IL-1 β y PGs en la mucosa colónica. Los autores concluyen que el dosmalfato es protector en la colitis aguda inducida por DSS [325]. Se han llevado a cabo estudios de respuesta inflamatoria en la EII con distintas variedades de tomates con diferente contenido en polifenoles. Interesantemente, una variedad de tomate (Bronze) enriquecido con tres clases distintas de polifenoles (flavonoles, antocianinas y estilbenos) ha sido destacada por su impacto sobre parámetros inflamatorios (reducción de IL-6 y TNF- α en células dendríticas de médula ósea), síntomas (disminución de la pérdida de peso, mejora en consistencia de las heces y reducción de sangre en heces) y microbiota intestinal (mayor crecimiento de *Bacteroidetes* sobre *Firmicutes*) en modelo animal de CU [326].

En un ensayo clínico en 13 pacientes con CU leve a moderada no controlados suficientemente con terapia convencional o que sufren efectos secundarios, la administración de una dosis diaria de arándano de 160 g (40 gramos por vez, 4 veces al día), correspondiente a 95 g de PS o 600 g de fruta fresca (suponiendo un contenido de agua en arándanos frescos de 80 a 85%) por un total de seis semanas, mostró que el 63.4% de los sujetos remitieron, mientras que el 90.9% de los pacientes mostraron respuesta a la sexta semana. Los valores de calprotectina fecal (CPF) disminuyeron significativamente durante el tratamiento. Adicionalmente, el score endoscópico de Mayo y el índice histológico confirmaron los efectos beneficiosos del tratamiento [327]. Otro ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo ha sido publicado en relación con la suplementación de 500mg de resveratrol, un polifenol conocido por sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes en pacientes con CU activa. La suplementación en 50 pacientes durante 6 semanas llevó a una reducción significativa de los niveles plasmáticos de TNF-alfa, Proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PRC)

y una disminución significativa de la actividad de NF- κ B en PBMCs. Adicionalmente, también disminuyeron de forma significativa indicadores de calidad de vida en los pacientes con CU tratados y el índice de cuestionario de EII-9 (IBDQ-9) [328].

Hasta la fecha, en la EC, sólo existe un ensayo clínico publicado el 2013 en pacientes pediátricos relacionado con la suplementación de polifenoles como estrategia terapéutica. En comparación con 15 controles sanos, 15 pacientes pediátricos con EC en remisión, según su índice de actividad de la enfermedad PCDAI, presentaron una reducida actividad de Cu/Zn-SOD y un aumento del daño oxidativo en proteínas, mostrando correlaciones negativas entre los marcadores de inflamación (CPF), así como entre PCDAI y la CA con tratamiento convencional. Cuando los pacientes pediátricos fueron sometidos a una administración de 2 mg/kg de extracto de polifenoles Pycnogenol® (Pyc) durante 10 semanas, los parámetros de EO mejoraron [329].

5.2.5 POLIFENOLES Y SU IMPACTO EN INFLAMASOMAS EN EII

Diversos componentes antioxidantes han mostrado tener un efecto antiinflamatorio gracias a su contenido polifenólico. En este sentido, se ha descrito que diversos polifenoles como resveratrol, quercetina, ácidos fenólicos como el ácido gálico, catequinas y antocianinas, presentan un efecto protector en el desarrollo de diversas enfermedades tales como el cáncer [330], patologías hepáticas [331, 332] y enfermedades vasculares [333], entre otras.

Actualmente, son pocos los estudios realizados respecto al efecto de los polifenoles y los componentes bioactivos sobre la modulación de los inflamasomas y su relación en la EII (**Tabla 7**). Algunos de ellos indican que, a nivel del tracto intestinal, ciertas condiciones pueden derivar en una disrupción de la barrera epitelial, como reperusión isquémica intestinal (RII), que puede resultar en una translocación bacteriana, endotoxemia y una liberación descontrolada de mediadores y citoquinas inflamatorias, seguido de una respuesta inflamatoria y daño en tejido. La piroptosis mediada por la activación de la caspasa 1, podría estar participando estos procesos patológicos en la mucosa intestinal. Se ha descrito que el tratamiento con resveratrol, un polifenol ampliamente estudiado por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios,

previo a la RII, reduciría el infiltrado inflamatorio, daño intestinal y disminuiría la activación de los mastocitos [307].

En un modelo animal de CU, la administración de otros polifenoles de interés como la curcumina ha mostrado ser capaz de reducir de forma significativa la expresión de múltiples citoquinas inflamatorias (incluida la IL-1 β madura, IL-6 y MCP-1), además de disminuir drásticamente la actividad de la MPO y caspasa 1 y aliviar el daño histopatológico provocado por sustancias químicas (DSS). Adicionalmente, la curcumina podría suprimir en gran medida tanto la activación de NLRP3 [123] como la vía de NF- κ B en un modelo experimental de colitis [334].

Por otra parte, el uso de flavonoides dietarios ha mostrado tener un efecto antiinflamatorio y antiproliferativo a través de vías dependientes de NLRP6 e independientemente de la caspasa 1 y ASC. La acción protectora de los flavonoides sobre la inflamación intestinal parece estar mediada por modulación de la microbiota intestinal. Experimentos de “co-housing” revelan la existencia de una transmisión horizontal de factores proinflamatorios (microbiota) [124] así como de propiedades antiinflamatorias de flavonoides, probablemente a través de los comportamientos coprofágicos y de aseo de los ratones [335]. Dichos resultados coinciden con la información actual y ampliamente aceptada que indica que alteraciones de ciertas especies del ecosistema del espacio microbial tienen un impacto sobre el sistema inmunológico, el cual es clave en la etiopatogenia de la EII [336, 337].

En células inmunitarias, específicamente monocitos y macrófagos, es posible observar que el tratamiento con extracto de polifenoles puede modular la inflamación. Por una parte, el tratamiento con polifenoles es capaz de restaurar eventos celulares críticos para la activación de inflamasoma, como por ejemplo disminuir el eflujo de K⁺, atenuar la producción de ROS y disminuir la liberación de catepsina B [123]. Junto con esto, otros polifenoles derivados del extracto de vino, como el resveratrol, es capaz de disminuir la expresión de la proteína ASC, NLRP3 y secreción de IL-1 β de forma dependiente ATP como señal inflamatoria [306].

Los inflamasomas, específicamente NLRP3 y NLRP6, han demostrado ser un objetivo terapéutico potencial en la EII, y los nutraceuticos podrían participar en la

modulación del inflamasoma. Específicamente, los polifenoles, utilizados como un alimento funcional y nutracéutico con actividad antiinflamatoria, podrían tener un importante rol para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Su papel en la mejora de los síntomas de la EII en modelos de roedores, mediante la modulación de mecanismos patógenos claves (disbiosis, EO, aumento de citoquinas inflamatorias y desregulación del sistema inmunológico e inflamasomas) [323], podrían tener un papel relevante en los pacientes de EII, con un enfoque preventivo para extender las fases de remisión y como una intervención terapéutica para suprimir la actividad.

Componente	Modelo	Especie	Efectos	Ref		
Extracto de vino rojo	Resveratrol	Activación señal 1 con LPS (1 µg/ml)	Raw 264.7	↓ IL-1β	[306]	
	Quercetina		J774A.1	↓↓ IL-1β		
Catequina				↓↓ expresión de proteína ASC		
Ácido Gálico	Activación señal 2 con ATP (10 µM)	Raw 264.7	J774A.1	↓ IL-1β		
Té verde	EGCG AG EGC	Inflamación con LPS	Modelo murino	Plasma	↓ ALT, AST ↓ PCR	[331]
				Hígado	↓ MDA ↑ GSH, T-SOD ↓ NF-κB ↓ COX-2 iNOS ↓ mRNA de IL-1β, IL-18, IL-6 y TNF-α ↓ NLRP3, ASC, caspasa 1	
Cúrcuma	Polifenol Curcumina	CU	Modelo murino	Macrófagos peritoneales y BMDM activados por LPS con DSS	↓ IL-1β ↓ ASC ↓ Eflujo de K+, ROS, catepsina B ↓ IL-1β ↓ ASC ↓ Eflujo de K+, ROS, catepsina B	[123]
				Intestino	↓ IL-1β IL-6 y MCP-1, ↓ actividad de MPO y caspasa 1	
Polifenol Resveratrol	Reperfusión isquémica intestinal	Modelo murino	Mastocitos	Intestino	↓ Daño e infiltrado celular ↓ NLRP3, ASC, caspasa 1 ↓ IL-1β, IL-18 ↓ Apoptosis celular intestinal ↓ Triptasa ↓ β-hexosaminidasa	[307]
Flavona Apigenina	CU	Ratones WT	Intestino		↓ IL-1β, IL-18 ↑ de variedades taxonómicas ↓ ensamblaje inflammasoma	[335]
				Ratones Nlrp6 ^{-/-}	Sin cambios en la composición de la microbiota intestinal	
				Ratones KO Casp1/11 ASC	↓ IL-18 ↓ Inflamación intestinal	

Tabla 7: Efecto de los polifenoles sobre la inflamación y actividad del inflammasoma en modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamación. CU: Colitis Ulcerosa; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; MDA: Malondialdehído; GSH: Glutatión reductasa; T-SOD: Superóxido dismutasa total; PCR: proteína C reactiva; EGCG: Epigallocatequina 3-galato; AG: Ácido gálico; EGC: Epigallocatequina; GCG: Galocatequina galato; WT: del inglés *Wild type*; BMDM: Macrófagos Derivados de médula ósea; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

6. ARISTOTELIA CHILENSIS

6.1 GENERALIDADES

Debido a los numerosos beneficios descritos previamente de los compuestos polifenólicos, actualmente existe una amplia búsqueda de alimentos que presenten un contenido fenólico y actividad biológica relevante. Desde esta mirada, las bayas constituyen una fuente dietética rica en antioxidantes fenólicos con importantes propiedades bioactivas [286, 305]. *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz, o maqui, es una planta que presenta una baya comestible pequeña de 5 mm de diámetro, de color negro-azulado y que contiene 2-4 semillas; florece de noviembre a diciembre y fructifica en marzo (**Figura 8a**). La planta es endémica de Chile, aunque es común encontrarla en los parques de Argentina (Lanín Nacional, Nahuel Huapi y Los Alerces) y en los bosques de los Andes chilenos [299, 338] (**Figura 9**).

Su clasificación botánica y taxonómicas se describen a continuación [339]:

- **Reino:** Plantae
- **Clasificación:** Angiospermas
- **Orden:** Oxalidales
- **Familia:** Elaeocarpaceae.
- **Género:** Aristotelia
- **Especie:** chilensis
- **Nombre Científico:** *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz.
- **Nombres populares:** maqui, maquei, queldrón, queldón, clon, coclón, koelon (Argentina, Chile), maki (Mapudungun, que significa “fruto”), Chilean blackberry (inglés).

El maqui es considerado uno de los tres árboles sagrados de los Mapuches, pueblo indígena del Sur de Chile (**Figura 8b**). Junto al “Canelo” y la “Laura” forman el “Rehue”, es decir, el árbol sagrado de las rogativas. Es también un símbolo de paz o intención pacífica y es ampliamente usado en la medicina natural indígena. Desde el punto de vista de la medicina tradicional de los Mapuches, desde la época de la conquista se describe

al maqui como un fruto medicinal. Alonso de Ovalle (1946) relataba *“sus hojas sirven en extremo contra quemaduras y otros accidentes que nacen del calor”*, atribuyendo propiedades cicatrizantes. Murillo, en 1889, mencionaba *“el poder antiinflamatorio del jugo de las hojas en afecciones de la garganta”*. Vicuña Mackenna, en 1887, reseñaba: *“del benéfico maqui se aprovechan los aborígenes para las diarreas como un poderoso astringente, y así úsanla todavía las casas grandes de Santiago”*[339, 340].



Figura 8: Maqui, su fruto y mujer indígena comercializándolo a) Maqui silvestre. b) Venta del maqui por mujer de ascendencia mapuche

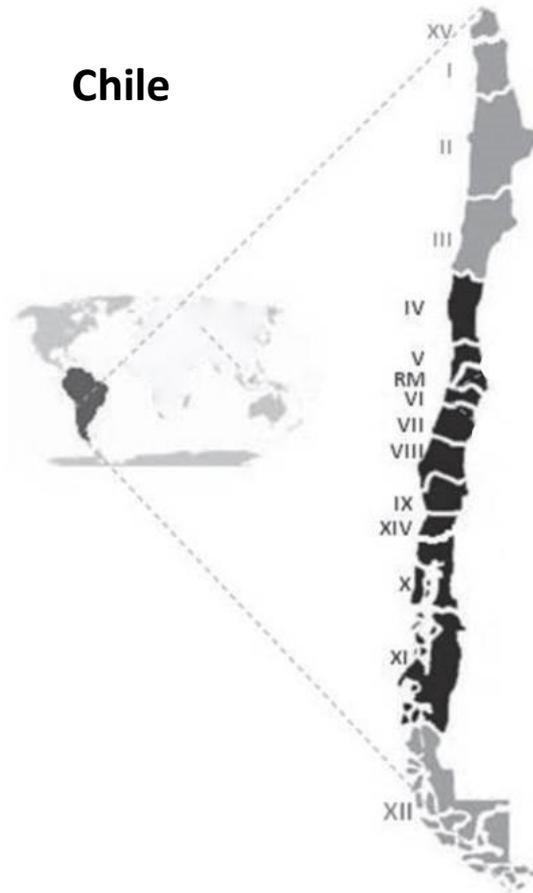


Figura 9: Distribución geográfica del fruto del Maqui. (Imagen obtenida y modificada de *Fredes C. y cols 2012 [299]*).

6.2 EXTRACTOS, CONTENIDO DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

6.2.1 EXTRACTOS

Diversos extractos del maqui han sido descritos con el fin de obtener y preservar el contenido de componentes bioactivos y la mayor actividad antioxidante (**Tabla 8**). Entre ellos, el extracto con metanol (MeOH) ha mostrado tener la mayor CA, medido tanto por ORAC, DPPH y FRAP, junto con presentar el mejor el contenido fenólico. Extractos con MeOH, junto con otros solventes como acetona o acetato de etilo, habitualmente utilizados en la extracción de sustancias derivadas de alimentos [341], presentan una importante actividad biológica, al favorecer la conservación de los componentes bioactivos durante el proceso de extracción [342]. Es importante destacar que, hasta ahora, no se han descritos efectos tóxicos de los extractos derivados de MeOH [341].

Además de la obtención de compuestos polifenólicos del fruto, es posible obtener extractos a partir de jugo de las bayas, con una capacidad antioxidante similar a la obtenida del fruto [343]. Se ha documentado que, para la obtención de la fase orgánica, el zumo de maqui debe diluirse con 200 mg/ml de equivalente de ácido gálico (GAE) a pH 7, en condiciones de oscuridad y en repetidas veces (3 veces) con acetato de etilo. Para la obtención de la fase neutra, la fase orgánica debe someterse a evaporación, para luego iniciar nuevamente el proceso con las mismas condiciones descritas previamente, pero a pH 2. Estas fases y fracciones de la extracción permiten obtener distintos compuestos polifenólicos [344].

Ref.	Procedimientos para la obtención de extracto de <i>Ach</i>	Concentración utilizada	Contenido de componentes activos	Capacidad antioxidante
[345]	<ul style="list-style-type: none"> 30 ml de MeOH ácido/H₂O (0.1% HCl) y homogeneizado 18000rpm x 2 minutos Centrifugación 3000 x g x 7 minutos a 4°C Recolección de sobrenadante Repetición de procedimientos con 30 ml de acetona/agua (70:30) Evaporación de la mezcla de los sobrenadantes a presión de <100mbar a 4°C. 	5 g de <i>Ach</i> liofilizado (todo el fruto)	CTP 49.74±0.57 mg/g CTF 12.19±0.02 mg/g CTA 22.58±0.24 mg/g	DPPH 28.18±0.37 mg/g ABTS 18.66±0.26 mg/g FRAP 25.22±0.38 mg/g
[346]	<ul style="list-style-type: none"> 4 ml de MeOH ácido/HCl a pH 1 Soonicar por 20 segundos y centrifugación por 5 minutos a 5000 rpm. Rescatar la fase metanólica Los residuos sólidos son reextraídos según procedimiento anterior con 2 ml de MeOH ácido x 3 veces. Las fases metanólicas son evaporadas y resuspendidas en agua Proceso de filtrado con membrana de filtro de diámetro 0.45 µm 	10mg de <i>Ach</i> (todo el fruto)	CTA 12.78±0.55 mg/g * 14.63 ± 0.9 mg/g **	-
[294]	<p>Extracto 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> Extracción con MeOH ácido al 0.1% de HCl Fraccionamiento del extracto con acetona y acetato de etilo La fracción de acetona es subfraccionada con hexano100%, hexano/acetato de etilo (1:1), acetato de etilo/MeOH (1:1) y 100% MeOH <p>Extracto 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> MeOH con agua purificada al 100% (6:4) 	200g de <i>Ach</i> (Separación de semillas, piel y pulpa)	CTP 15,987±799.35 µmol/g	ORAC 29,689.5±120.2 µmol TE/g
[344]	<ul style="list-style-type: none"> 1° Acetato de etilo pH 7 con 1N NaOH (aislamiento de catequinas, procianidinas, flavonoles, alcoholes aromáticos) 2° Metanol pH 2 con 1N HCl (aislamiento de ácidos fenólicos) 	4 ml zumo de <i>Ach</i>	CTP 87 mM/L	TRAP -58Mm/L TAR -40mM/L
[299]	<ul style="list-style-type: none"> Extracción con MeOH: H₂O (1: 1) durante 24 h con agitación. Evaporación del MeOH con un rotavapor Recuperación del extracto acuosos 	A partir de fruta deshidratada	CTP 19.07 mg/g PS	FRAP 38.9±01.7 mmol TE /100g PS

Tabla 8: Principales metodologías para obtención de extracto de *Ach*, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante. GAE: equivalente de ácido gálico; **MeOH:** Metanol; **CTP:** Contenido total de polifenoles; **CTF:** Contenido total de flavonoides; **CTA:** Contenido total de antocianinas; **PS:** Peso seco; *Variedad Morena; ** Variedad Luna Nueva

6.2.2 CONTENIDO DE POLIFENOLES

Maqui presenta diversos fitoquímicos, siendo extremadamente rica en antocianinas, que representan más del 65% del total de polifenoles. Las antocianinas no sólo son responsables del intenso color negrozco del maqui, sino que también son probablemente las responsables del alto poder antioxidante del fruto [344] y por tanto, las que confieran los posibles beneficios para la salud tales como efectos antiinflamatorios, antidiabéticos y cardioprotectores [346]. En total, se han descrito cerca de 19 compuestos polifenólicos, de los cuales 8 son antocianinas, 10 flavonoles y derivados del ácido gálico. Estudios recientes muestran que los compuestos más abundantes son los derivados de la delfinidina y derivados de la cianidina, tales como delfinidina-3,5-O-diglucósido, cianidina-3-O-sambubiosido-5-O-glucósido, delfinidina-3-O-sambubiosido, delfinidina-3-O-sambubiosido-5-O-glucósido y delfinidina-3-glucósido, siendo estos dos últimos los principales componente identificados [278, 299, 345].

Debido a la alta demanda de este fruto, se han desarrollado 2 clones de maqui denominadas “Luna Nueva” y “Morena”, los cuales presentan un contenido total de antocianinas de 14.63 y 12.79 mg/g de PS, respectivamente [343], aunque menores respecto a maqui salvaje según lo descrito por Genskowsky y cols. [345]. Entre estos pigmentos, la delfinidina 3-Ob-glucopiranósido-5-O-b-glucopiranósido es la más abundante en los clones de “Luna Nueva” (59% del total de antocianinas) y “Morena” (50% del total de antocianinas) [278]. Además de las antocianinas, se ha informado recientemente que Ach contiene más compuestos que promueven la salud, como micronutrientes y minerales y en particular, ácidos grasos insaturados en sus semillas [343]. El contenido de antocianinas del maqui ha sido determinado por diversos autores, como se indica en **Tabla 9**.

En general, diversos autores han obtenido el CTP en extractos del fruto usando el reagente Folin–Ciocalteu (**Tabla 8**). Genskowsky y cols. describen que los tres grupos principales de compuestos polifenólicos en las bayas de maqui como son los ácidos fenólicos, los flavonoides y las antocianinas, identificando un CTP de 49.49 mg/g [345], mientras que Reyes-Farias y cols. publica un CTP de 19.06 mg/g de PS, valores muy

superiores cuando se compara con otras bayas nativas chilenas y con bayas tradicionales como los arándanos (13.44 y 12.29 mg/g de PS, respectivamente)[299].

	Referencias	
	[347]	[345]
ANTOCIANINAS (mg/g)		
Delfinidina-3-glucósido	0.17 ± 0.02	9.48 ± 0.25
Delfinidina-3,5-diglucósido	0.23 ± 0.02	7.23 ± 0.04
Delfinidina-3- sambubiosido	0.14 ± 0.01	7.06 ± 0.15
Cianidina-3- sambubiosido-5-glucósido	0.18 ± 0.02	6.89 ± 0.06
Cianidina-3,5-diglucósido	-	5.36 ± 0.05
Delfinidina-3-- sambubiosido -5-glucósido	0.46 ± 0.01	4.36 ± 0.01
Cianidina-3-glucósido	0.086 ± 0.005	1.24 ± 0.02
Cianidina-3- sambubiosido	0.089 ± 0.004	0.73 ± 0.11
TOTAL	1.36 ± 0.004 (FF)	42.35 ± 0.08
	211.9 ± 0,6 (FS)	
NO ANTOCIANINAS		
Ácido Gálico		0.94±0.01
Mircetina-3-glucosido		0.62±0.01
Mircetina-3-galactosidasa		0.32±0.01
Dimetoxi-quecetina		0.28±0.00
Miricetina		0.25±0.01
Rutina		0.20±0.01
Quercetina-O-galoil hexósido		0.12±0.00
Quercetina-3-galactosidasa		0.17±0.00
Quercetina-3-glucosido		0.07±0.00
Quercetina		0.06±0.00
TOTAL		3.11±0.02

Tabla 9: Perfil y cuantificación de antocianinas de maqui. FF: Fruta fresca; FS: Fruta seca

6.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los valores ORAC informados por Speisky y cols. del maqui son de 19.86 mmol/100g de peso fresco del fruto. Estos valores de bayas nativas son aún más altos que las bayas cultivadas tradicionalmente [290]. En paralelo, la capacidad antioxidante descrita por Genskowsky y cols. alcanza valores FRAP de 25.22 g/mg y de DPPH de 28.18 mg/g [345]. Cuando el contenido de fenoles del maqui se compara con diferentes variedades de bayas, incluyendo el vino tinto por ser una fuente rica conocida de fenoles dietéticos, es posible observar que el fruto de maqui es superior, incluso cuando se compara con frutas de consumo habitual, mostrando el maqui diferencias en valores ORAC de hasta

80 veces [344, 348] (**Figura 10**). A su vez, cuando la actividad antioxidante del maqui se compara con otras bayas, es posible observar diferencias significativas, con un potencial de reducción férrica de 38.9 mmol Fe⁺²/100g de peso seco respecto a arándanos, que presentan un valor de 5.9 mmol Fe⁺²/100g de peso seco [348].

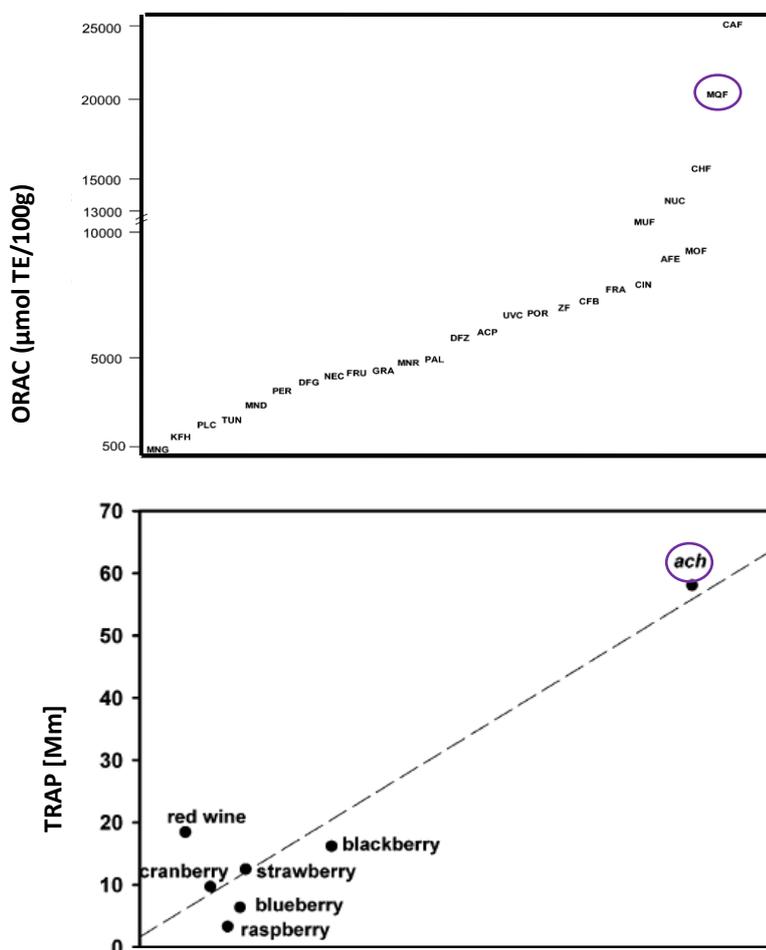


Figura 10: Comparación de capacidad antioxidante y contenido de polifenoles del maqui y otros frutos. a) Obtenido de Speisky H. y cols. 2012 [290]. Mangos (MNG), kiwis (KFH), bananas (PLC), peras (TUN), mandarinas clementinas (MND), peras Winter (PER), albaricoques (DFG), plátano (NEC), fresas (FRU), granadas (GRA), manzanas Royal (MNR), aguacates (PAL), duraznos (DFZ), almendras orgánicas (ACP), uvas Chardonnay (UVC), pomelos rosados (POR), Cerezas (CFB), frambuesas (FRA), grosellas (ZF), ciruelas negras (CIN), arándanos azules (AFE), moras (MOF), murtilla (MUF), nueces (NUC), manzanas (CHF), maqui (MQF; destacado en color lila) y calafate (CAF). b) Obtenido de Miranda-Rottmann y cols. [344]. Frambuesa (Raspberry), Arándano (Blueberry), Mora (Blackberry), arándano rojo (cranberry), fresas (strawberry), vino tinto (red wine), Ach (Aristotelia chilensis, maqui; destacado en color lila).

6.2.4 CONTRIBUCIÓN EN ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Son pocos los estudios hasta ahora que valoran la eficacia de extracto polifenólico del maqui (*Ach*), a partir de su fruto y de su hoja, sobre distintos mecanismos asociados a inflamación y oxidación (**Tabla 10**). La oxidación de LDL induce EO y modifica la expresión génica en células endoteliales, actuando en los eventos claves que desarrollan la estría grasa en la pared arterial. Ha sido descrito que los compuestos polifenólicos de los alimentos son capaces de proteger las células endoteliales expuestas a EO y por tanto actuar como cardioprotector [344, 349]. En estudios *in vitro* utilizando *Ach*, se ha mostrado que presenta capacidad para inhibir la oxidación de LDL. En HUVEC (células de la vena umbilical humana) incubadas con H₂O₂, como modelo vascular de EO, se ha observado una inhibición, dosis dependiente, del EO cuando las células se preincuban con diferentes concentraciones de *Ach*. Cuando se compara la fase acuosa, rica en antocianinas, con el extracto total sin fraccionar de jugo de *Ach* y de otros extractos de bayas, es posible observar que no existen diferencias significativas entre ellas, sugiriendo que los efectos beneficiosos se deben al contenido de antocianinas [344]. Al mismo tiempo, se ha indicado que extracto de maqui podría inhibir la peroxidación lipídica medido a través del ensayo TBARS (equivalente a MDA) en modelo animal [341, 350]. Otros efectos han sido atribuidos a el extracto de maqui, como el efecto antibactericida de extracto liofilizado contra diversos microorganismos (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, entre otras) [345].

Ref.	Especie	Modelo	Vía	Tipo de extracto	Dosis	Tiempo	Efecto Beneficioso
IN VITRO							
[342]	RAW264.7 Macrófagos	Modelo inflamatorio con LPS (1µg/ml)	-	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto MeOH 0.1% HCl • Extracto MeOH/acetona 	100µg/ml	12 horas	↓NO ↓iNOS ↓COX-2
[344]	HUVEC	<ul style="list-style-type: none"> •Oxidación LDL mediada por cobre •EO mediado por H₂O₂ (500 µM) 	-	Extracto acuoso	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µM de GAE de <i>Ach</i> • De 0.1µM a 10µM 	<ul style="list-style-type: none"> • Posinducción • Preinducción (30 minutos previo) 	↓ TBARS (como equivalente de MDA) ↓ EO intracelular
[348]	RAW264.7 Macrófagos	Modelo inflamatorio con LPS (5µg/ml)	-	Extracto MeOH/H ₂ O	100 µM de extracto	24 horas	↓iNOS ↓TNF-α ↑IL-10
[351]	Cultivo primario: Neuronas de hipocampo	Modelo neuronal de enfermedad de Alzheimer	-	Extracto EtOH	0.081 mg/ml	24 horas	↓Agregación plaquetaria β-amiloide
IN VIVO							
[294]	Rata	Isquemia	i.v	Extracto Maqui MeOH de	10 mg/kg en solución fisiológica (0.9%NaCl)	1 dosis previo a la inducción	↓presión sanguínea sistólica ↓TBARS (como equivalente de MDA)
[349]	Rata	Reactividad vascular	BDI	Extracto MeOH de maqui EtOHAc→ de hoja de	10 ⁻⁹ a 10 ⁻⁴ M	Preinducción de vasoconstricción	↓Reducción de la respuesta contráctil.

Tabla 10: Efecto de *Ach* in vivo e in vitro. AcOH: Ácido acético; i.v: intravenoso; BDI: Baño de inmersión; HUVEC: células de la vena umbilical humana; LPS: Lipopolisacáridos; EtOHAc: Etanol ácido.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades inflamatorias inmunomediadas, como la EII, que incluye la CU y la EC, son enfermedades crónicas que dan como resultado una inflamación descontrolada del tracto gastrointestinal. La prevalencia e incidencia de la EII en adultos y niños ha aumentado en todo el mundo durante las últimas décadas, principalmente en los países occidentalizados de Europa y América del Norte, y los países recientemente industrializados. El incremento global de la EII parece asociarse con la occidentalización de la dieta y estilos de vida, lo que afecta la microbiota intestinal y aumenta el riesgo de EII en individuos genéticamente susceptibles [2, 12].

Por lo impredecible del inicio y curso de la enfermedad, la EII representa una gran carga física y psicológica en los pacientes, afectando drásticamente la calidad de vida. A nivel del sistema sanitario, la EII representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, con costos directos anuales estimados de 4.6-5.6 miles de millones de € sólo en Europa [352].

Actualmente, el objetivo del tratamiento en la EII es inducir la remisión y tratar los síntomas y las complicaciones. Terapia tales como medicamentos antiinflamatorios, corticoides, antibióticos, inmunosupresores y terapia biológica forman parte del conjunto terapéutico destinados a mejorar la calidad de vida de los pacientes, aunque con diversos inconvenientes y relativa efectividad [16].

Específicamente, la EC es una afectación inflamatoria transmural discontinua que afecta a cualquier parte del tracto gastrointestinal y aunque los mecanismos fisiopatológicos permanecen sin dilucidar, actualmente es aceptada la interrelación entre EO e inflamación. El uso de modelos experimentales podría contribuir enormemente a comprender los mecanismos celulares y moleculares, siendo el más usado el modelo animal inducido químicamente con TNBS, el cual es un método económico, relativamente rápido en desencadenar un proceso inflamatorio y simula diversos aspectos clínicos, histopatológicos, moleculares e inmunitarios de la EC en humanos [75, 353].

De cara a la etiología y a los mecanismos fisiopatológicos que subyacen el desarrollo y la perpetuación de la inflamación en la EII, así como la terapia farmacológica subóptima, intervenciones dietéticas con nutraceuticos, enfocadas a contrarrestar la carga oxidativa y modular directamente la inflamación pueden ser una opción como parte del tratamiento en la EC.

En este contexto, los polifenoles, descritos previamente por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, podrían promover beneficios sobre la salud, prolongar la fase de remisión y disminuir la duración e intensidad de la fase aguda. Concretamente, la baya del maqui, endémica de Chile y ampliamente consumida por sus habitantes, contiene un excepcional aporte de polifenoles (antocianinas como la delfinidina y no antocianinas) y un destacable poder antioxidante [344, 354], mucho mayor que otros productos naturales [290]. Por tanto, el maqui podría tener un efecto beneficioso al atenuar la inflamación y el EO en un modelo animal de EC, tanto como tratamiento preventivo o curativo, y consecutivamente ser valorado para su uso clínico en pacientes con EC.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto polifenólico del maqui (*Ach*) en cultivos celulares y como terapia preventiva y curativa en un modelo murino de enfermedad de Crohn.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Generar un extracto de maqui rico en polifenoles totales y con alto poder antioxidante.
- II. Determinar en cultivos celulares la viabilidad y el EO (ROS) en células epiteliales del colon HT-29 tratadas con sustancia oxidante (H_2O_2) y en macrófagos RAW264.7 activados con LPS con y sin tratamiento de *Ach*.
- III. Estandarizar un modelo agudo de EC en ratones, estudiando las características macroscópicas e histopatológicas.
- IV. Evaluar el efecto preventivo y curativo de *Ach* mediante parámetros clínicos, macroscópicos e histopatológicos en ratones enfermos tratados con *Ach* antes y después de la inducción de la enfermedad.
- V. Evaluar los mecanismos moleculares relacionados con el EO (Nrf-2 y HO-1) en el modelo animal de EC y estudiar el impacto preventivo y curativo de *Ach* como tratamiento antioxidante.
- VI. Analizar las vías de señalización inflamatorias (iNOS y COX-2) en el modelo animal de EC y estudiar el impacto preventivo y curativo de *Ach* como tratamiento antiinflamatorio.
- VII. Identificar el papel del inflamasoma NLRP3 en el modelo animal de EC y evaluar el impacto preventivo y curativo de *Ach*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MAQUI

1.1 EXTRACTO POLIFENÓLICO DE MAQUI (*Ach*)

- **Muestra biológica:** El maqui se obtuvo de un producto envasado y comercializado en Chile denominado “ISLA NATURA DE CHILE®”. El fruto contiene semillas y pulpa, es de recolección silvestre en la Patagonia y es liofilizado para su venta.

- **Preparación del extracto:** Con el fin de obtener un extracto que incluya polifenoles totales (antocianinas y no antocianinas), la extracción se llevó a cabo utilizando MeOH ácido según el método publicado por Genskowsky y cols. en 2016 [345] con algunas modificaciones. A continuación, se detallan los pasos para la obtención del extracto (**Figura 11a, 11b, 11c, 11d**). Cabe destacar que todo el procedimiento se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente según lo descrito por Miranda Rottmann y cols. [344] (**Figura 12**)

- **PASO 1 → Extracción**

Se pesaron 50 gramos de maqui en polvo liofilizado y se añadieron 250 ml de MeOH/H⁺ (0,1%) a pH 1. Se movió con espátula con el fin de obtener una solución homogénea y se sonicó con un dispositivo de ultrasonido (Hielscher Ultrasound Technology UP400S) a máxima potencia durante 2 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos y se dejó precipitar por 5 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante en un Erlenmeyer y se repitió todo el proceso 5 veces.

- **PASO 2 → Evaporación**

Una vez que todos los sobrenadantes fueron recuperados, se puso en un rotavapor (Buchi B-490 Heating Bath) por 2-3 horas a 35°C con el fin de evaporar el solvente orgánico y concentrar el extracto. El extracto se resuspendió en H₂O_d, se centrifugó a 4000rpm durante 4 minutos y se recuperó el sobrenadante.

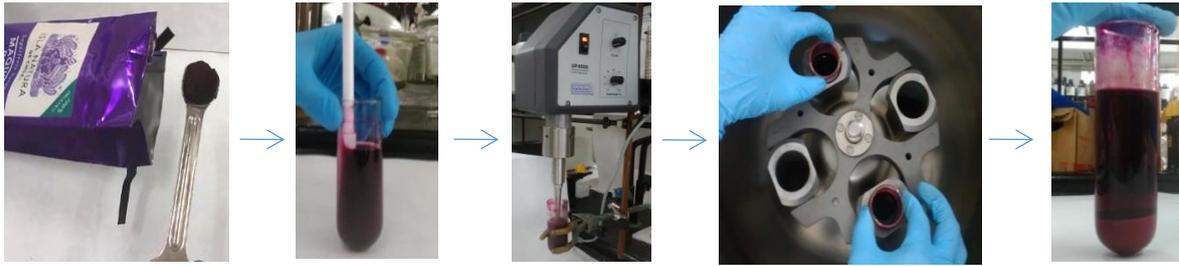
- **PASO 3 → Filtración**

La filtración se llevó a cabo mediante 3 procesos de filtración. En general, el proceso de filtrado se realizó al vacío en kitasato de 1 L. Para el primer filtrado se utilizó celita (Celite® Hyflo Supercel Merck, cód.: 1907/2006), para luego pasar por 2 filtrados con papel filtro de porosidad #1 (100-150 MM) y luego #3 (40-100 MM).

- **PASO 4 → Liofilización**

El producto final de la extracción se liofilizó (Telstar modelo Cryodos -80) por 24 horas. El proceso de liofilización es un método que evita cambios enzimáticos y químicos, desnaturalización de proteínas, pérdida de aromas y componentes fácilmente oxidables, no provocando pérdida de actividad.

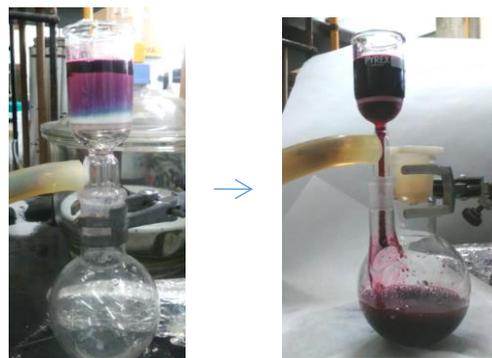
a)



b)



c)



d)

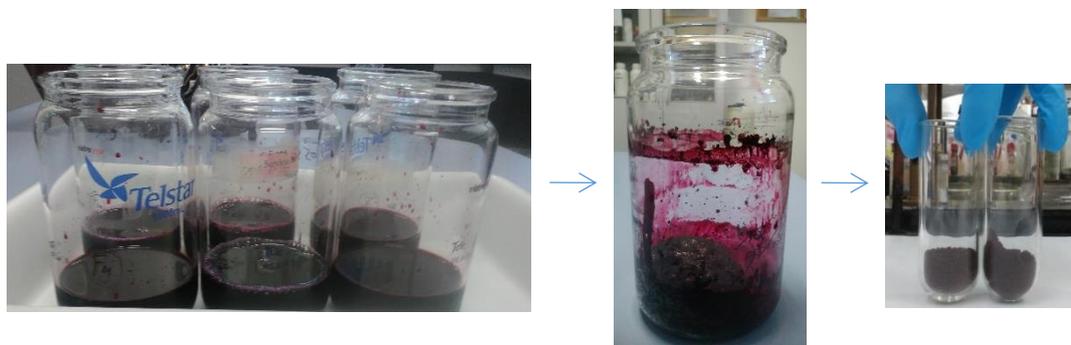


Figura 11: Procedimiento para la obtención del extracto del maqui. a) Extracción, b) Evaporación, c) Filtración, d) Liofilización.

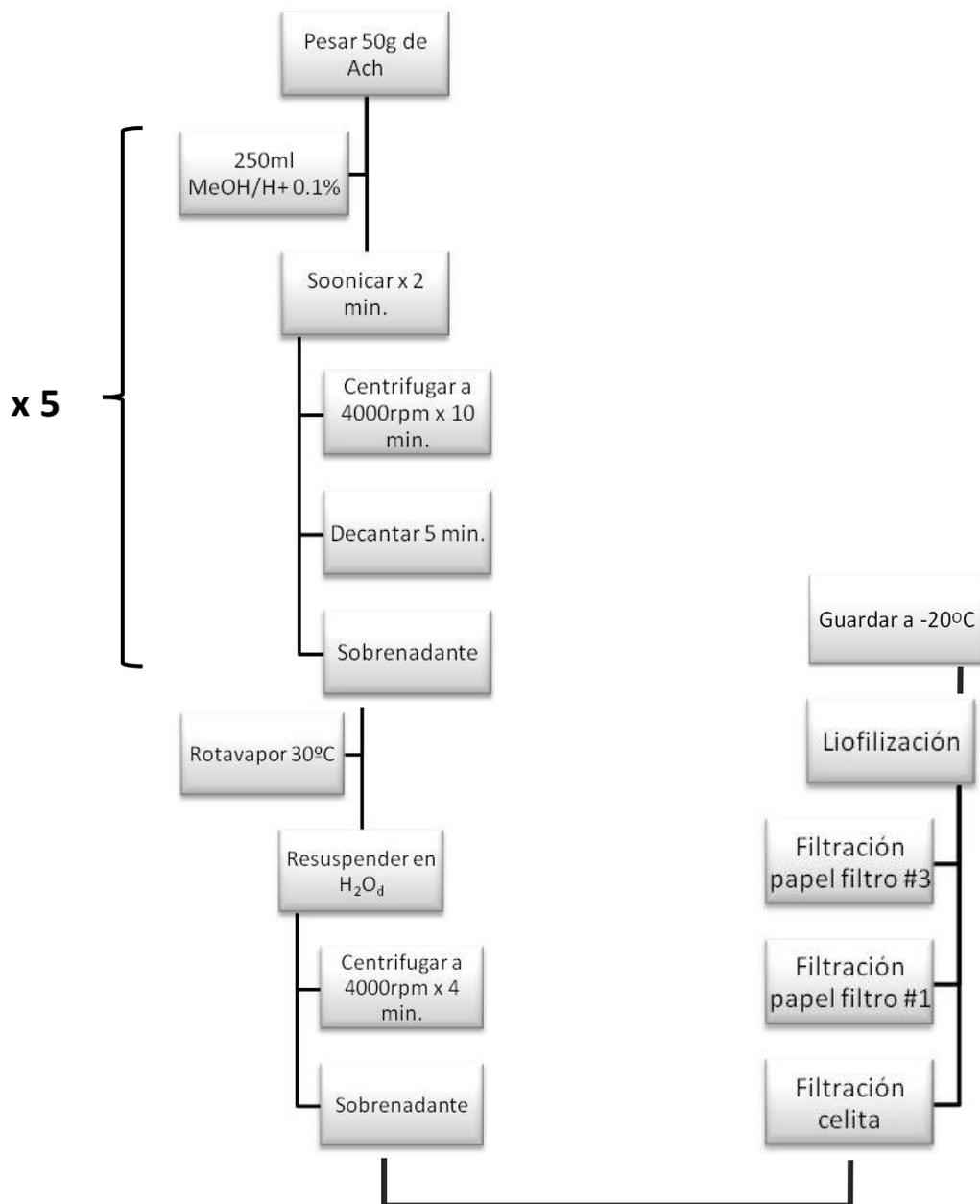


Figura 12: Esquematización de la obtención del extracto polifenólico de maqui (*Ach*).

1.2 ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES (CTP) POR FOLIN-CIOCALTEU

La concentración de polifenoles totales en *Ach* fue medida por espectrofotometría, según lo descrito por Matic y cols. [355]. El ensayo se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu, que contiene ácido fosfowolfrámico (2WO_4^{2-}), el cual se reduce originando W_2O_5 (azul de wolframio), a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino. El espectro de absorción de ese compuesto es evaluado a 740 nm.

El ensayo se llevó a cabo utilizando los reactivos Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, cód.: F9252), Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, cód.: 497-19-8) y ácido gálico ([AG] Sigma Aldrich, cód.: 149-91-7)

A. Preparación recta de calibración GA: Se utilizó una solución estándar de AG (0.1 mg/ml) de la cual se tomaron volúmenes de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 ml y se completó volumen hasta 25 ml de H_2O_d .

B. Procedimiento para análisis:

- Preparación de solución de estudio: Se pesó 12.8 mg de *Ach* liofilizado y se disolvió en 10 ml de H_2O_d . La concentración de la disolución fue de 1.28 mg/ml
- Se tomó una alícuota de 20 ml de la disolución de maqui preparada anteriormente, y se llevó a un matraz aforado de 50 ml y enrasó con agua.
- Se tomó una alícuota de 0,5 ml de la dilución anterior a un matraz aforado de 25 ml y se añadió 1.3 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y 2.5 ml de Na_2CO_3 saturado.
- Se homogeneizó la muestra.
- Se esperó 10 minutos a 40°C hasta la aparición de un color azul.
- Se comparó visualmente la intensidad del color azul de la muestra de *Ach* con las disoluciones patrones de AG.
- Se realizó la medición de absorbancia a 740nm
- Los resultados son expresados en mg de AG/g de extracto de maqui.

1.3 ESTIMACIÓN DE PODER ANTIOXIDANTE A TRAVÉS DE MÉTODO FRAP

El método FRAP fue determinado según lo descrito por Benzie y cols. en 1996 [356]. El ensayo se basa en el uso de antioxidantes como reductores e inactivación de oxidantes (especie reducida a expensa de la oxidación de otra) en una reacción colorimétrica relacionada con redox, donde el complejo férrico $[\text{Fe}^{3+}]$ -2,4,4-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) incoloro, es reducido a un complejo coloreado azul intenso, el ion ferroso (Fe^{2+} -TPTZ).

El ensayo se llevó a cabo utilizando los reactivos TPTZ (Sigma Aldrich, Cód.: 3682-35-7), Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, Cód.: 10025-77-1) y Trolox para recta de calibración (Sigma Aldrich, Cód.: 53188-07-1).

A. Preparación de FRAP: se utilizó la mezcla de los siguientes reactivos, siguiendo el orden de aparición:

- Ácido clorhídrico (HCl): 40mM → Se diluyó 535 μl de HCl (37%) en 100 ml de $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$
- Buffer acetato 0.3mM pH = 3.6 → Para 250 ml, se disolvió 0.0061g de acetato sódico (NaAc) en 200 ml de $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$. Se ajustó pH utilizando HCl 40mM y se completó hasta 250 ml.
- Solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 20mM → Se disolvió 0.1352 g de solución en 25 ml de $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$
- Solución TPTZ 10mM → Se pesó 0.0312 g del reactivo y se disolvió en un matraz de 10 ml con HCl 40mM

FRAP → 10:1:1 (v:v:v) → Buffer acetato + TPTZ + $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

La solución final de trabajo FRAP fue preparada el mismo día del ensayo y mantenida durante todo el proceso en baño a 37°C.

B. Preparación de la recta de calibración Trolox: La solución madre se preparó disolviendo 0.01g de Trolox en 5 ml de MeOH + 5 ml de d_4H_2O . A partir de esta solución se prepararon distintas concentraciones para distintos puntos de la recta (Tabla 11)

Volumen Solución madre (ml)	Concentración Final (μM)
0,01 g/10 mL	
0,5	399,5
0,45	359,5
0,4	319,6
0,35	279,6
0,3	239,7
0,25	199,7
0,2	159,8
0,15	119,8
0,1	79,9

Tabla 11: Concentración de Trolox para la recta patrón

C. Procedimiento para análisis:

1. Preparación de solución de estudio: Se pesó 12.8 mg de *Ach* liofilizado y se disolvió en 10 ml de H_2O_d . La concentración de la disolución fue de 1.28 mg/ml
2. Para el blanco: 2 ml del reactivo FRAP + 1ml de H_2O_d
3. Se añadieron 2.0 ml de FRAP, 0.9ml de H_2O_d y 0.1 ml de muestra o estándar
4. Se invirtió el tubo para mezclar
5. Se mantuvo en oscuridad hasta la medición
6. Medición de absorbancia a 593nm
7. Los resultados son expresados en μmol de TE/g

2. IN VITRO

2.1 CULTIVO CELULAR

- **HT-29**

La línea celular epitelial de cáncer de colon humano obtenida del departamento de Farmacia (Universidad de Sevilla) fueron mantenida en medio McCoy's 5a (Biowest, cód.: L0210) suplementado con suero fetal bovino ([SFB], Biowest, Cód.: S1810) al 10% y penicilina-estreptomicina ([P/ST] Biowest, cód.: L0014) al 1%. Las células se incubaron a 37° C y 5% de CO₂. Todos los ensayos se llevaron a cabo con una confluencia del 80%. Las condiciones de mantención de la línea celular se detallan en **Anexo 1**.

- **RAW 264.7**

Línea celular de macrófagos de ratón obtenida del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla. Fueron mantenidas en medio DMEM alto en glucosa (Biowest, cód.: L0102) con SFB al 10% y 1% de P/ST. Las células se incubaron a 37° C y 5% de CO₂. Todos los ensayos se llevaron a cabo con una confluencia del 80%, mientras que las condiciones de mantención de la línea celular se detallan en **Anexo 1**.

2.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó Alamar Blue Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Invitrogen™, cód.: DAL1025) como indicador de actividad metabólica. Específicamente, el ensayo utiliza resazurina, un colorante azul, permeable a nivel celular y débilmente fluorescente. Al entrar en la célula, la resazurina es reducida a resorufina, produciendo un cambio colorimétrico (rojo-rosa) y una señal fluorescente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. El procedimiento se llevó a cabo según lo indicado por el proveedor

A. Procedimiento para el análisis (Figura 13)

- Se sembró la línea celular en placa de 24 pocillos (P24) a una densidad de 1.2×10^5 células/ml cuando el flask de origen llegó a una confluencia del 80%.
- Se realizó los tratamientos correspondientes una vez fue obtenida la confluencia del 80%.
- Una vez transcurrido el experimento se procedió a remover el medio.
- Se lavó 2 veces con PBS.
- Se añadió Alamar Blue en una proporción 1:10 (medio). El medio no llevaba rojo fenol ni suplementación, ya que se ha visto que el suero o proteínas adicionales interfieren con la emisión de fluorescencia o absorbancia [344].
- Las células se incubaron de 1 a 4 horas (la sensibilidad de detección incrementa con mayor tiempo de incubación) a 37°C, 5% de CO₂ y protegidas de la luz.
- Se tomaron 100 µl de medio de cada pocillo y se llevaron a placa de 96 pocillos (P96) para su lectura.
- Se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placa (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, cód.: N07710).

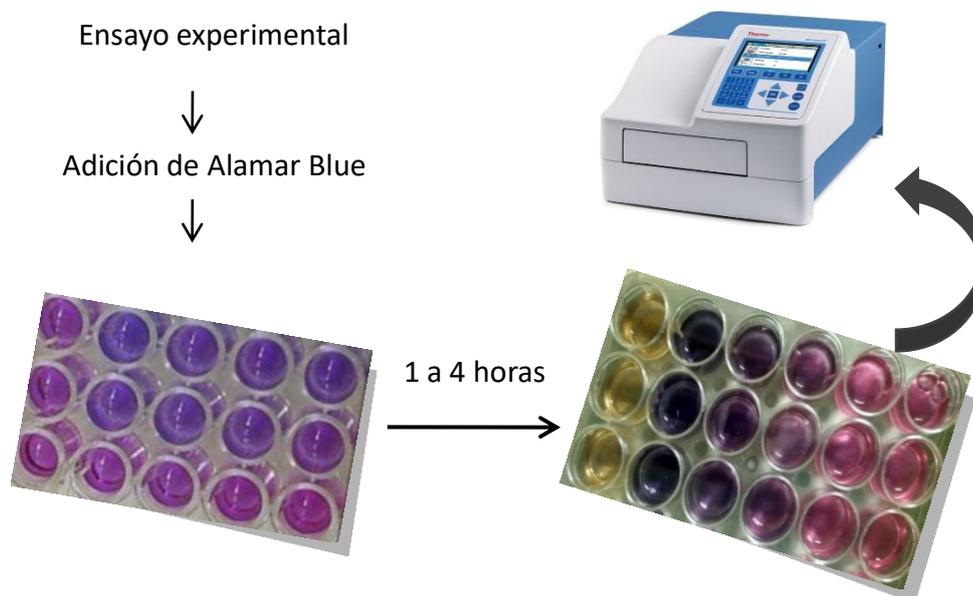


Figura 13: Pasos para la evaluación de viabilidad celular por Alamar blue

- Dada la relación directa entre absorbancia y viabilidad celular, el cálculo se realizó respecto a las células control según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

Donde la absorbancia de la muestra es la obtenida con los diferentes tratamientos administrados y la absorbancia control son las células sin tratar.

B. Concentración y tiempo de medición

- **HT-29**

- **Concentraciones de *Ach*:** [100 µg/ml]; [200 µg/ml]; [300 µg/ml]
- **Tiempo de tratamiento con *Ach*:** 24 y 48 horas posinducción de terapia oxidante.
- **Control positivo:** Antioxidante conocido N-acetilcisteína (NAC) a 5mM (Sigma Aldrich, cód.: A9165) [357].
- **Sustancia Oxidante:** H₂O₂ 0.05% (500 µM) al 30% v/v (PanReac AppliChem, cód.: 131077)

- **RAW 264.7**

- **Concentraciones de *Ach*:** [75 µg/ml]; [100 µg/ml]; [200 µg/ml]; [300 µg/ml]
- **Tiempo de tratamiento con *Ach*:** 12 horas
- **Control positivo:** 5-ASA (ACROS Organics™, cód: 89-57-6) a una concentración de 0.1, 0.5 y 1 mM. Se valoró sinergia con 100 µg/ml de *Ach* con 0.1 mM de 5-ASA.
- **Sustancia inductora de inflamación:** 1 µg/ml de LPS (Sigma Aldrich, cód.: L2630)

2.3 DETERMINACIÓN DE ROS

Para la evaluación de la producción de EO se utilizó como indicador el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) de acuerdo con el método de Wang y cols. en 1999 [358]. El DCFH-DA es captado por las células, y mediante las esterasas intracelulares, es metabolizado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), que en presencia de ROS (ONOO⁻), se oxida a diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente que es utilizado como medida cuantitativa de EO celular.

A. Procedimiento para el análisis

- Se sembró la línea celular en P96 a una densidad de 11.8×10^4 células/ml cuando el flask de origen llegó a una confluencia del 80%.
- Se realizó tratamientos correspondientes una vez obtenida confluencia del 80%.
- Se preparó una solución madre de DCFH-DA a 0.01M/L en DMSO y almacenándola a -20 ° C.
- Las células fueron tratadas con diversos tratamientos (extracto de *Ach* y sus controles) e incubadas durante 1 hora a 37°C y a 5% de CO₂.
- Se removió el sobrenadante y se lavó 2 veces con PBS.
- Posteriormente, se añadió 25 µM de solución de DCFH-DA en medio sin rojo fenol y sin suplementar durante 30 minutos. Se incubó a 37°C y a 5% de CO₂.
- El registro de fluorescencia se realizó con una excitación de longitud de onda de 485 nm con el dispositivo Infinity Control, utilizando el programa Tecan-i-control.
- Dado que DCFH-DA mide indirectamente la cantidad de ROS generado, el cálculo se realizó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Oxidación} = \frac{RFU \text{ tratamiento} - RFU \text{ sin células}}{RFU \text{ control positivo} - RFU \text{ sin células}} \times 100$$

Donde *RFU tratamiento* es la fluorescencia media detectada por cada condición; *RFU sin células* es la fluorescencia media detectada en los pocillos que contenían DCFH-DA con medio, pero sin células; y *RFU control positivo*, es la fluorescencia media detectada en los pocillos con LPS y medio.

B. Concentración y tiempo de medición

- **HT-29**

- **Concentraciones de *Ach*:** [100 µg/ml]; [200 µg/ml]; [300 µg/ml]
- **Tiempo de tratamiento con *Ach*:** 1 hora
- **Control:** Antioxidante conocido N-acetilcisteína (NAC) a 5mM (Sigma Aldrich, cód.: A9165) [357].
- **Sustancia Oxidante:** H₂O₂ 0.05% (500 µm) al 30% v/v (PanReac AppliChem, cód.: 131077)

- **RAW 264.7**

- **Concentraciones de *Ach*:** [75 µg/ml]; [100 µg/ml]; [200 µg/ml]; [300 µg/ml]
- **Tiempo de tratamiento con *Ach*:** 12 horas
- **Control:** 5-ASA (ACROS Organics™, cód: 89-57-6) a una concentración de 0.1, 0.5 y 1 mM. Se valoró sinergia con 100 µg/ml de *Ach* con 0.1 mM de 5-ASA.
- **Sustancia inductora de la inflamación:** 1 µg/ml de LPS (Sigma Aldrich, cód.: L2630)

3. *IN VIVO*

3.1 MODELO ANIMAL

3.1.1 Animales

Se utilizaron ratones Balb/c adultos de 12 a 14 semanas de edad y de peso entre 19 y 39 gramos del Servicio de Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se emplearon procedimientos aprobados por correspondiente Comité de ética (**Anexo 2**). Se proporcionó a los ratones alimento y agua *ad libitum* y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas, temperatura de 25°C y humedad de 55%. Los ratones se anestesiaron mediante anestesia ventilatoria con Isoflurano para la inducción de la EC y bajo anestesia intraperitoneal (i.p.) para el sacrificio (**Anexo 3**).

3.1.2 Grupos experimentales

Los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos de 6 ratones cada uno:

1. Grupo 1 [G1]: CONTROL de la inducción (sólo EtOH 50%)
2. Grupo 2 [G2]: ENFERMO [EC] (TNBS + EtOH 50% sin tratamiento)
3. Grupo 3[G3]: TNBS + *Ach*, 1 día después de la inducción con TNBS hasta sacrificio → **Terapéutico**.
4. Grupo 4 [G4]: TNBS + *Ach*, 7 días previos a la inducción con TNBS hasta sacrificio → **Preventivo**.

Para la inducción de la enfermedad, se preparó TNBS (Sigma-Aldrich, cód.: 92822) a una concentración de 100 mg/Kg con EtOH al 50% y se inoculó por vía intracolónica (i.c.) insertado a unos 3 a 4 cm mediante sonda de poliuretano de 2 mm de grosor, según protocolo (**Anexo 4**). El día anterior a la intervención se le retiró el pienso durante 12 horas con el fin de mantener el colon libre de heces. Los animales se mantuvieron 5 días después de una única dosis i.c. de TNBS hasta su sacrificio [188]. *Ach* se administró a una dosis de 50 mg/Kg por vía orogástrica (**Figura 14**)

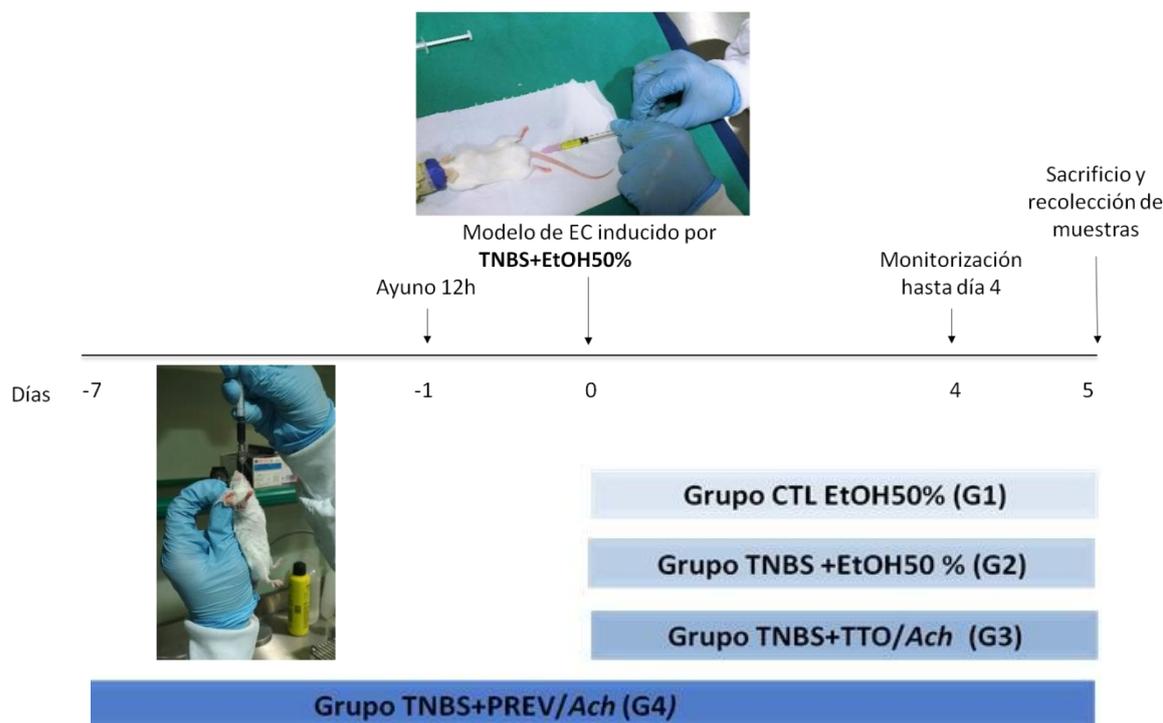


Figura 14: Esquema experimental de inducción de EC y administración de *Ach*

3.1.3 Valoración de la severidad de la enfermedad

La actividad clínica de la colitis se evaluó durante la experimentación para determinar el índice de actividad de la enfermedad (DAI), según Gommeaux y cols. [359]. Se valoró la presencia de diarrea, hemorragia rectal y porcentaje de pérdida de peso en una escala de 0 a 3 (Tabla 12).

Score	Criterio		
	Pérdida de peso (%)	de Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	<1	Heces formadas	Ausencia
1	1 – 4.99	Heces blandas no adheridas al ano	Pequeñas manchas de sangre en las heces; región anal seca
2	5-10	Heces muy blandas adheridas al ano	Grandes manchas de sangre en las heces; La sangre aparece a través del orificio anal.
3	>10	Heces líquidas; ano mojado	Heces de color rojo oscuro; La sangre se extiende en gran parte alrededor del ano.

Tabla 12: Índice de actividad clínica

3.1.4 Estudio macroscópico

Tras la anestesia i.p. de los animales, se extrajo el intestino grueso, se pesó, se midió (ancho y largo) y se realizó registro fotográfico. Posteriormente, el intestino grueso se abrió por incisión longitudinal. La **Tabla 13** muestra los criterios para evaluar el daño a través del sistema de puntuación macroscópico modificado del descrito por Appleyard & Wallace en 1995 [223].

Score	Criterio	
0	Sin daño	
1	Hiperemia focal	
2	Engrosamiento de la pared intestinal	
3	Ulceración «U» con inflamación «I» en 1 sitio	
4	«U» e «I» en 2 sitios o 1 sitio de «U» e «I» con extensión > 1 cm	
5	Si el daño es >2 cm de longitud, el score incrementa en 1 por cada cm adicional	
Adicional		
0→ Ausencia de diarrea	1→ Presencia de diarrea	
0→ Ausencia de mucus	1→ Presencia de mucus	
Adicional		
0→Sin adhesiones	1→Adhesiones menores	2→Adhesiones mayores
0→Sin congestión	1→Congestión en 1 sitio	2→Congestión en >2 sitios

Tabla 13: Score de daño macroscópico intestinal

3.1.5 Estudio histopatológico

Tras la extracción del colon, este se lavó con PBS para eliminar los restos de sangres y heces. Posteriormente, se cortó el intestino grueso longitudinalmente en dos; una mitad se congeló en nitrógeno líquido para análisis posteriores y la otra mitad se enrolló desde el extremo distal hasta el proximal (**Figura 15**). Una vez hecho el rollito se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en parafina. Se realizaron cortes seriados (1:5:10) de 4 µm y se tiñeron con hematoxilina & eosina (H&E) y ácido peryódico-reactivo de schiff (PAS) (**Anexo 5**) para su posterior estudio histopatológico. Se examinaron las preparaciones para asignar puntuación del daño a nivel microscópico de acuerdo con un sistema modificado basado en el propuesto por Appleyard & Wallace en 1995 [223] (**Tabla 14**).

Score	Criterio
0,1,2 y 3 (ausente, leve, moderado y severo)	Pérdida de la arquitectura de la mucosa Infiltración celular Depleción de células caliciformes
0 o 1 (ausente o presente)	Formación de abscesos en criptas Necrosis Ulceración

Tabla 14: Score de daño microscópico intestinal

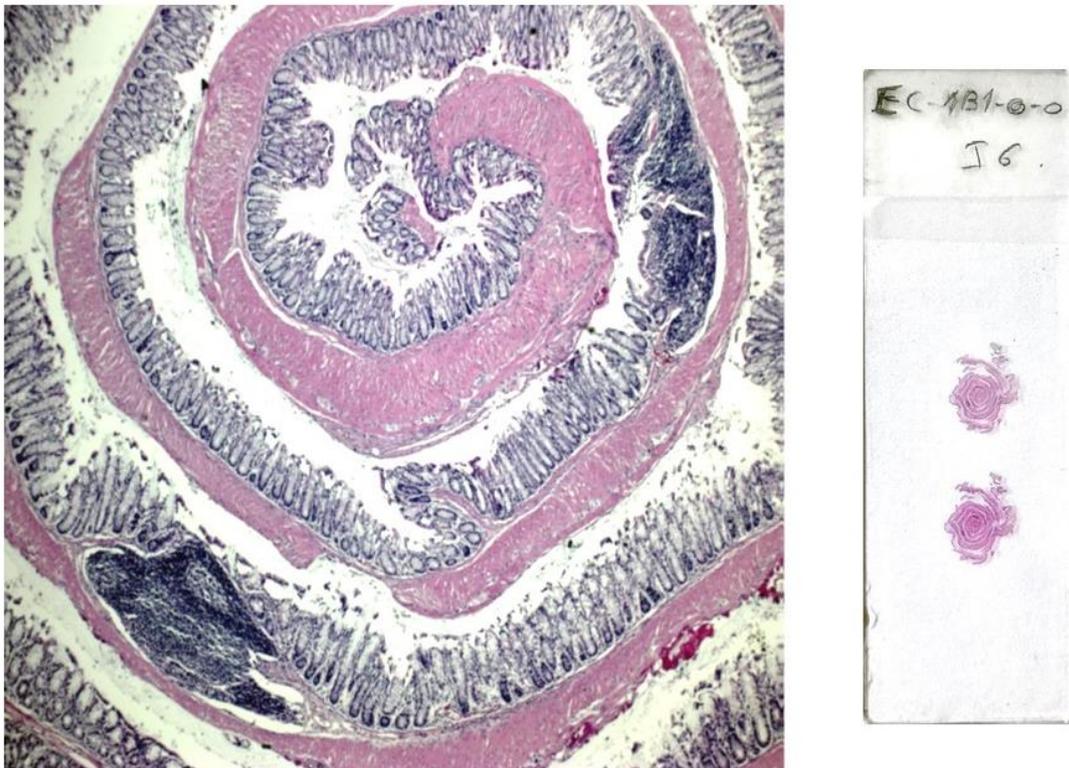


Figura 15: Tejido del intestino grueso entero enrollado en portaobjeto. Colon enrollado de toda su longitud para la evaluación microscópica en un único corte.

4. Obtención de proteínas citoplasmáticas y análisis de Western blot

4.1 Procesamiento de las muestras:

Se seleccionaron al azar 4 tejidos de colon por grupo ($n=4$) congelados en nitrógeno líquido. Se pesaron unos 100mg de tejido aproximadamente y se homogeneizaron en un sonicador con tampón de lisis helado en proporción 1:3 (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 8 mM MgCl₂, 5 mM etilenglicol bis (ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetra-acético [EGTA]), 0.5 mM de EDTA, 0.01 mg/ml de leupeptina, 0.01 mg/ml pepstatina, 0.01 mg/ml aprotinina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 250 mM NaCl). Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000g, 15 min, 4 ° C y los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80 ° C (**Anexo 6**).

4.2 Determinación de proteínas:

Para determinar la concentración de proteínas de los homogenados de colon se utilizó el método colorimétrico de Bradford [360]. De las alícuotas que contenían los sobrenadantes se realizó una dilución 1:20 (2µl de muestra: 38µl de H₂O_d) para calcular los mg proteína/ml (**Anexo 7**).

4.3 Análisis de Western blot

Las muestras de los sobrenadantes con cantidad igual de proteína (30 µg) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (PAGE/SDS) al 10% y 15% dependiendo de la proteína de interés. Luego, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron con rojo Ponceau para registrar la eficiencia de la carga de proteína. A continuación, las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino [BSA] al 5% disuelta en Nonidet™ P 40 [NP-40] al 0.5% y PBS pH 7.4) a temperatura ambiente durante 1 ½ hora. Posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios específicos en solución de bloqueo toda la noche: anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS (1:1000; Stressgen-Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, cód: ADI-KAS-NO001-D), anticuerpo policlonal de conejo anti-COX2 (1:300; Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA, cód.: 160116), anticuerpo policlonal de conejo anti-Nrf-2 (1:1000; Santa Cruz, USA cód: sc-722), anticuerpo policlonal de conejo anti-HO-1 (1:1000; Stressgen-Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, cód: ADI-SPA-896), anticuerpo monoclonal de conejo

anti-NLRP3 (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: D4D8T), anticuerpo monoclonal de conejo ASC (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: D2W8U) y anticuerpo policlonal de conejo anti-Caspasa 1 (1:1000; abcam, Cambridge, UK, cód.: ab1872). Después de 3 lavados, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo unido a peroxidasa de rábano (HRP) (1:1600; Cell Signaling, Danvers, MA, USA; cód.: 7074P2) o anti-ratón (1:1600; Dako®, Atlanta, cód.: P0447) en solución de bloqueo por 1 ½ hora a temperatura ambiente. Para demostrar la igual carga de proteínas, se incubó con β -actina utilizando un anticuerpo anti- β -actina (1:6000; Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU, cód.: A5316) (**Anexo 8**).

La inmunodetección se realizó con un kit de detección de luz de quimioluminiscencia mejorada (SuperSignal West Femto [para todas las proteínas] y Pico [para β -actina] Pierce, IL, EE. UU.). Luego, se monitorizaron las señales inmunológicas utilizando un sistema de imagen molecular automatizado para proteínas por quimioluminiscencia (Amersham 600, ge Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Las señales se analizaron y cuantificaron con un sistema de imagen (Biophotonics ImageJ Analysis Software, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) y se expresaron como porcentaje con respecto al grupo control.

5. Determinación de IL-1 β

Las concentraciones de IL-1 β en tejido colónico fueron medidas mediante el kit de inmunoensayo enzimático cuantitativo (ELISA) de acuerdo a instrucciones del fabricante (Murine IL-1 β , PeproTech, cód.: 900-K47). Un subconjunto aleatorio de muestras de colon ($n = 6$) se seleccionaron para el ensayo. Las muestras de intestino grueso se pesaron y homogeneizaron en frío con sonicador en tampón inhibidor de proteasa para ELISA en proporción 1:20 (PSS 1X, 0.5 mM de EDTA, 0.01 mg/ml de leupeptina, 0.01 mg/ml pepstatina, 0.01 mg/ml aprotinina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF]). A continuación, los homogenados se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4 ° C y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80 °C. Los niveles de citoquinas fueron expresados como pg/mg de tejido (**Anexo 9**).

6. Análisis estadístico

Todos los valores en figuras y tablas se expresaron como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM). Para los cálculos de la desviación estándar en datos expresados en porcentajes se utilizó el % de desviación estándar relativa (%DER). Para realizar comparación de medias, en primer lugar, se comprobó la normalidad de las variables usando la prueba de Shapiro Wilk. Para evaluar el supuesto de igualdad de varianzas se utilizó prueba de Levene. Cuando se comprobó que la variable tuvo una distribución normal y homogeneidad de varianzas se aplicó prueba t de student para la comparación de 2 medias. En caso contrario se aplicó prueba de U de Man Whitney. Para la comparación de 3 medias o más, primero se utilizó prueba de Shapiro Wilk para comprobar supuesto de normalidad y prueba de Bartlett para comprobar igualdad de varianzas. En caso de cumplir los supuestos se utilizó prueba de ANOVA y cuando los supuestos de normalidad y varianzas no se cumplieron se utilizó prueba de Kruskal-Wallis. Cuando ANOVA o Kruskal-Wallis arrojó un nivel de significancia < 0.05 se realizó prueba post-hoc de Bonferroni. Todos los datos fueron considerados estadísticamente significativos con un *p-value* < 0.05 y *p-value* < 0.01 . Los experimentos que involucran ensayos in vitro y análisis de Western blot fueron realizados por triplicado. Los análisis de ELISA fueron realizados por duplicado. El análisis histopatológico fue realizado a ciegas o enmascarado con el fin de evitar el sesgo del observador. Todos los datos fueron procesados en software STATA 12.0

VII. RESULTADOS

1. Contenido Total de Polifenoles del extracto de maqui

La **Tabla 15** se indican los valores de absorbancia de distintas concentraciones de ácido gálico (AG) comprendidas entre 0.5 ppm y 8 ppm. En la **Figura 16** se muestra la recta de calibrado, representando la absorbancia frente a concentración de AG (ppm). La absorbancia del blanco fue de 0.03.

[AG] (ppm)	Abs (740nm)
0,5	0,064
1	0,1292
2	0,2296
4	0,4289
8	0,8635
8	0,8231

Tabla 15: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox. AG: Ácido Gálico; **Abs:** Absorbancia

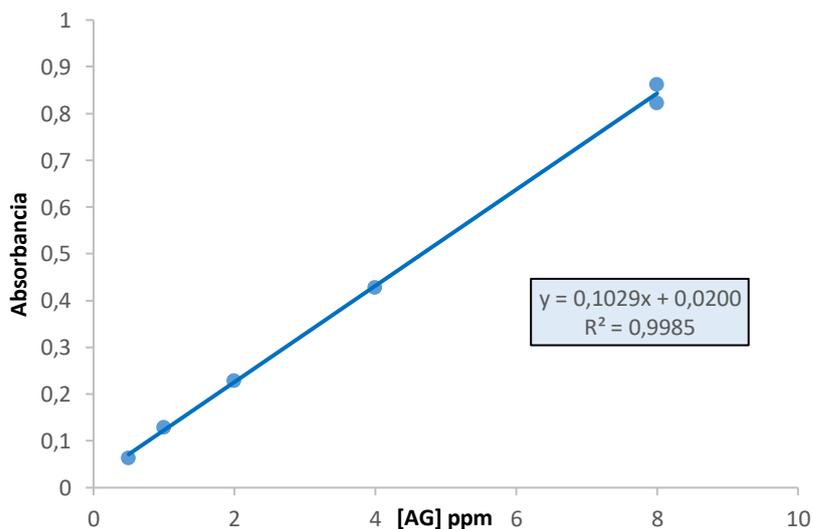


Figura 16: Recta de calibración de AG

Los resultados del método de Folin Ciocalteu revela que en cada gramo del extracto liofilizado del fruto del maqui hay en promedio 39.02 mg de polifenoles expresados como AG (**Tabla 16**).

		Abs corregida	[C] ppm	[C _{muestra}] ppm	mg muestra	CTP mg/g
M1=	0,2434	0,2134	1,87949466	23,49368319	5,8734208	39,5516552
M2=	0,2382	0,2082	1,82896016	22,86200194	5,71550049	38,4882188
		BM= 0,03				

Tabla 16: Contenido de polifenoles totales en extracto liofilizado de maqui. M1: Muestra 1; **M2:** Muestra 2; **BM:** Blanco muestra; **CTP:** Contenido total de polifenoles

2. Capacidad Antioxidante de extracto de maqui

La **Tabla 17** muestra los valores de absorbancia de distintas concentraciones de Trolox comprendidas entre 79.9 μ M y 399.5 μ M. En la **Figura 17** se presenta la recta de calibración con los datos obtenidos del ensayo FRAP representando la absorbancia frente concentración de Trolox (μ M).

[Trolox] (μ M)	Abs [593nm]
399,5	0,6
359,5	0,582
319,6	0,497
279,6	0,439
239,7	0,379
199,7	0,311
159,8	0,255
119,8	0,192
79,9	0,123

Tabla 17: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox. Abs: Absorbancia

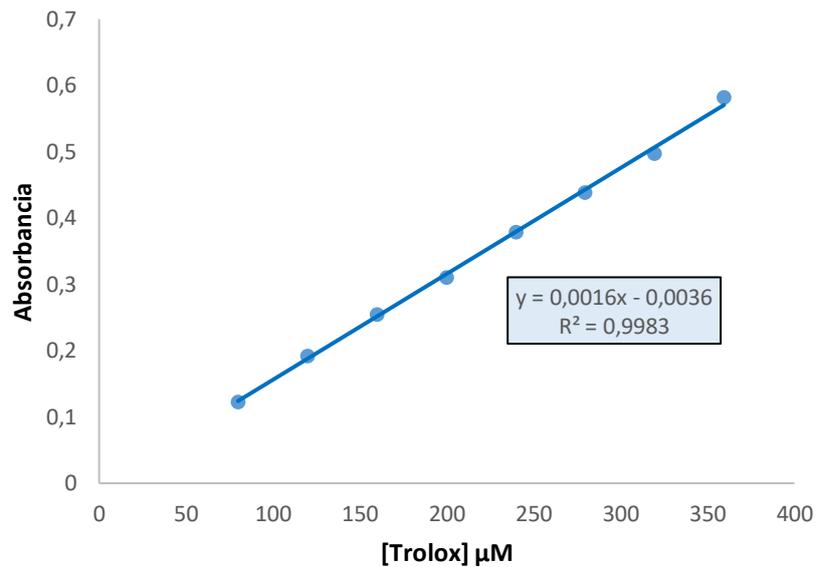


Figura 17: Recta de calibración Trolox

Los resultados respecto a la capacidad antioxidante (CA) del extracto de maqui de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} se muestran en la **Tabla 18**. A partir de la disolución madre de 1.28 mg/ml se realizaron dos disoluciones a distintas concentraciones de extracto para determinar su actividad antioxidante. La disolución #1 muestra una CA de 20843.75 $\mu\text{mol TE/g}$, mientras que la disolución #2 presenta una CA de 20296.87 $\mu\text{mol TE/g}$, mostrando valores similares entre ellas. En promedio, los datos indican que el extracto de maqui presenta una CA de 20.571,31 $\mu\text{mol TE/g}$.

Muestra (#)	[mg/ml]	Absorbancia	μM muestra	Actividad Antioxidante $\mu\text{mol TE/g}$
0	1.28	-----		
1	0.128	0.142	88.937	20843.75
2	0.512	0.554	346.437	20296.87

Tabla 18: Capacidad Antioxidante del extracto polifenólico de maqui

3. Efecto de *Ach* sobre viabilidad celular

Las células epiteliales de colon HT-29 fueron expuestas a 0.05% de H₂O₂ como agente oxidante en este modelo de EO. Para probar el efecto protector del maqui, las células se incubaron con concentraciones crecientes de *Ach* durante 24 y 48 horas y se comparó con NAC, un antioxidante ampliamente conocido y de uso clínico (**Figura 18**). Después de la exposición a los compuestos, se evaluó la viabilidad celular mediante la prueba de Alamar Blue®. Los resultados mostraron una reducción significativa (*p-value* <0.01) de la viabilidad en aquellas células expuestas a H₂O₂. Cuando las HT-29 se incubaron con el extracto polifenólico de maqui (*Ach*), se redujo la muerte celular causada por EO, incrementando la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa (*p-value* <0.01) a las 24 horas cuando se trató con *Ach* a una concentración de 300 µg/ml. A las 48 horas, desde las concentraciones más bajas hasta las más altas de *Ach* (100, 200 y 300 µg/ml) se observó un incremento significativo de la viabilidad respecto a las células sin tratamiento expuestas al H₂O₂

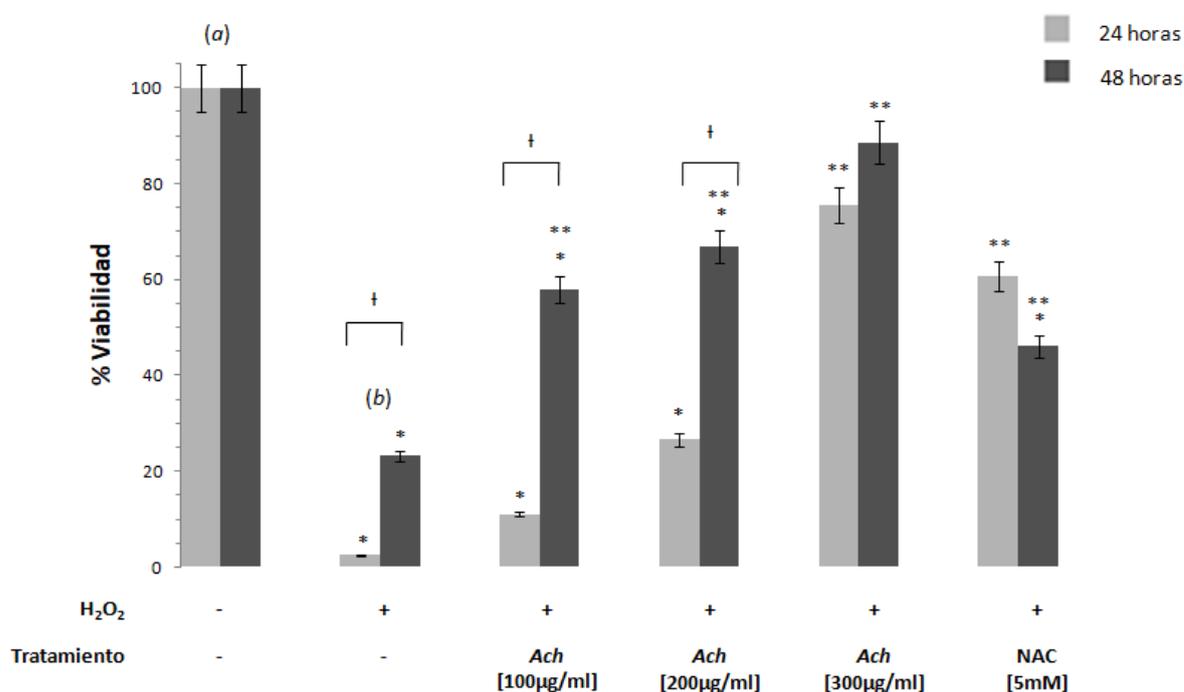


Figura 18: *Ach* previene muerte celular inducida por H₂O₂ en HT-29. Viabilidad celular en HT-29 expuestas a distintos tiempos y concentraciones de *Ach*. Se consideraron las siguientes significancias estadísticas: * Significancia estadística (<0.01) respecto a (a); ** Significancia estadística (<0.01) respecto a(b); † Significancia estadística (<0.01) entre 24 y 48 horas.

Con el fin de evaluar el perfil citotóxico de *Ach*, se evaluó la viabilidad de la línea celular RAW264.7 cuando fueron incubadas durante 12 horas con distintas concentraciones de extracto polifenólico (75, 100, 200 y 300 µg/ml) y LPS (1µg/ml) como activador y agente inflamatorio de macrófagos. La viabilidad de las células incubadas con LPS fue del 89.37% (SEM 10.60%), mientras que con *Ach* varía del 98.2% (SEM 8.73%) al 106.82% (SEM 11.59%) y con 5-ASA entre 79.89% (SEM 10.83%) y 90.75% (SEM 10.24%). La sinergia entre 1mM de 5-ASA y 100 µg/ml de *Ach* tampoco presentó una reducción de la viabilidad celular (90.7%, SEM 10.24%).

El ensayo de viabilidad por Alamar Blue® reveló que el extracto metanólico de maqui no ejerció ningún efecto significativo sobre citotoxicidad en las células de macrófagos RAW264.7 (Figura 19).

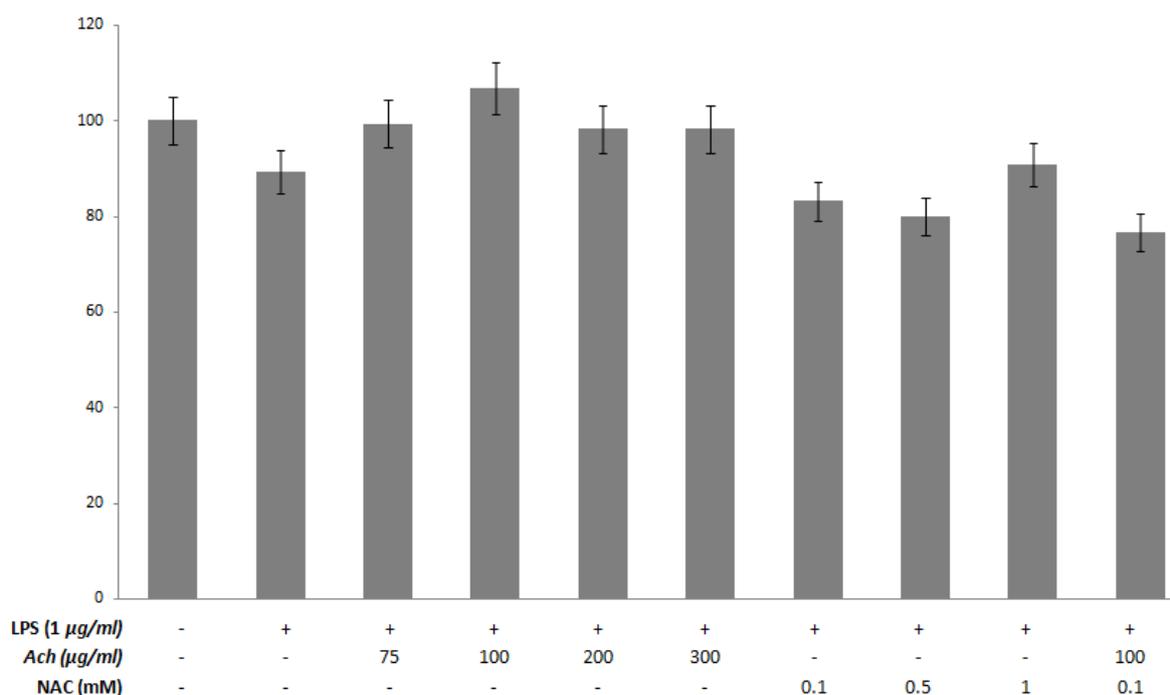


Figura 19: *Ach* no presenta citotoxicidad en RAW264.7. Viabilidad de macrófagos RAW264.7 tratados con LPS, con distintas concentraciones de *Ach* y 5-ASA. La viabilidad de las células sin LPS y sin tratar fue del 100%. Se consideró significancia estadística un *p-value* <0.05

4. Efecto de *Ach* sobre el estrés oxidativo en cultivo celular

Debido a que DCFH-DA presenta una elevada permeabilidad celular y es oxidado por ONOO^- a DCF, hemos evaluado el porcentaje de oxidación de este compuesto en las líneas celulares HT-29 y RAW264.7. En HT-29 un incremento significativo de la oxidación intracelular fue observado con la adición de H_2O_2 (p-value <0.05) (**Figura 20**). El porcentaje de oxidación muestra una inhibición dosis dependiente del extracto polifenólico (reducción de 63.96%, SEM 2.24%; 57.62%, SEM 9.85%; y 43.75% SEM 13.19%) a concentraciones de *Ach* de 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente, llegando a una reducción significativa a una concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (p-value <0.05). En paralelo, cuando las células expuestas a H_2O_2 se tratan con NAC, es posible observar una disminución en la oxidación, aunque no significativa del 74.61% (SEM 14.87%) respecto a las células incubadas sólo con H_2O_2 .

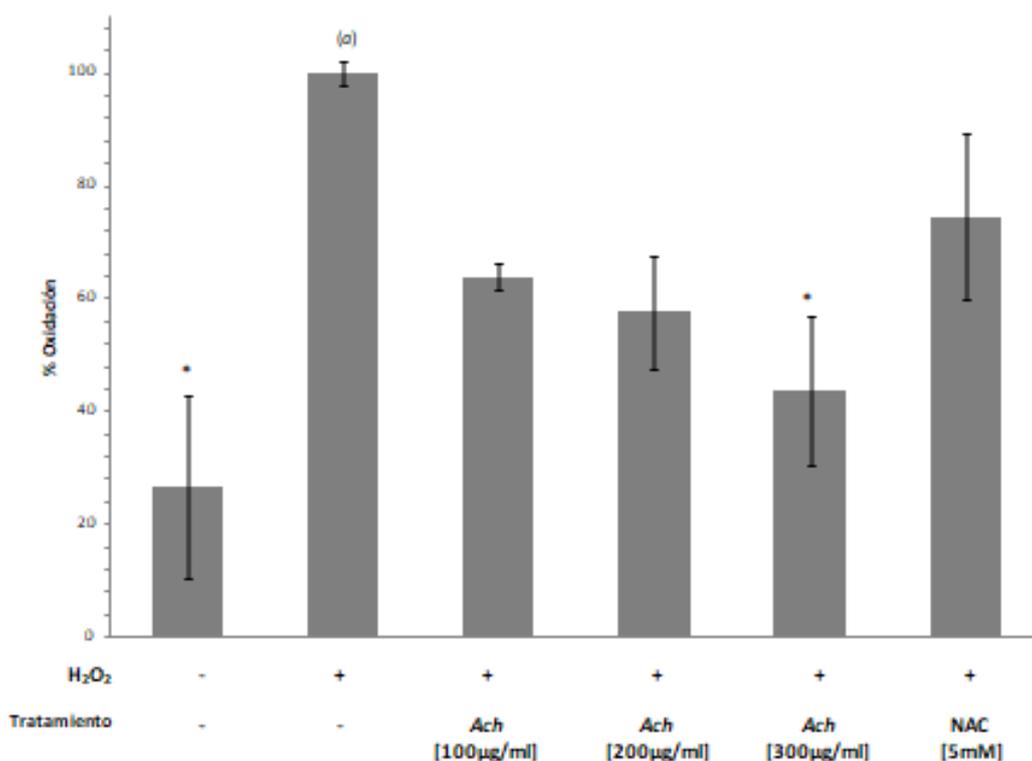


Figura 20: *Ach* protege contra el estrés oxidativo en línea celular HT-29. Porcentaje (%) de oxidación como indicador de estrés oxidativo en línea celular HT-29 expuestas a H_2O_2 como compuesto oxidante (oxidación del 100%) y a tratamientos antioxidante NAC y distintas concentraciones de *Ach*. Se consideró significancia estadística un p-value <0.05 respecto a (a).

Por otra parte, la **Figura 21** muestra que los macrófagos control presentaron una oxidación significativamente menor ($p\text{-value} < 0.01$) respecto a los macrófagos activados con LPS, demostrando la relación entre inflamación y EO. Cuando la línea celular es tratada con distintas concentraciones de extracto de *Ach* es posible observar un efecto protector contra el EO mediado por ONOO^- (DCF), mientras que los macrófagos tratados con 5-ASA a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM no presentan efectos significativos sobre la oxidación, aunque con una tendencia a la baja. Como hallazgo relevante se observó que a 0.1 mM de 5-ASA, con la adición de la menor dosis de *Ach* (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el % de oxidación fue el más bajo de todos los tratamientos (20.83%, SEM 6.72%), acercándose a los valores de oxidación que presentaron las células sin estimular con LPS (13.69%, SEM 6.34%).

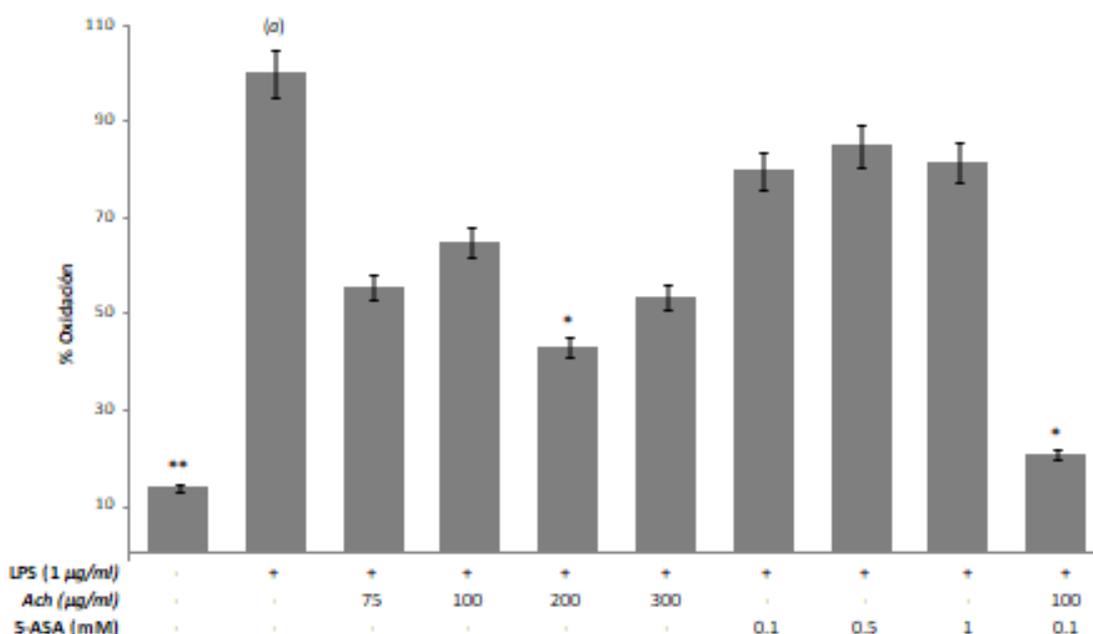


Figura 21: Actividad protectora de *Ach* en RAW264.7 inducidos con LPS. Porcentaje (%) de oxidación como indicador de estrés oxidativo en macrófagos RAW264.7 tratados con LPS, con distintas concentraciones de *Ach* y 5-ASA. Macrófagos expuestos a LPS fue considerado el % de oxidación del 100%. Se consideró: * Significancia estadística con $p\text{-value} < 0.05$ y ** significancia estadística con $p\text{-value} < 0.01$ respecto a

5. Evidencia de la inducción de Enfermedad de Crohn aguda por TNBS

Los ratones tratados con TNBS presentaron una inflamación intensa de la pared del tejido colónico. El intestino grueso presenta una morfología atípica con distorsión y pérdida de la arquitectura glandular evidente. Hay una marcada afectación de la mucosa y submucosa relacionada con infiltración de células inflamatorias, especialmente neutrófilos y linfocitos, asociados con inflamación aguda y engrosamiento por edema de la lámina propia. Se detectaron algunas áreas con ulceración y necrosis. Adicionalmente, el daño se extendía hacia la capa muscular y serosa, tratándose de una inflamación transmural (**Figura 22a, 22b, 22c, 22d**). No se observó engrosamiento de la capa muscular ni granulomas, ya que estos parámetros están asociados a una fase crónica de la enfermedad, comprobando que el modelo experimental en este estudio es de tipo agudo.

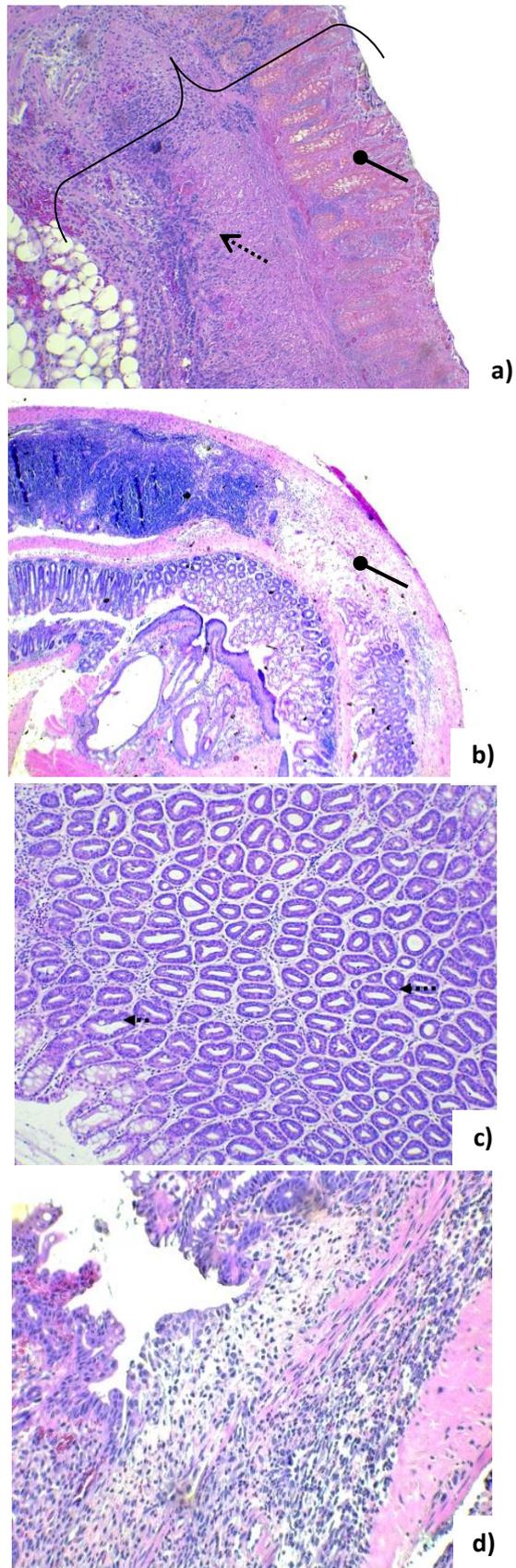


Figura 22: TNBS induce Enfermedad de Crohn aguda. a) Inflamación transmural (H&E, 20 x) (Amplitud que abarca la llave); **◄.....** Infiltración mixta por neutrófilos y linfocitos; **●—** Necrosis. **b)** **●—** Destrucción glandular extensa (H&E, 10 x); **c)** **◄.....** Pérdida de la secreción mucosa (H&E, 20 x); **d)** **◄.....** Úlcera, congestión vascular en lámina propia (edema) (H&E, 20 x).

6. Efecto sobre actividad clínica y peso corporal de *Ach* en enfermedad de Crohn inducida por TNBS

En nuestro estudio, durante la fase activa de la enfermedad fue posible evidenciar alteración del estado de salud de los animales. Todos los ratones enfermos presentaron hipomotilidad, postración y piloerección al día siguiente de la inducción con TNBS. Sin embargo, los grupos enfermos tratados con *Ach* (G3 y G4) recuperaron la actividad diaria, con evidente mejora física y de salud (**Figura 23**).

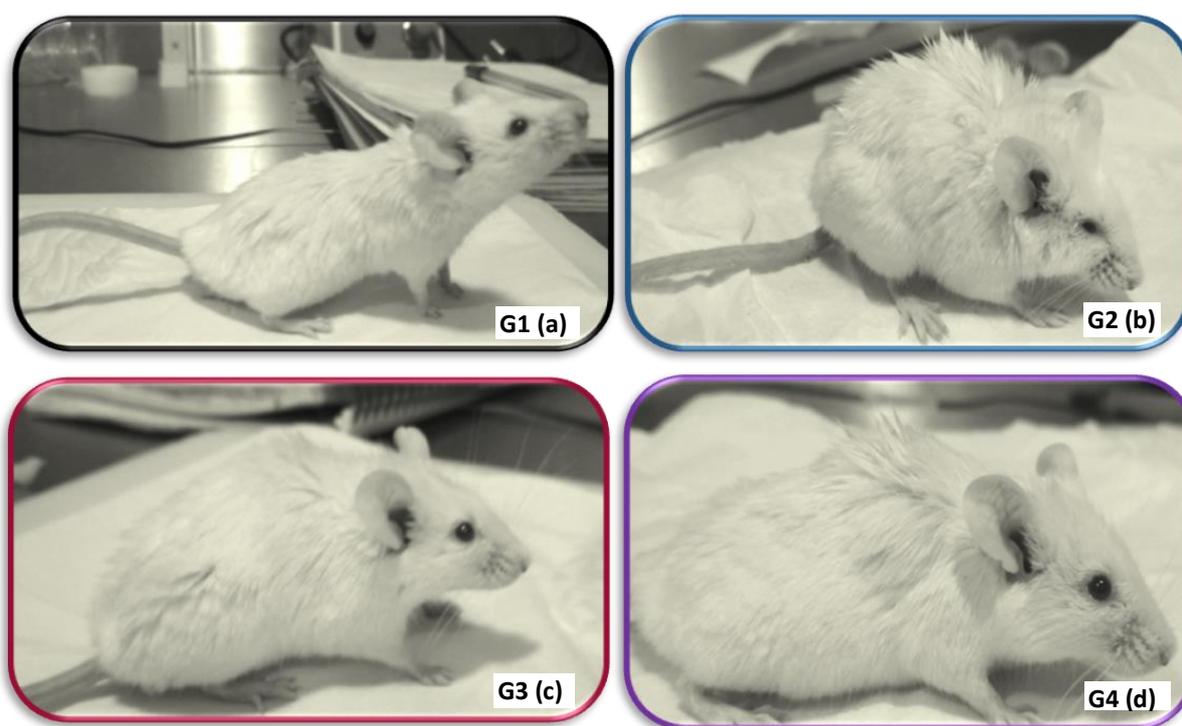


Figura 23: Tratamiento con *Ach* mejoró las características clínicas en los roedores tratados con TNBS. G1 (a): Ratón en movimiento y alerta. Pelaje y ojos normales. **G2 (b):** Ratón con ojos hundidos, pelaje descuidado y postura anormal. **G3 (c):** Pelaje normal, acicalado con marcha y postura normal. **G4 (d):** Actitud normal, ojos tamaño adecuado, acicalado y leve piloerección. Registro fotográfico del día anterior al sacrificio.

Todos los grupos experimentales tuvieron un seguimiento diario, controlando el peso corporal y evaluando las heces respecto a consistencia, presencia de mucosidad y sangrado. Estos indicadores fueron procesados mediante el indicador clínico “DAI”, uno de los parámetros más importantes, junto con el peso corporal, para determinar la severidad clínica de la enfermedad. Los ratones inoculados con TNBS (G2) sin tratamiento mostraron un incremento significativo (<0.001) de DAI respecto al grupo control con EtOH50% (G1). Consistente con los hallazgos evidenciados en el estado de salud, los animales tratados tanto posinducción de la enfermedad como de forma preventiva (G3 y G4, respectivamente) presentan un DAI similar al grupo control, con una disminución altamente significativa respecto a los ratones enfermos con EC (<0.001) (Figura 24).

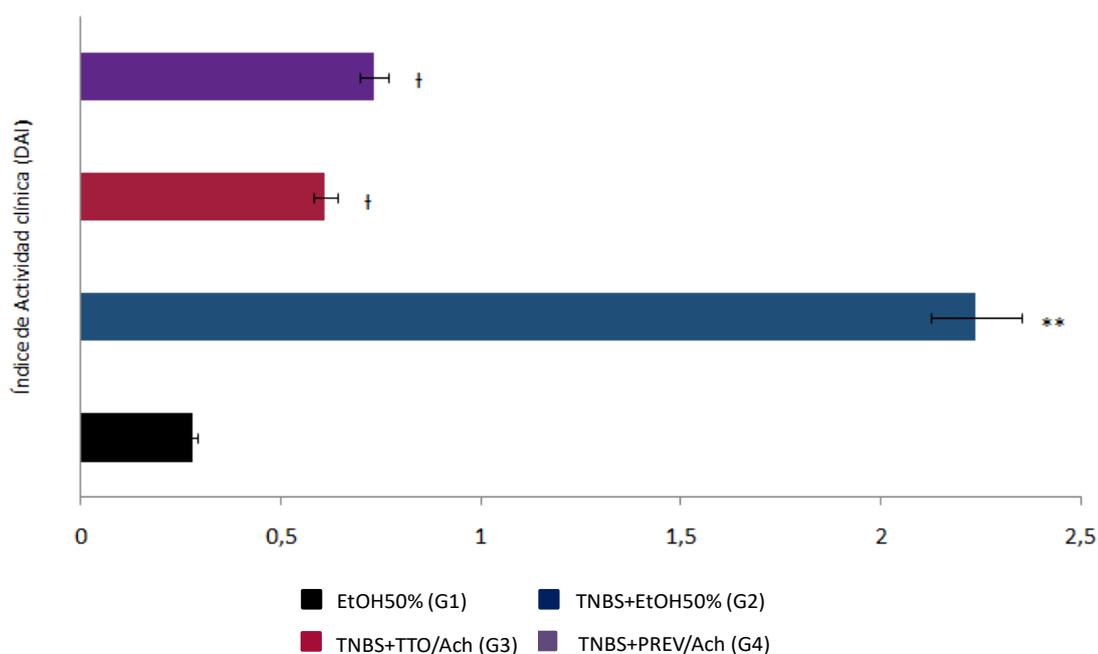


Figura 24: Tratamiento con *Ach* mejora las características clínicas en modelo experimental de EC. Valoración de %pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado rectal en una escala de valoración entre 0 y 3 para la obtención del DAI en los grupos experimentales. Se consideraron las siguientes significancias estadísticas: ** Significancia estadística (<0.001) respecto al control G1; † Significancia estadística (<0.001) respecto a G2.

En particular, la inducción de la inflamación aguda tipo Crohn causada por la administración de TNBS fue asociada con una pérdida significativa del peso corporal, mientras que el tratamiento con *Ach* atenúa la pérdida de peso. Los ratones enfermos del grupo G2 (TNBS+EtOH50%) presentaron una disminución de peso desde el día de la inducción hasta el sacrificio. El grupo G3 (TNBS+TTO/*Ach*) presentó una pérdida leve al día siguiente de la inducción que se estabilizó hasta el día del sacrificio. Por su parte, el grupo G4 (TNBS+PREV/*Ach*) logró recuperar el peso igualándolo a los días previos a la inducción (Figura 25).

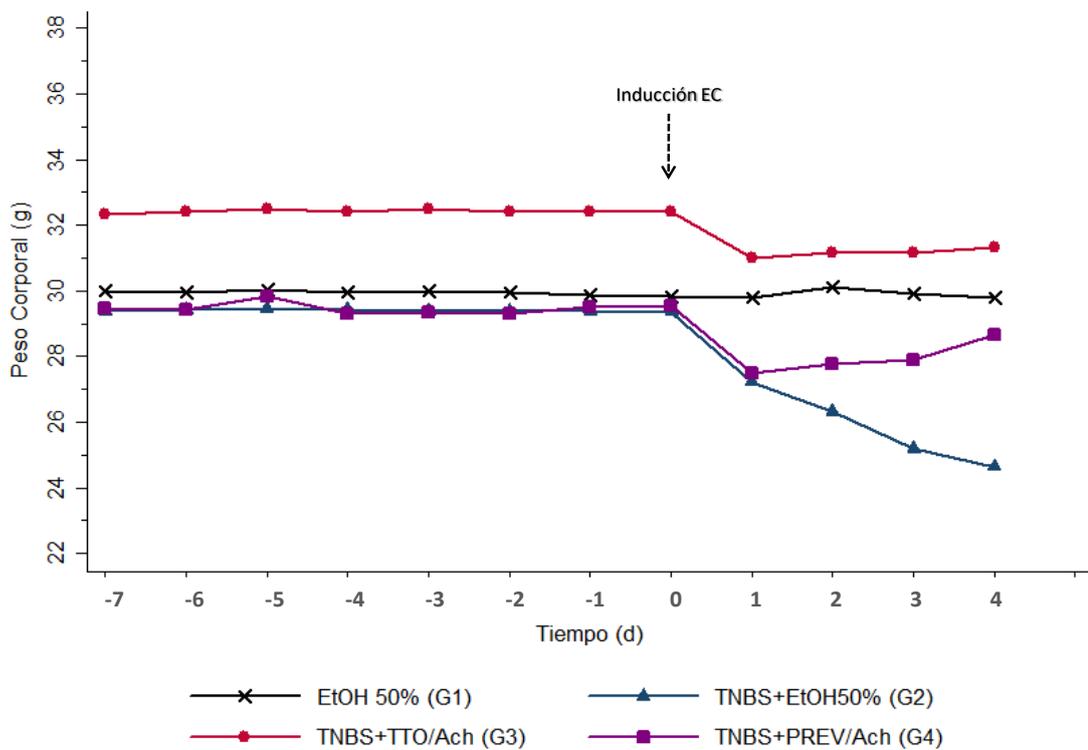


Figura 25: *Ach* impide la pérdida de peso en EC inducida por TNBS. Registro del peso corporal en los grupos experimentales desde 1 semana previo a la inducción (día -7) hasta el último día previo al sacrificio (día 4).

7. Efecto preventivo y curativo de *Ach* sobre parámetros morfológicos y macroscópicos del tejido colónico en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

Los ratones fueron tratados con 50 mg/Kg de *Ach* por vía orogástrica 4 días después de la inducción de la EC por TNBS (grupo G3) y 7 días previos a la inducción y de forma continua hasta el final del experimento (grupo G4). Cuatro días después de la inducción los ratones fueron sacrificados y extirpado el intestino grueso para su evaluación macroscópica. El colon de ratones enfermos sin tratamiento (G2) reveló un acortamiento en comparación con los ratones del grupo control (G1). El colon de los ratones tratados con *Ach* (G3 y G4) mostró una marcada supresión de la inflamación del tejido, evidenciado por la longitud del colon (**Tabla 19 y Figura 26**).

Grupos	Promedio (cm)	SEM
G1 (EtOH50%)	12.38	0.53
G2 (TNBS+EtOH50%)	9.54	0.36
G3 (TNBS+TTO/ <i>Ach</i>)	11.30	0.40
G4 (TNBS+PREV/ <i>Ach</i>)	11.66	0.21

Tabla 19: Promedio (\pm SEM) de la longitud del colon de los grupos experimentales

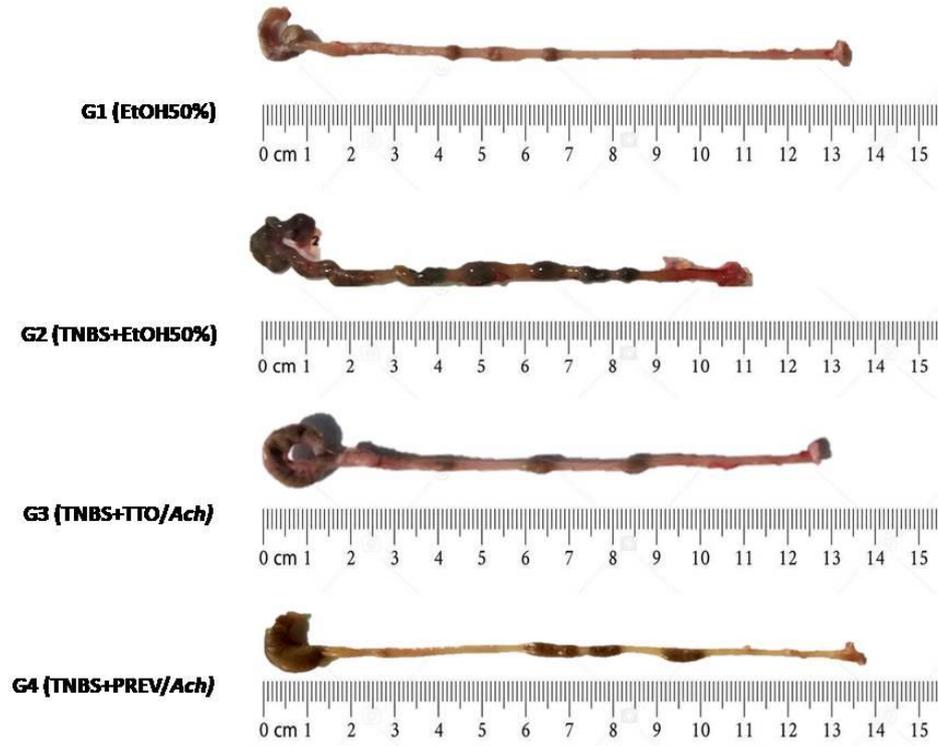


Figura 26: Ach impide el acortamiento del intestino grueso. Fotografías representativas del colon de los diferentes grupos; Se considera el acortamiento del colon como un marcador de inflamación tisular.

Las diferencias entre el grupo enfermo y el grupo control son estadísticamente significativas (p -value <0.001). Diferencias significativas también fueron encontradas cuando se comparó el grupo G2 con TNBS+EtOH50% con los grupos tratados con *Ach* (Figura 27).

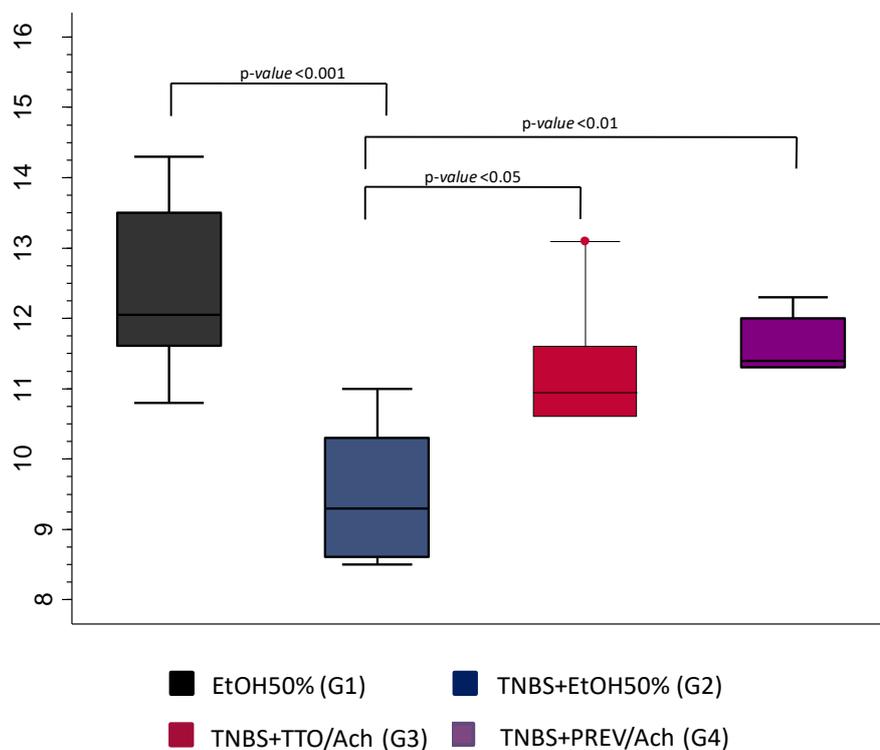


Figura 27: *Ach* mejora significativamente la longitud del intestino grueso. Comparación de las medias y los valores máximos y mínimos del largo del intestino grueso por grupos experimentales. Se indica la significancia estadística entre los diferentes grupos.

Adicionalmente, se valoró el peso del intestino grueso, dado que es otro marcador de inflamación tisular. El promedio del peso del colon fue significativamente mayor en el grupo G2 (p -value <0.01). Los ratones tratados de forma preventiva y curativa con *Ach* mostraron una marcada reducción del peso colónico (p -value <0.001), llegando a valores iguales o incluso inferiores al de los ratones del grupo control G1 (Figura 28).

Cuando se realizó la evaluación macroscópica, esta reveló la presencia de mucosidad y heces blandas y líquidas en el interior del intestino grueso de aquellos ratones que les fueron administrados TNBS+EtOH50% por vía i.c. Estos rasgos son propios de un proceso inflamatorio durante la fase aguda de la EC. Además, durante la extracción del tejido colónico en el sacrificio, fue posible evidenciar la adhesión del colon a tejidos adyacentes. La presencia de hiperemia, congestión y ulceraciones en ratones tratados con TNBS fue observada al momento de abrir el intestino grueso longitudinalmente. Estas características morfológicas fueron casi totalmente restauradas en los grupos tratados con *Ach* (G3 y G4) (Figura 29).

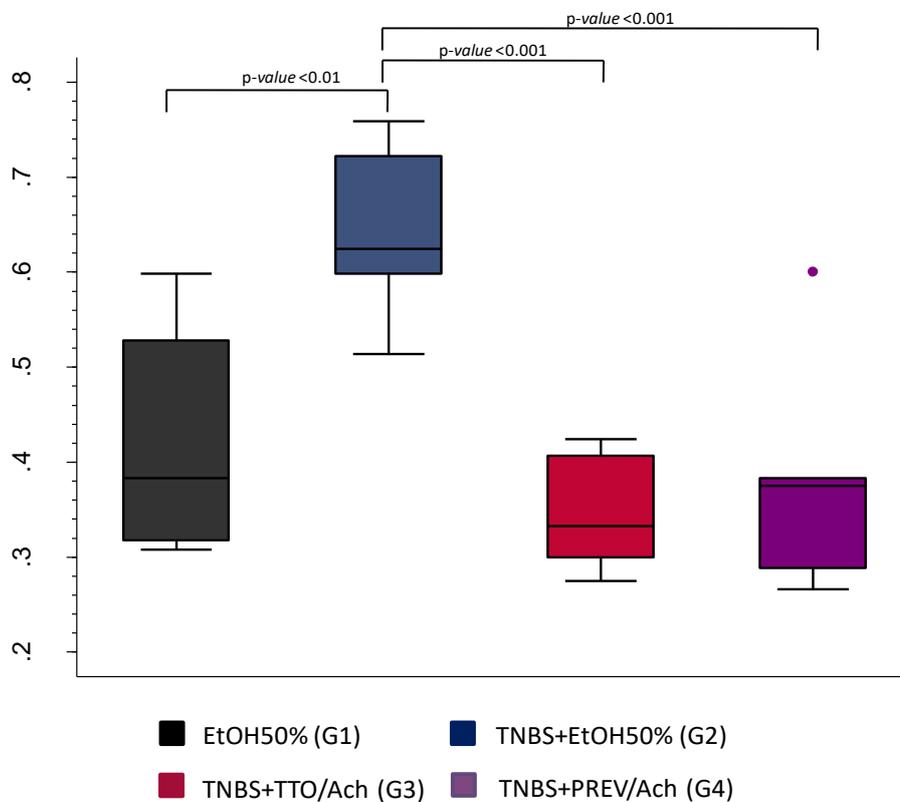


Figura 28: *Ach* restablece el peso del tejido colónico. Comparación de las medias y los valores máximos y mínimos del peso del intestino grueso por grupos experimentales. Se indica significancia estadística entre los diferentes grupos.

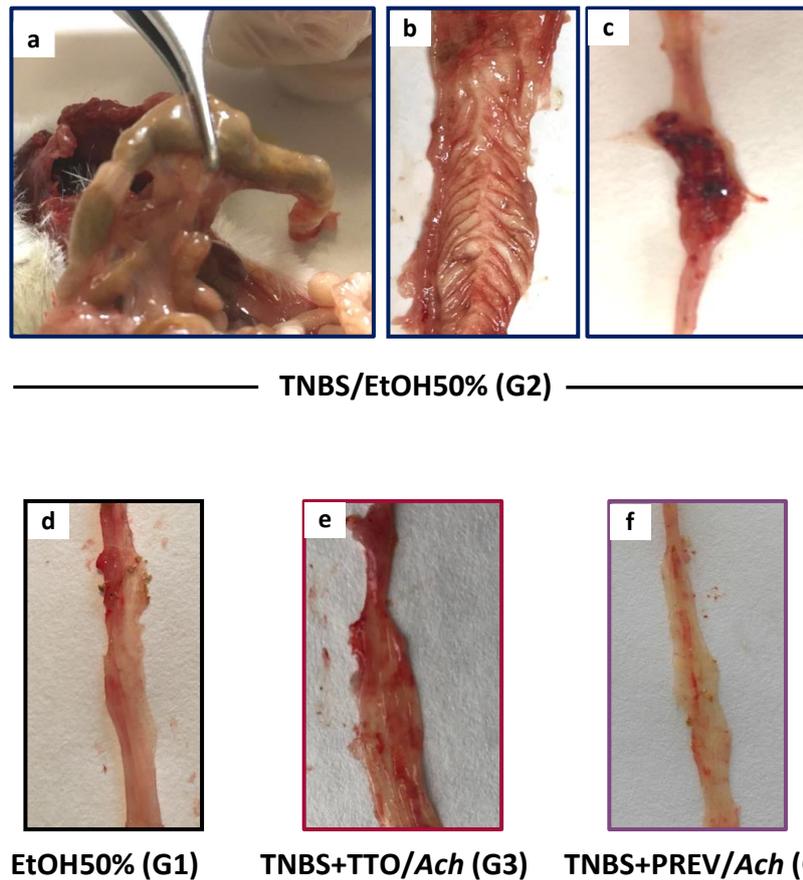


Figura 29: Ach mejora características morfológicas del colon. Fotografías representativas de valoración macroscópica de los grupos experimentales. Las imágenes (a), (b) y (c) del grupo G2 muestran adhesión de colon a otros tejidos, hiperemia/congestión y presencia de úlcera, respectivamente. Imagen (d) muestra un tejido normal, con un leve sitio de hiperemia, probablemente por la administración de EtOH50% al grupo G1. Imágenes (e) y (f) muestra una reducción significativa de focos inflamatorios e hiperemia de los grupos G3 y G4 respecto a ratones enfermos.

Cuando se aplicó el score macroscópico, el daño colónico observado fue evidente en el grupo enfermo G2 ($p\text{-value} < 0.001$) respecto a la administración i.c. de EtOH50% en el grupo control G1, el cual arrojó una puntuación mínima del score macroscópico. Interesantemente, los grupos tratado con *Ach* (G3 y G4) presentaron una fuerte significancia estadística en la reducción del score respecto al grupo enfermo. Los valores de los grupos G3 y G4 fueron similares al grupo control G1 (**Figura 30**).

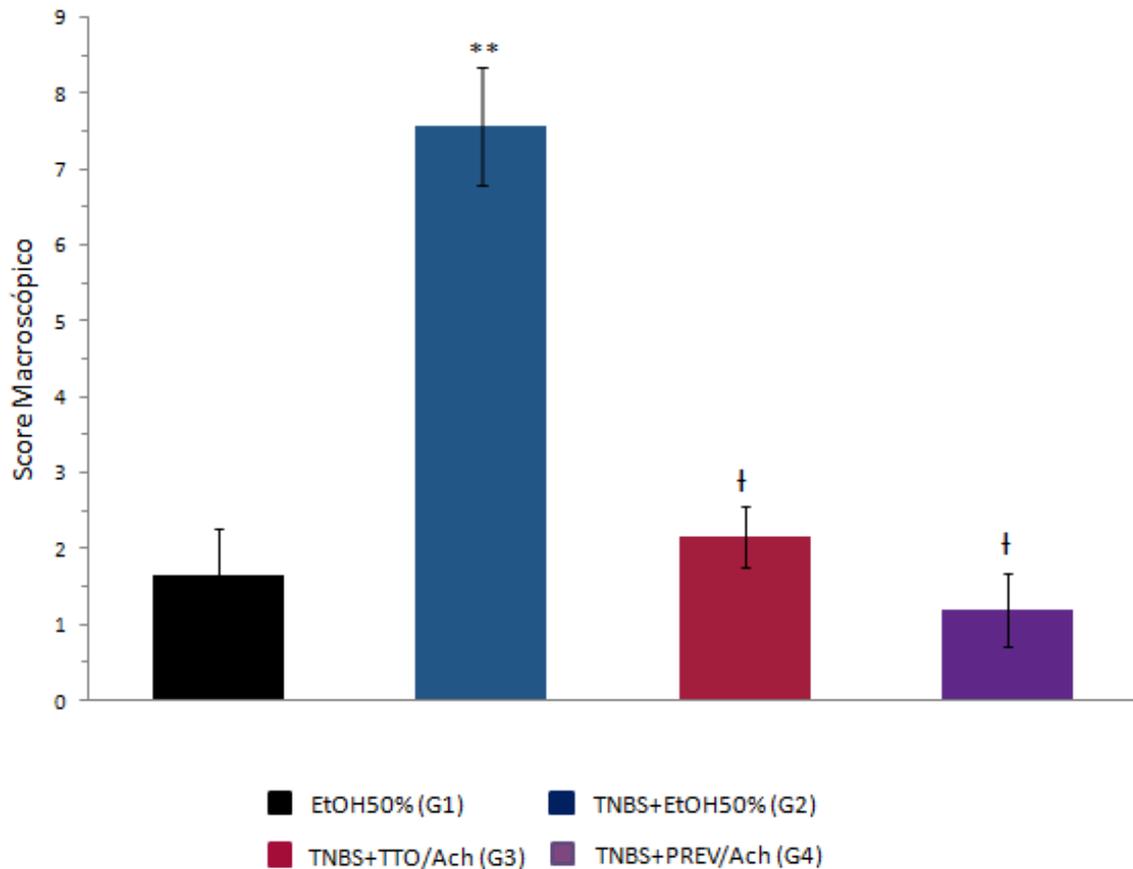


Figura 30: *Ach* restaura la morfología colónica. Score macroscópico de acuerdo con morfología colónica. **Significancia estadística (<0.001) respecto al grupo G1; † Significancia estadística (<0.001) respecto al grupo G2.

8. Efecto preventivo y curativo de *Ach* sobre evaluación microscópica y estudio histopatológico del tejido colónico en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

La valoración microscópica mostró un incremento significativo del daño histológico en los ratones tratados con TNB+EtOH50%. El score de este grupo fue 3 veces mayor que el grupo que se intervino solo con EtOH50%. Cuando se comparó con los grupos que recibieron tratamiento, fue posible observar que el grupo G2 presentó el doble de puntuación que el grupo tratado con *Ach* tanto de forma preventiva como curativa (Figura 31).

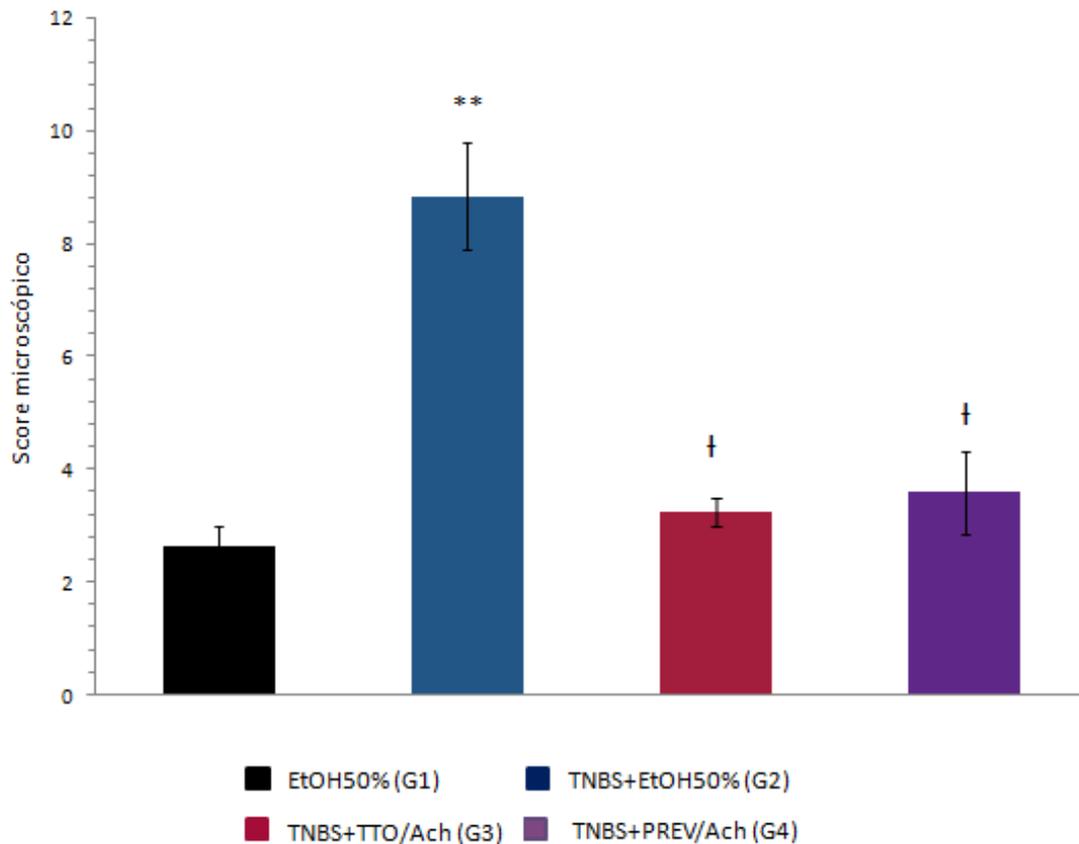


Figura 31: *Ach* atenúa el daño histológico. Score microscópico de acuerdo con daño histológico (0-12). **Significancia estadística (<0.001) respecto a grupo G1; † Significancia estadística (<0.001) respecto a grupo G2.

Por otra parte, la evaluación histológica mostró una inflamación transmural distribuida en focos caracterizada por infiltración de células inflamatorias, ulceración en la mucosa y submucosa y pérdida de células caliciformes en todo el colon de ratones enfermos (G2), mientras que en las muestras de colon de ratones control (G1) se observaron características típicas de una estructura normal. La administración de *Ach* por vía orogástrica a los ratones enfermos mostró una recuperación significativa de las alteraciones patológicas, restaurando la histológica normal del tejido colónico (**Figura 32 [a,b,c], 33 [a,b,c], 34 [a,b,c], 35 [a,b,c]**).

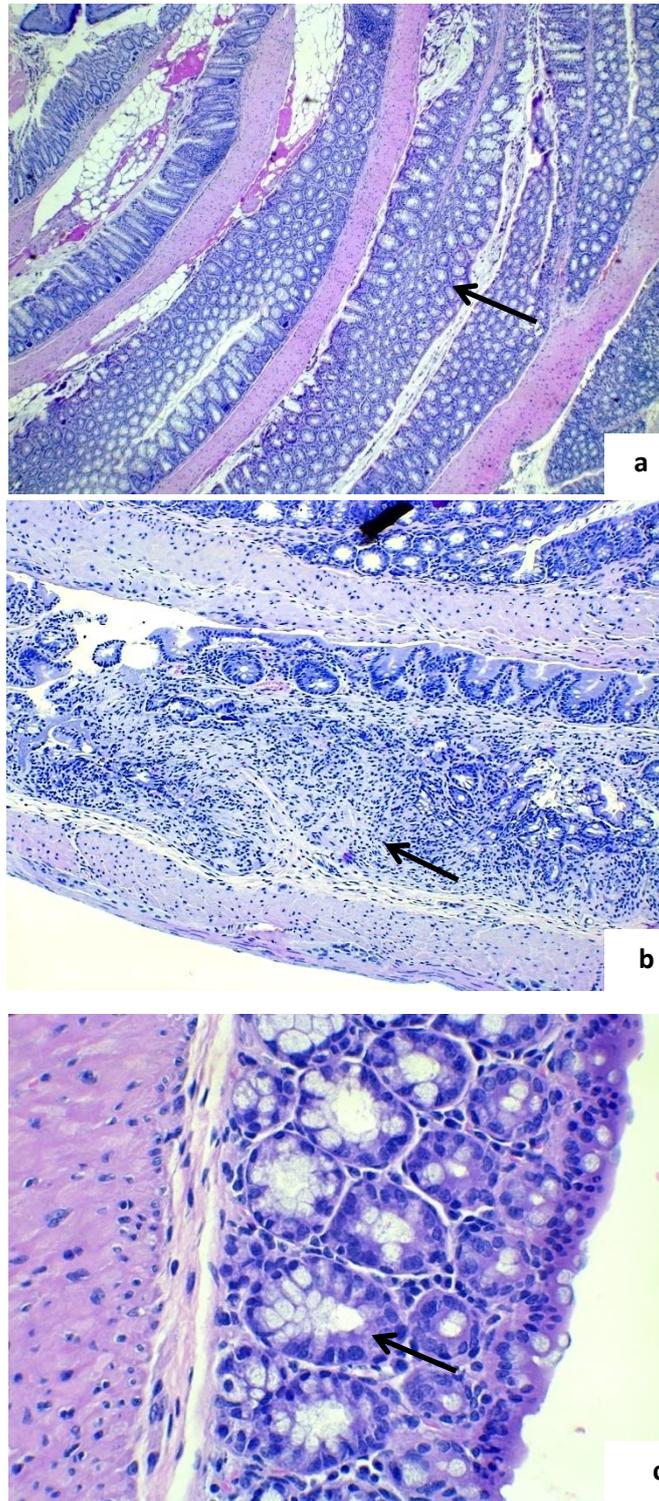


Figura 32: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo control (G1). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x. Micrografía panorámica (a) de todo el colon de un ratón tratado con EtOH50% (Grupos control, G1). La flecha (←) muestra un tejido colónico intacto en todas sus capas (mucosa, submucosa, muscular y serosa) con infiltrado inflamatorio muy leve. En micrografía (b) la capa más externa o proximal del intestino grueso se observa un único foco de destrucción glandular (←) asociado a una leve pérdida de células caliciformes (←) en figura (c).

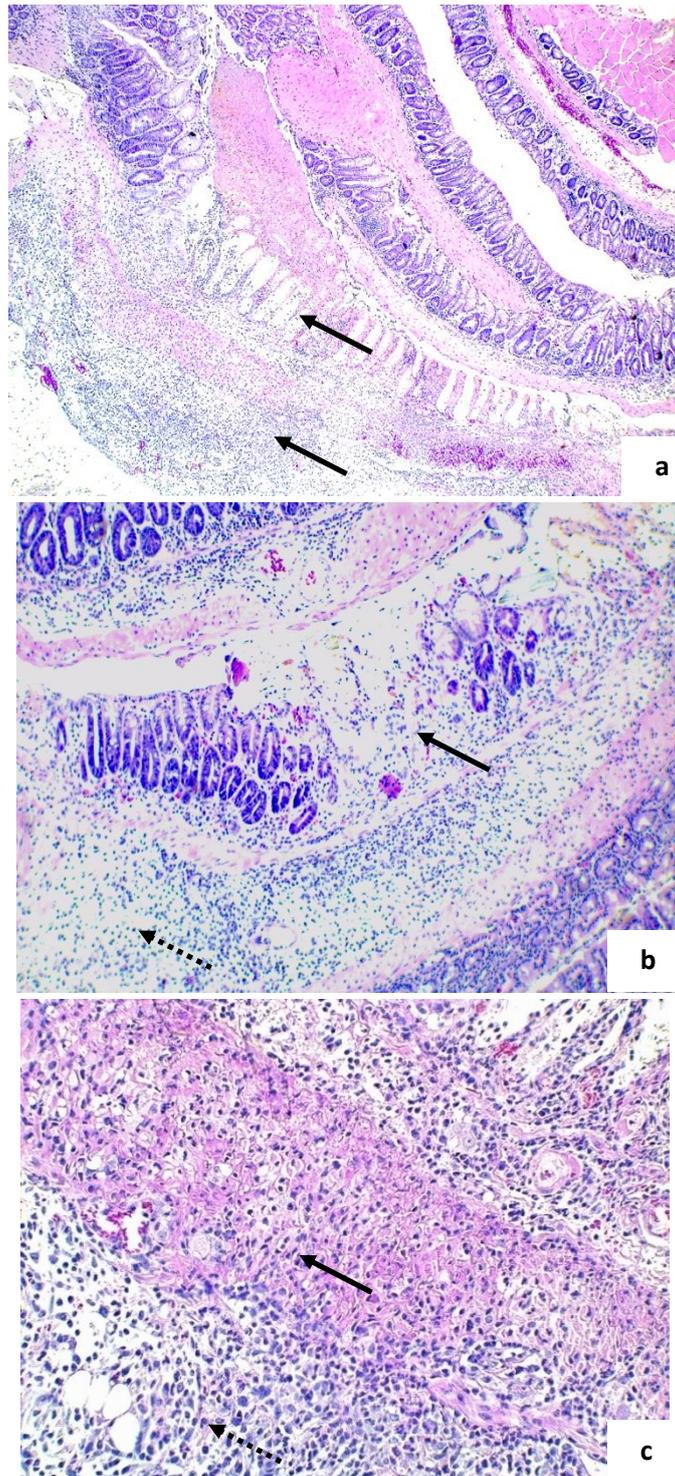


Figura 33: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo (G2). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 20 x; (c) H&E 40 x. Se observa en micrografía panorámica (a) de todo el colon, una pérdida de la arquitectura glandular distribuida en focos que abarca desde el extremo distal hasta hacerse más severa en el extremo proximal (←) junto con la presencia de focos de necrosis (←). La micrografía (b) muestra destrucción severa de las criptas con infiltrado inflamatorio (←) y edema en mucosa y submucosa, evidenciado por espacios abiertos entre células (← -). En la micrografía (c) se observa infiltrado inflamatorio mixto (Neutrófilos ← - y Linfocitos ←) invadiendo la pared muscular.

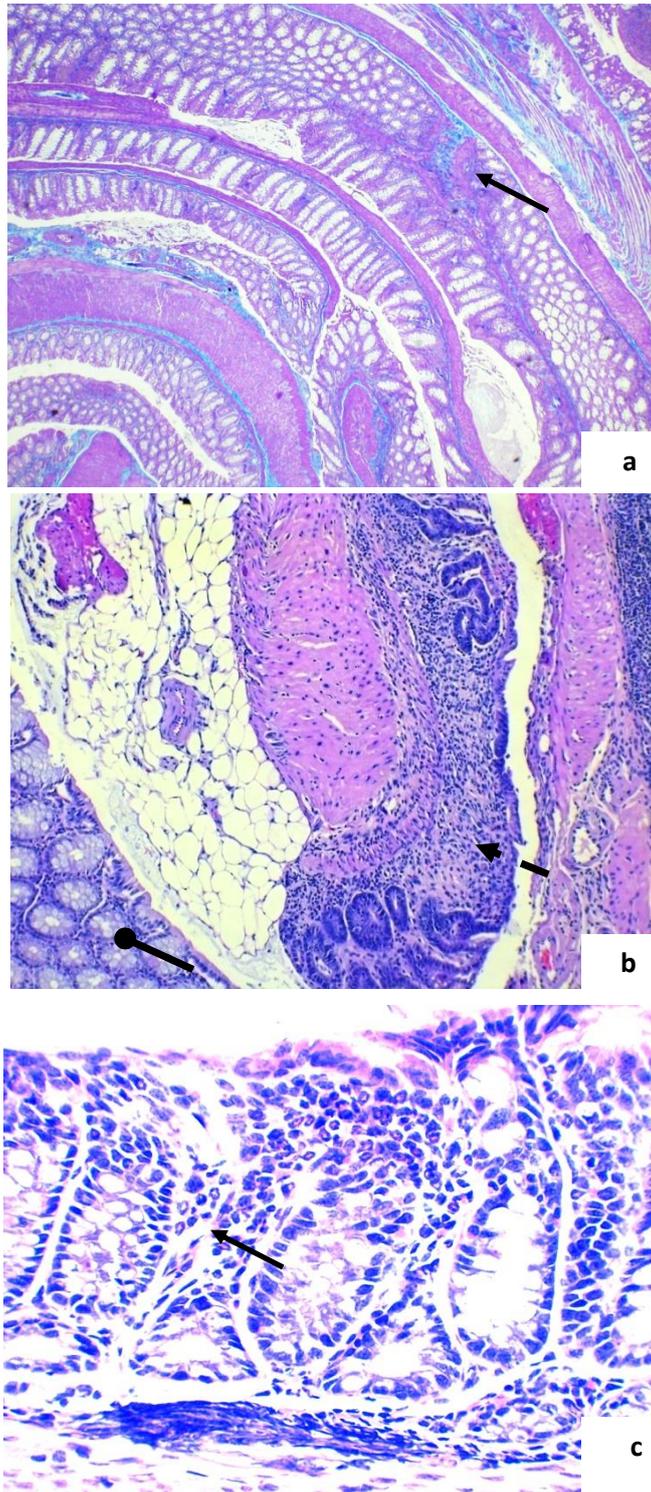


Figura 34: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado de forma curativa con Ach (G3). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x. La micrografía (a) ilustra una estructura conservada en toda la extensión del colon con leve inflamación en lámina propia y un foco inflamatorio cercano al ciego donde se observa pérdida glandular (←). La micrografía (b) muestra un área de inflamación aguda que se restringe a la mucosa, sin presenciar células inflamatorias en la capa muscular ni en la serosa, evidenciando la ausencia de inflamación transmural (← -). Hay una leve pérdida de la arquitectura glandular en el foco inflamatorio, con estructura glandular conservada alrededor del infiltrado y en el tejido proximal al foco (●). La flecha (←) en la micrografía (c) muestra un foco de inflamación aguda con infiltración de neutrófilos en la lámina propia, sin destrucción de las glándulas del intestino grueso.

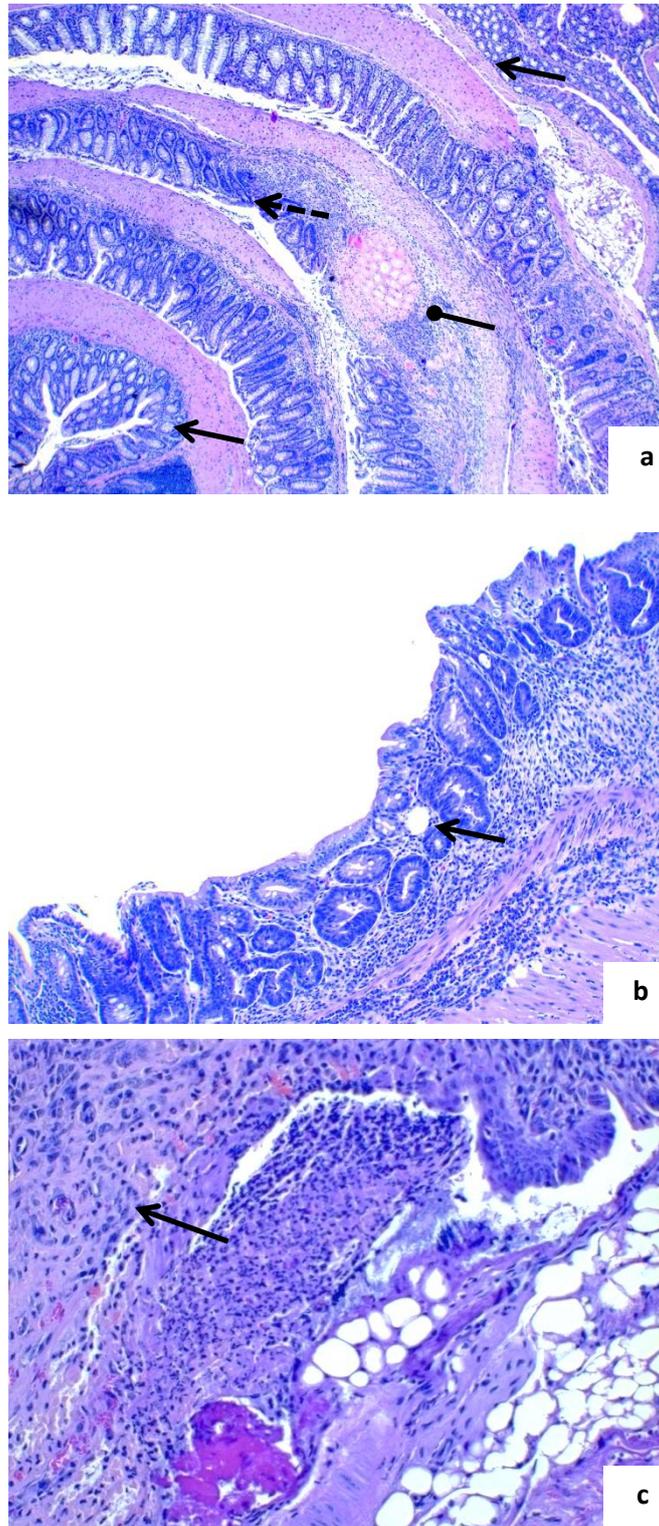
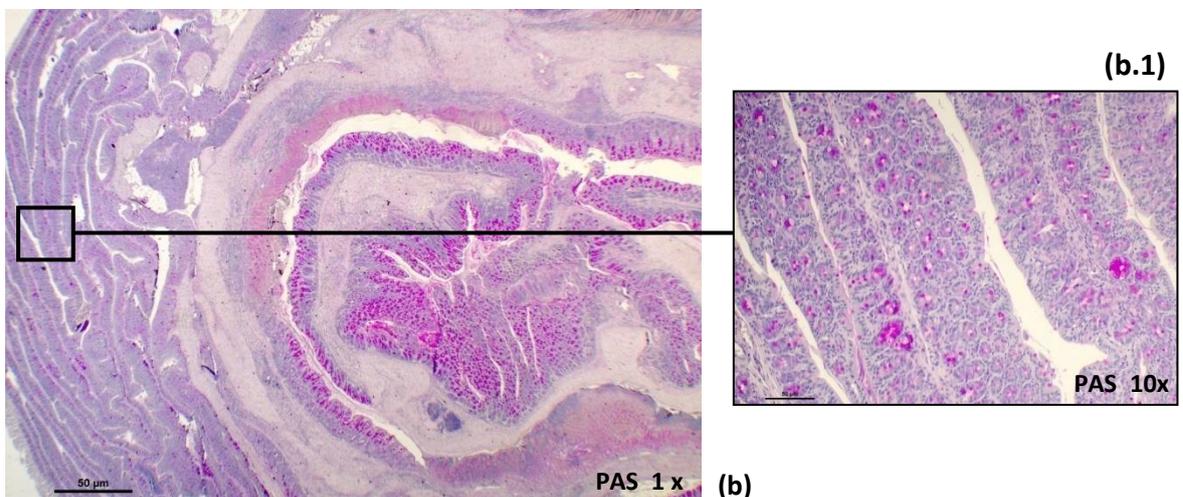
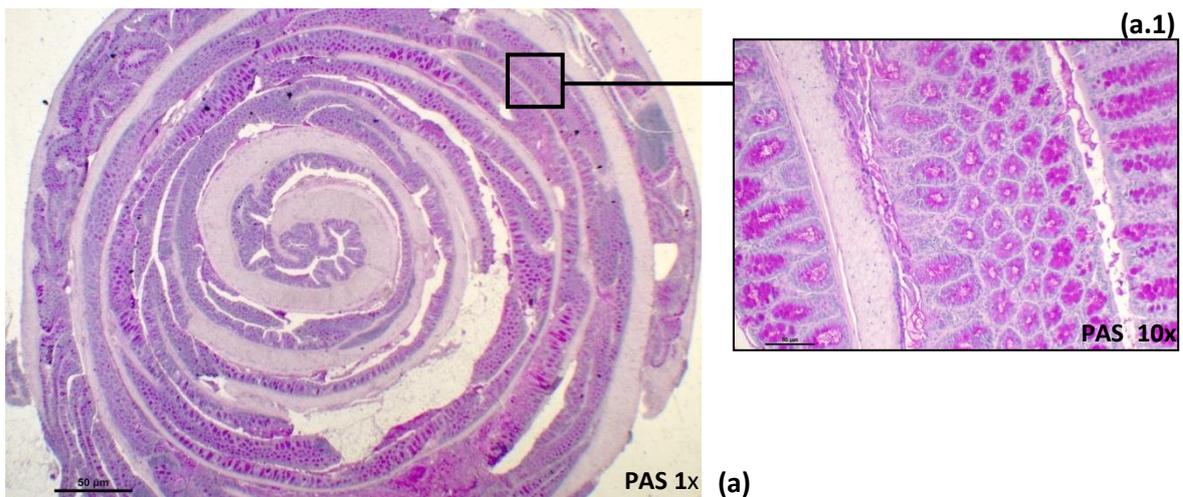


Figura 35: Estudio histopatológico de preparaciones histológicas del colon del grupo enfermo tratado de forma preventiva (G4). Tinción H&E. (a) H&E 4 x; (b) H&E 10 x; (c) H&E 40 x
 En la micrografía (a) la flecha (●—) muestra un único foco de necrosis, una estructura glandular bastante conservada a lo largo de todo el tejido colónico (←) y un insignificante infiltrado inflamatorio con predominancia de linfocitos, sin evidenciar un foco específico. La flecha ← — indica pérdida de la función muco-secretora sin destrucción glandular. En detalle, la micrografía (b) muestra un tejido reepitelizado y núcleos hiper cromáticos (←) asociados a cambios regenerativos. Una capa fibrinoleucocitaria (←) con tejido de renovación epitelial es mostrada en la micrografía (c).

9. Efecto preventivo y curativo de *Ach* sobre la integridad de la mucosa colónica en los animales con enfermedad de Crohn inducido por TNBS

Las características histológicas de la integridad de la mucosa colónica y su capacidad muco-secretora fueron examinadas con la tinción PAS, la cual permitió distinguir las células caliciformes secretoras de moco. En el grupo G1 fue posible apreciar una tinción PAS positiva (PAS+) por glicoproteínas y se distinguieron claramente las células caliciformes. El grupo enfermo (G2) presentó en su gran extensión, principalmente en la parte media y proximal, una tinción PAS negativa (PAS-), mostrando una disminución histológicamente significativa de la integridad y funcionalidad de la mucosa colónica. Los grupos tratados con extracto de *Ach* (curativo: G3 y preventivo: G4), mostraron una recuperación relevante de la integridad de la mucosa del intestino grueso. Los cambios fueron evidenciados por el adecuado perfil glandular y una mejora en la tinción con PAS, logrando una tinción PAS+ en prácticamente todo el tejido (**Figura 36 [a, b, c, d]**).



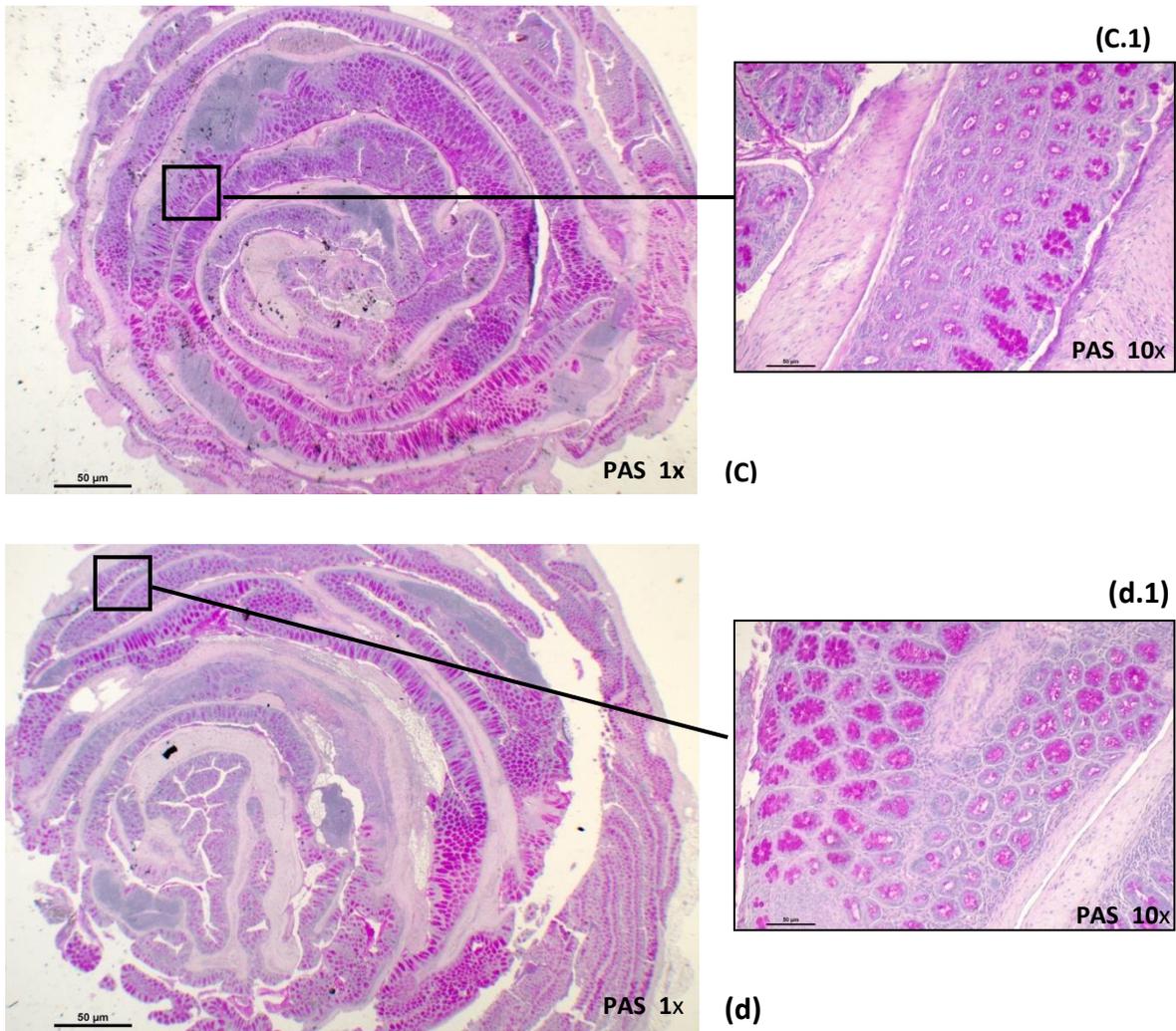
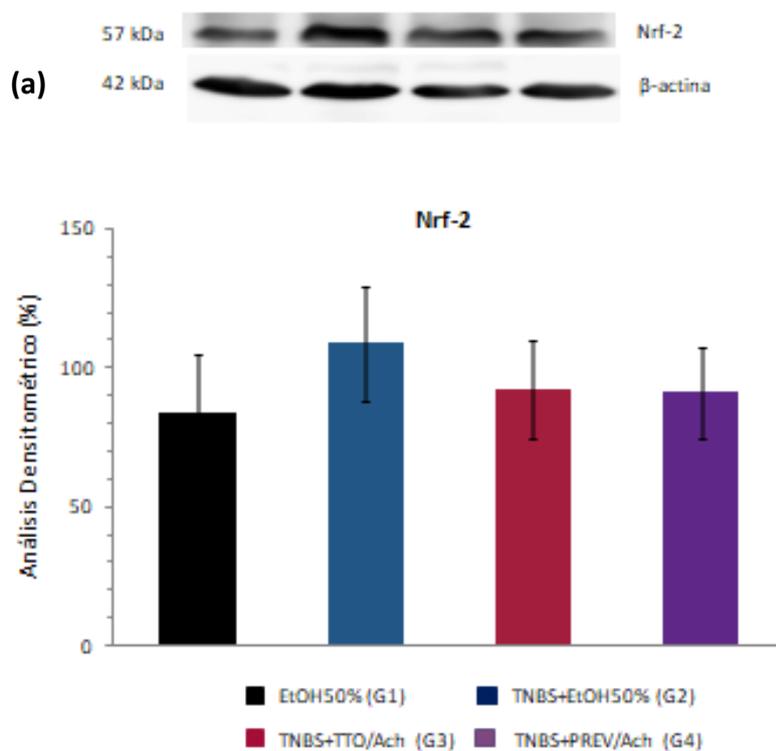


Figura 36: Estudio histopatológico de la integridad y funcionalidad de la mucosa colónica. Tinción PAS. Intestino grueso: (a), (b), (c) y (d) PAS 1 x; (a.1), (b.1), (c.1), (d.1) PAS 10 x. **Grupo EtOH50% (G1):** La micrografía (a) indica tinción PAS+ para glicoproteínas, incluidas la mucina, que manifiesta una mucosa colónica funcional. A más aumento (a.1) se muestra una fuerte tinción y criptas dispuestas en posición habitual. **Grupo TNBS+EtOH50% (G2):** El corte transversal de la micrografía (b) muestra una tinción PAS débilmente positiva en la zona más distal del intestino grueso y predominancia de PAS- en la zona media y proximal (b.1). **Grupo TNBS+TTO/Ach (G3):** Células secretoras PAS+ en casi toda la extensión del tejido (c). Algunas zonas (c.1) se observan tinción PAS débilmente positiva. **Grupo TNBS+PREV/Ach (G4):** Recuperación de la integridad y funcionalidad al visualizar las células secretoras de moco comparado con el grupo enfermo G2 (d). La micrografía (d.1) muestra tinción PAS+ en la mucosa proximal del tejido colónico.

10. Expresión de proteínas Nrf-2 y HO-1 relacionadas con el estrés oxidativo en enfermedad de Crohn y su regulación con *Ach*

Nrf-2 es un factor de transcripción responsable del equilibrio redox celular y regulador de la expresión de HO-1, una importante proteína con efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Se realizó un análisis de Western blot para identificar los niveles de expresión de Nrf-2 y HO-1 en tejido colónico del modelo de EC provocado por TNBS y en los grupos tratados con *Ach*. Nrf-2 mostró una sobrerregulación en el grupo enfermo respecto al grupo control G1, sin presentar diferencias significativas cuando se realizó el análisis densitométrico y estadístico. Los grupos tratados con *Ach*, tanto preventivo como curativo, mostraron una leve tendencia al alza respecto al grupo control (G1) y levemente inferior respecto al grupo enfermo (G2) (**Figura 37a**). En consonancia con estas observaciones, la expresión de la proteína HO-1 aumentó en el grupo G2, con significancia estadística cuando se comparó con el grupo G1. Siguiendo la misma tendencia que Nrf-2, HO-1 presentó un incremento cuando a los ratones se les administró *Ach*, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 37b**).



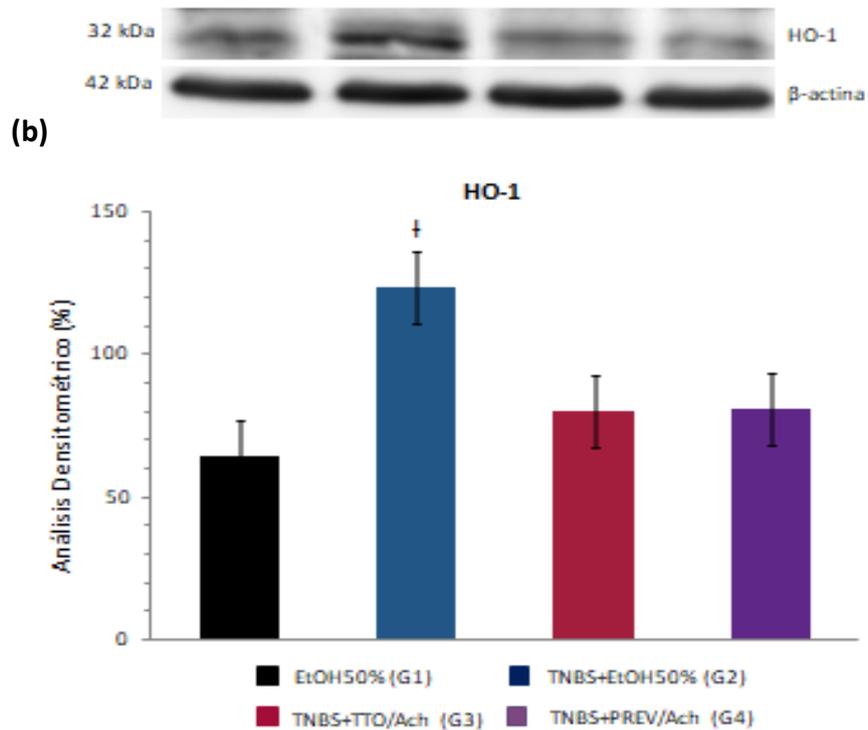
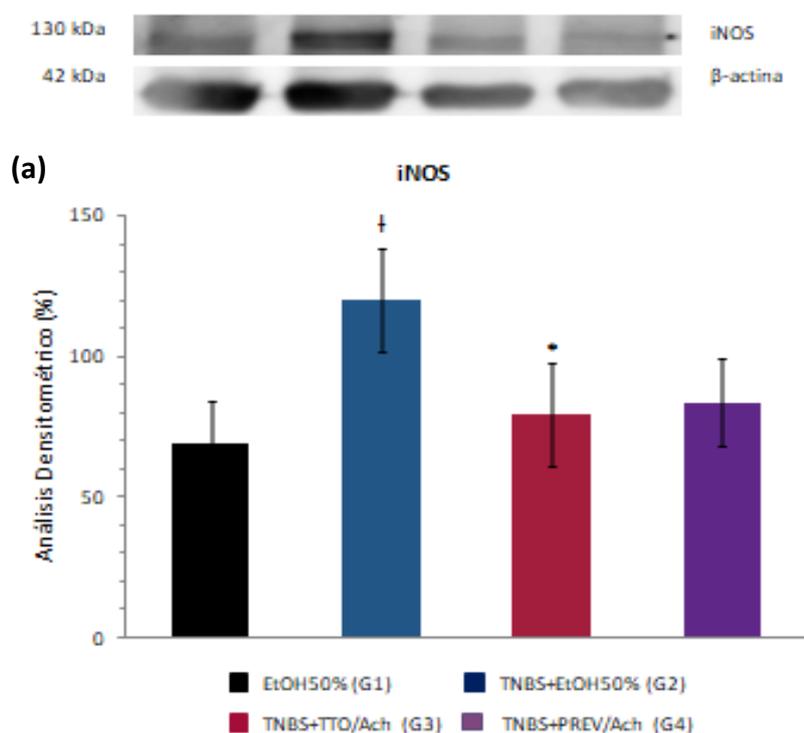


Figura 37: El modelo agudo de enfermedad de Crohn en roedores genera un aumento de mecanismos antioxidantes: Nrf-1 y HO-1. (Expresión de proteínas Nrf-2 (a) y HO-1 (b) por análisis de Western blot. Análisis densitométrico expresado en porcentaje (%) en grupo control G1 (negro), grupo enfermo G2 (azul) y grupos enfermos tratados con *Ach* (curativo G3: color rojo; y preventivo G4: morado). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. † Significancia estadística (<0.05) respecto a control G1 (negro).

11. Expresión de las proteínas iNOS y COX-2 involucradas en procesos inflamatorios en la enfermedad de Crohn y sus niveles postratamiento con *Ach*

Para investigar los procesos inflamatorios relacionados con el daño tisular observado en el análisis histopatológico del IG del modelo experimental de EC, se realizó un análisis de la expresión de proteínas iNOS y COX-2 en tejido colónico. Análisis de Western blot mostró que iNOS, proteína relacionada con el inicio y perpetuación de la inflamación intestinal, se encontró significativamente incrementada (p -value <0.05) en animales con EC por TNBS. Sin embargo, los niveles de esta proteína fueron significativamente atenuados cuando se trataron con *Ach* después de la inducción de la enfermedad (p -value <0.05) y una tendencia notable a la baja cuando se les administró extracto de *Ach* previo a la inducción (**Figura 38a**). En cuanto a COX-2, ampliamente reconocida por su participación en la actividad inflamatoria aguda en células inflamatorias y epiteliales, mostró un aumento de su expresión en el grupo G2, mientras que en el grupo G3 presentó una disminución significativa (p -value <0.05) respecto al grupo enfermo (G1). Adicionalmente, el grupo de ratones tratados de forma preventiva con *Ach* presenta una reducción importante, llegando a niveles similares al grupo control G1 (**Figura 38b**)





(b)

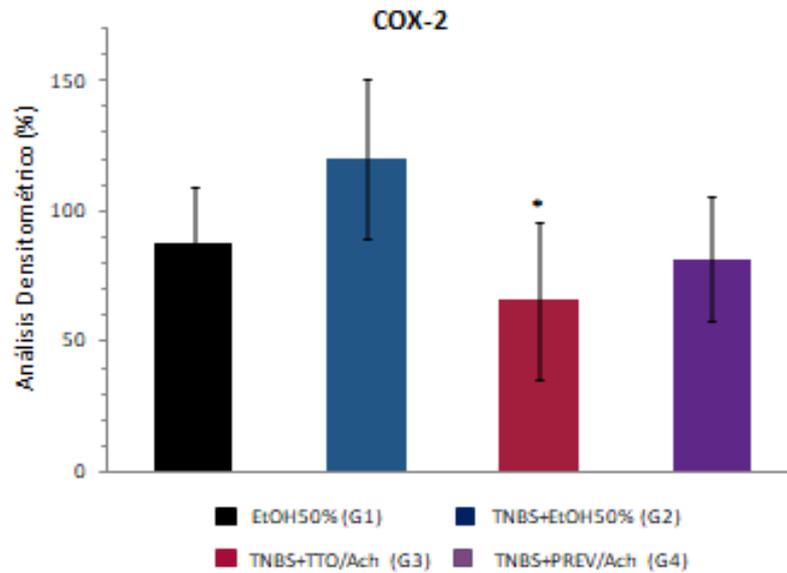
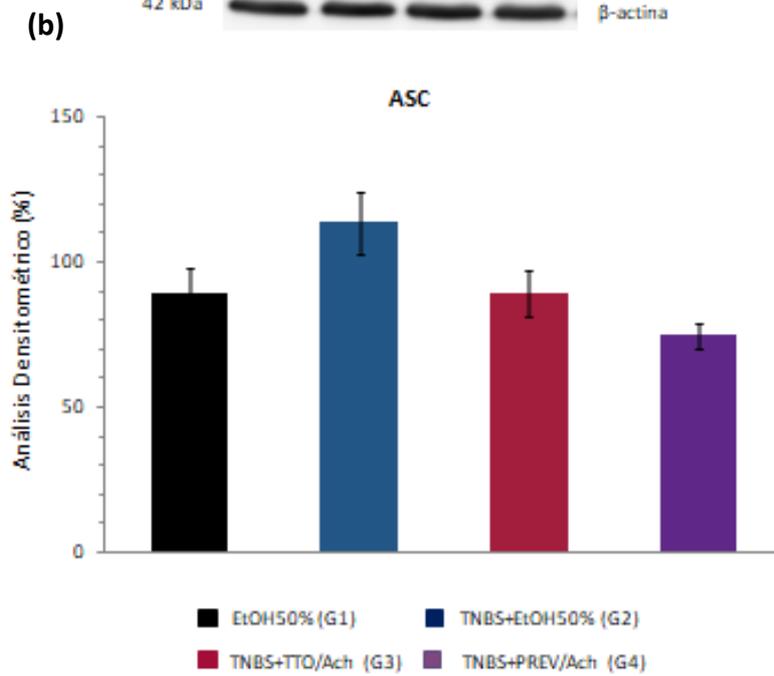
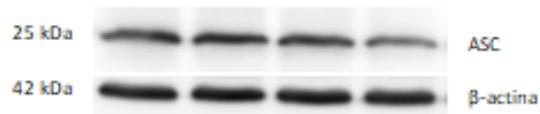
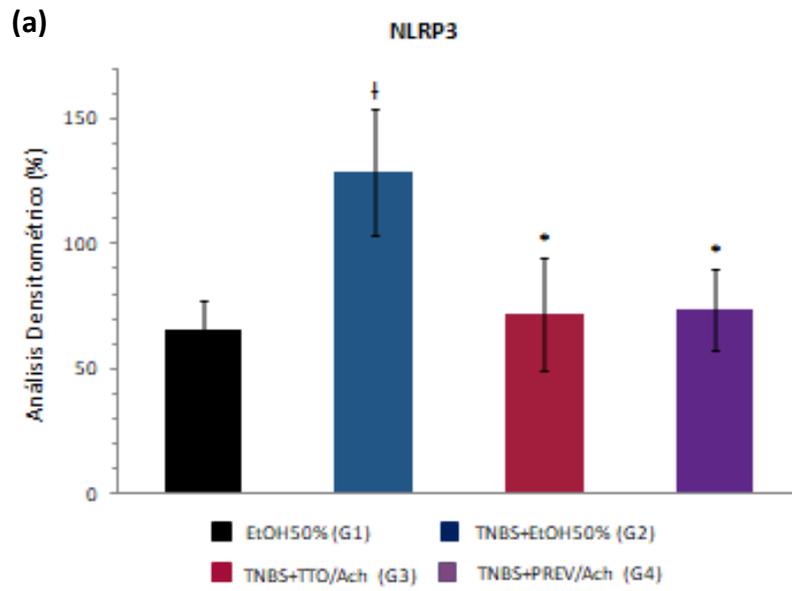


Figura 38: Ach disminuye la expresión de las proteínas iNOS y COX-2. Expresión de proteínas iNOS y COX-2 por análisis de Western blot. Análisis densitométrico expresado en porcentaje (%) del grupo control G1 (negro), grupo enfermo G2 (azul) y grupos enfermos tratados con *Ach* (curativo G3: color rojo; y preventivo G4: morado). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0.05) respecto a G2 (azul); † Significancia estadística (<0.05) respecto a control G1 (negro).

12. Expresión de proteínas del complejo multiproteico inflamasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1 en la enfermedad de Crohn y sus niveles postratamiento con *Ach*

Para evaluar el impacto del tratamiento sobre los mecanismos moleculares involucrados que subyacen al proceso inflamatorio, hemos realizado análisis de expresión proteica mediante análisis de Western blot del complejo inflamasoma NLRP3/ASC/caspasa 1, cuya expresión y actividad ha sido recientemente descrita como una vía de gran relevancia en la homeostasis e inmunidad del sistema gastrointestinal y una vía crítica en la inflamación intestinal.

Los resultados del análisis demostraron que la expresión de la proteína NLRP3 está incrementada significativamente (p -value <0.05) en el grupo enfermo G2, mientras que 50 mg/Kg por vía orogástrica con *Ach* fue capaz de disminuir fuertemente (p -value <0.05) la expresión de la proteína NLRP3 (**Figura 39a**). Consecuentemente, la proteína ASC, que juega un rol primordial en la formación del inflamasoma, presentó un aumento en los ratones enfermos de Crohn, mientras que una subregulación fue observada en los grupos tratados con *Ach*, aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas (**Figura 39b**). Cuando se observó y cuantificó la caspasa 1, la última proteína de la cascada inflamatoria del inflamasoma NLRP3 y responsable de la maduración de IL-1 β e IL-18, los resultados arrojaron un esperado incremento de su expresión en el grupo con EC sin tratar (G2), mientras que se advirtió una reducción significativa en ratones con tratamiento curativo a base de *Ach* (G3). Los grupos a los que se les administró *Ach* 7 días previos a la inducción (G4) mostraron una expresión con una fuerte tendencia a la baja cuando se compararon con el grupo enfermo G2 (**Figura 39c**).



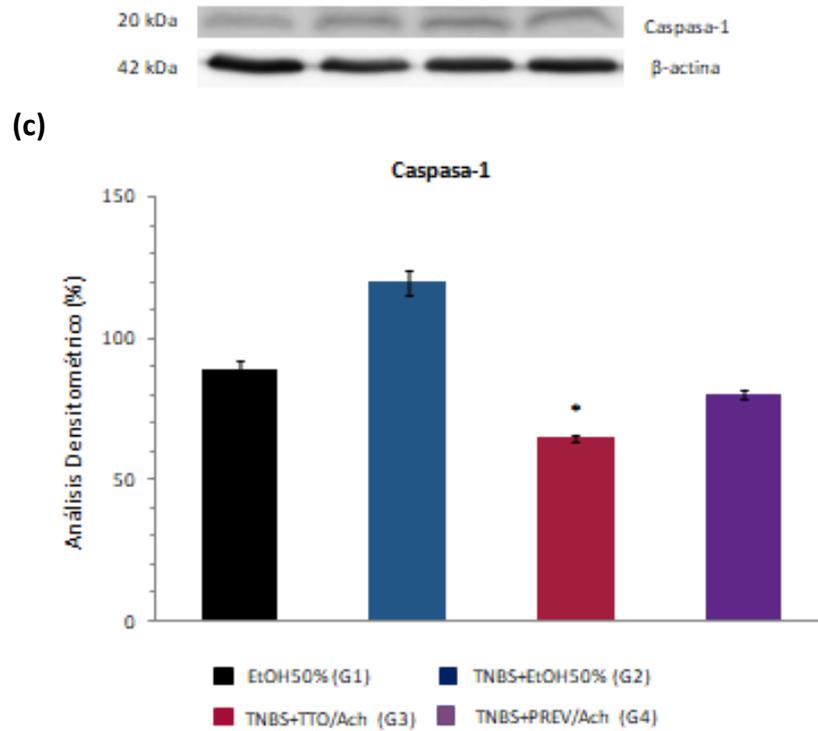


Figura 39: Ach inhibe la activación del complejo inflammasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1. **a)** Expresión de proteína NLRP3 por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β-actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. **b)** Expresión de proteína ASC por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β-actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. **c)** Expresión de proteína Caspasa-1 por Western blot y análisis densitométrico normalizado con β-actina, expresado en porcentaje (%). La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0.05) respecto a grupo G2 (azul); † Significancia estadística (<0.05) respecto a control G1 (negro).

13. Efecto de *Ach* sobre los niveles de citoquina inflamatoria IL-1 β en el modelo animal de enfermedad de Crohn inducido por TNBS

Con el objetivo de explorar los mecanismos por los cuales el maqui disminuye la inflamación transmural en colon de ratones con EC por TNBS, se planteó la evaluación de la producción de citoquinas inflamatorias. Debido a los hallazgos anteriormente descritos sobre la fuerte expresión del inflammasoma en tejido intestinal de animales con EC, se evaluó específicamente la producción de IL-1 β en tejido colónico, cuya maduración y actividad biológica requiere del ensamblaje del inflammasoma NLRP3 y activación de caspasa 1. Hemos podido determinar que en modelo de EC por TNBS existe un incremento significativo (*p-value* <0.01) de la producción de IL-1 β , concordante con la intensa activación de inflammasoma NLRP3 encontrada en el intestino grueso por Western blot. Fue interesante comprobar que *Ach* logró atenuar con un alto poder de significancia estadística (*p-value* <0.01) los niveles de IL-1 β en tejido colónico (**Figura 40**), probando el efecto antiinflamatorio del *Ach* mediante una reducción importante de la producción de la citoquina inflamatoria IL-1 β .

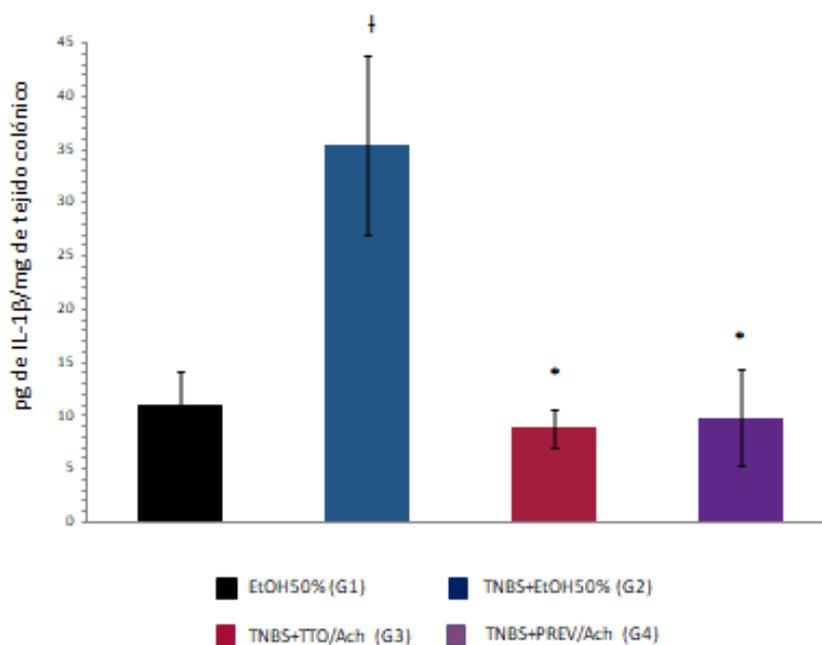


Figura 40: *Ach* inhibe la producción de IL-1 β en tejido colónico. Concentración de IL-1 β en tejido colónico mediante análisis de ELISA. La desviación estándar de la media (SEM) se expresa con barras verticales. *Significancia estadística (<0.01) respecto a grupo G2 (azul); † Significancia estadística (<0.01) respecto a control G1 (negro).

VIII. DISCUSIÓN

La EII es un desorden inflamatorio intestinal crónico que incluye principalmente la CU y la EC. Difieren en diversos aspectos como localización y distribución de la inflamación y la población celular involucrada en la reacción inmune. Mientras que la CU está caracterizada por inflamación continua del colon y mediada por un perfil de citoquinas de células Th2, la EC es un desorden segmentario y transmural que puede afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal y ha sido asociada con células Th1, aunque se ha descrito recientemente que las células Th17 estarían involucradas tanto en CU como en EC [361]. A pesar de los importantes avances terapéuticos durante la última década, debido en gran medida a una patogénesis aún sin dilucidar completamente, todavía no existe una cura médica ni estrategias de prevención efectivas para la EII y muchos pacientes viven con una carga considerable de síntomas a pesar del tratamiento, con la consecuente pérdida de calidad de vida [362]. Las terapias convencionales para la EII, incluidos 5-ASA, corticosteroides e inmunosupresores muestran un pronóstico desfavorable y reacciones adversas a estos medicamentos. Si bien la introducción de terapia biológica como el anti-TNF- α es relativamente efectiva, aproximadamente el 30% de los pacientes no responden a esta (no respondedores primarios), y hasta el 50% pierden la respuesta durante la terapia (no respondedores secundarios), además de un mayor riesgo de infección por tuberculosis y tumores malignos [361]. En este sentido, la exploración de nuevas estrategias terapéuticas, efectivas y seguras para la EII, forman una línea de estudio muy interesante donde el uso de modelos animales puede proporcionar más información sobre la patogenia y mecanismos que subyacen la EC y permitir el desarrollo de opciones terapéuticas.

Desde esta perspectiva, el uso de componentes bioactivos como los polifenoles puede ser una opción con alto potencial de desarrollo para tratar enfermedades inflamatorias, incluida la EC. El maqui, una baya endémica de la Patagonia chilena, es un fruto con un aporte de polifenoles y fitoquímicos, como la delfinidina, con relevantes propiedades médicas y ha sido descrito como una de las bayas con mayor poder antioxidante y propiedades antiinflamatorias [344, 363]. La actividad antioxidante puede variar dependiendo del tipo de extracto realizado. Nuestro procedimiento para la extracción de polifenoles fue realizado según lo descrito por diversos autores, que han identificado que mediante la extracción con MeOH ácido se obtienen los principales

componentes polifenólicos del maqui como ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas [294, 345]; aunque otros estudios han demostrado que en la murta, una baya chilena similar al maqui, los polifenoles obtenidos de un extracto metanólico como cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-arabinosa y delphinidina 3-glucosidasa, difieren de los obtenidos del extracto etanólico, en el que se observa un perfil fitoquímico representado principalmente por ácido cafeico, quercetina 3-glu y quercetina, presentando este último una mayor CA [296].

El análisis del CTP del maqui en nuestro extracto de MeOH/H⁺ fue de 39.02 mg de GAE/g del fruto entero liofilizado (carne del fruto, piel y semillas), mostrando un aporte significativamente mayor que lo publicado por Fredes y cols. [299] en su extracto metanólico a partir de fruto seco, el cual alcanza valores de 19.07 mg de GAE/g y mayor que lo obtenido por Brauch y cols. [343], que alcanzaron un CTP de 32.0 mg/g del fruto seco del maqui y valores muy superiores de polifenoles totales respecto a extracto de maqui proveniente del fruto fresco (19.7 mg/g) y jugo de maqui (7.3 g/L). Por otra parte, los valores alcanzados de polifenoles totales en nuestro extracto es relativamente inferior a lo publicado por Genskowsky y cols. [345] cuyo CTP fue de 49.74 mg/g. Los principales factores que podrían influir en las diferencias encontradas del CTP son el genotipo del maqui, el lugar de recolección, el almacenamiento y el procedimiento de la cosecha. Se ha observado en arándanos [296] y en maqui [343] que el contenido de antocianinas de los frutos silvestres es mayor que el de los frutos cultivados. El estado de madurez del fruto también es un factor que puede afectar tanto el contenido como al tipo de polifenoles. Se ha publicado que en las frutas inmaduras del maqui predominan las proantocianidinas, mientras que en las frutas maduras predominan las antocianinas [299]. También es posible que el control de ciertas variables en el procedimiento de extracción pueda variar el CTP, como el control de la luz, temperatura, almacenamiento y tipos de deshidratación del extracto final, lo que podría explicar cómo bajo similares protocolos de extracción, los valores de contenido de polifenoles difieran entre distintos estudios.

Es indispensable considerar estos factores en el momento del procedimiento ya que el CTP está fuertemente relacionado con las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que un adecuado procedimiento y aporte de polifenoles podría proporcionar el efecto deseado sobre la salud del consumidor.

Adicionalmente, la CA de los polifenoles está determinada por su estructura, como la facilidad con la que se puede donar un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo a un radical libre y la capacidad de los compuestos para soportar un electrón no apareado. En general, el número y la posición de los hidrógenos donados por el anillo aromático de la molécula fenólica determinan directamente su capacidad antioxidante [298]. Aquí, hemos mostrado que el procedimiento para la obtención de polifenoles totales resulta en una elevada capacidad antioxidante demostrada mediante la capacidad del extracto de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . El fruto del maqui analizado en este trabajo mostró un valor FRAP de 20.571,31 $\mu\text{mol TE/g}$. Estos datos son consistentes con lo publicado por otros autores donde es ampliamente descrito que el maqui es uno de los frutos existentes en la naturaleza con mayor CA, presentando, junto con otros frutos nativos chilenos como murta y calafate, un valor de actividad antioxidante entre 10.000 a 25.000 $\mu\text{mol TE/g}$ [290, 294]. Los valores medios descritos en otras especies como mangos, kiwis y fresas, entre otras, son de 500 $\mu\text{mol TE/g}$ de peso seco, mientras que en otras bayas, ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes como cerezas, grosellas negras, frambuesas, arándanos y moras, varían entre 5.000 a 10.000 $\mu\text{mol TE/g}$ [290]. Estos datos indican que el extracto metanólico ácido del maqui presenta un gran potencial antioxidante posiblemente relacionado a sus compuestos polifenólicos totales o a la acción sinérgica entre ellos.

En general, los efectos biológicos de los extractos de frutos reconocidos por su alto poder antioxidante son evaluados en primera instancia en estudios *in vitro*. Con el fin de determinar la CA del compuesto en estudio, el uso de H_2O_2 es ampliamente utilizado en la literatura para la inducción de EO. Se ha descrito que las células de colon Caco-2 son capaces de mantener su viabilidad a concentraciones de 0- 250 μM de H_2O_2 debido a la presencia de mecanismos antioxidantes eficientes (GPx, SOD, CAT) [364], por lo que son necesarias concentraciones mayores para evaluar el efecto de *Ach* sobre la viabilidad celular y EO. Adicionalmente, las concentraciones para su aplicación *in vitro* varían ampliamente. En líneas celulares se utilizan concentraciones de extractos de bayas deshidratadas entre 20 a 10.000 $\mu\text{g/ml}$ [365], como por ejemplo, dosis entre 25 a 200 $\mu\text{g/ml}$ de fresas, arándanos o moras [317] o extractos etanólicos de hasta 60 mg/ml de frutos rojos [318].

En nuestro estudio, hemos utilizado las concentraciones de 500 μM de H_2O_2 (0.05%) para inducir oxidación en células epiteliales de colon HT-29 y concentraciones de 100, 200 y 300 $\mu\text{g/ml}$ de *Ach*, dosis menores a las utilizadas con extractos etanólicos, ya que, según lo descrito previamente, la obtención de un mayor CTP es superior en extracto metanólico. Hemos demostrado el efecto protector de *Ach* frente a la viabilidad celular y al EO intracelular inducido por H_2O_2 . Los resultados sobre la viabilidad celular son dosis dependiente, presentando el principal efecto a las 48 horas y a concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$, indicando una actividad biológica que se inicia a las 24 horas y que se mantiene hasta las 48 horas, probablemente por la captación celular sostenida en el tiempo. Cuando se valoró la capacidad de *Ach* de inhibir el EO en línea celular epitelial y en macrófagos, pudimos apreciar que concentraciones de 300 $\mu\text{g/ml}$ son capaces de disminuir la oxidación de una forma significativa en las células HT-29, mientras que en las RAW264.7 se reducía el EO a concentraciones de 200 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados son concordantes con los publicados por Miranda-Rottmann y cols. [344], donde la incubación con jugo de *Ach* por 30 minutos, previo a la adición de 500 μM de H_2O_2 en células HUVEC, disminuye de forma significativa la oxidación comparado con las células endoteliales expuestas a H_2O_2 sin tratamiento. Al igual que nuestro estudio, los resultados que obtenían eran dosis dependiente. Además, curiosamente, en nuestro trabajo fue posible evidenciar que cuando utilizamos concentraciones menores de extracto de *Ach* y la dosis más baja de 5-ASA los resultados sobre el porcentaje de oxidación fue significativamente inferior respecto al control y a las otras dosis. Este efecto podría indicar efectos sinérgicos entre *Ach* y 5-ASA, fármaco de uso clínico del que se han descritos efectos antiinflamatorios por regulación de la vía JNK/p38 en macrófagos [366], como ya se ha comentado en la introducción de este documento. El hallazgo de esta sinergia es muy interesante porque abre la posibilidad de una terapia combinada con dosis más bajas de 5-ASA, lo que acarreará menores efectos secundarios.

Por otro lado, Reyes-Farias y cols. [348] han descrito el efecto del extracto de maqui sobre el perfil de marcadores inflamatorios en macrófagos RAW264. La adición de 100 μM de maqui prevenía la respuesta inflamatoria inducida por agentes inflamatorios al inhibir la producción de óxido nítrico y la expresión de genes iNOS y TNF- α , junto con la inducción de la producción de agentes antiinflamatorios como IL-10,

describiendo propiedades no sólo antioxidantes del maqui, sino también antiinflamatorias. En el presente estudio utilizamos las células RAW264.7 estimuladas con LPS para valorar el efecto antiinflamatorio de *Ach*.

Respecto a la evaluación de la citotoxicidad de *Ach* en macrófagos activados, nuestro estudio no difiere de lo publicado en la literatura. Céspedes y cols. [342] mostraron que distintos extractos y fracciones de *Ach* no presentan variaciones significativas sobre la viabilidad en las células RAW264.7 expuestas a 1 µg/ml de LPS, mientras que la adición de un extracto de vino en estas líneas celulares de macrófagos no afecta a la viabilidad celular a las 24 horas, a pesar de incrementar las concentraciones hasta 250 µg/ml. Sin embargo, en macrófagos de la línea celular J774A.1, las mismas concentraciones reducen el número de células viables en casi un 50% [306]. Otros extractos a base de hierbas medicinales chinas muestran que con 300 µg/ml esta línea celular no presenta efectos citotóxicos, pero a concentraciones superiores de 500 µg/ml causan una toxicidad significativa [367]. En general, la valoración de la citotoxicidad de los polifenoles provenientes de diferentes bayas se ha determinado en diferentes concentraciones para determinar la toxicidad potencial. Resultados sobre la determinación de la viabilidad celular a través de unidad formadoras de colonia (CFU) en *Saccharomyces cerevisiae* ha mostrado que jugos de más de cinco bayas a diferentes concentraciones no muestran una disminución en la viabilidad celular en comparación con los controles [295]. Además, hasta ahora, no se han descrito efectos tóxicos del extracto de MeOH de *Ach* [341].

Es importante destacar que los polifenoles que han demostrado un posible beneficio sobre la viabilidad y el estrés oxidativo *in vitro* sólo pueden ser verdaderamente efectivos *in vivo* si alcanzan los tejidos donde han de ejercer su acción y en concentraciones suficientes para tener efecto biológico deseado. Las propiedades biológicas de los polifenoles dependen de las cantidades consumidas y de la biodisponibilidad. La biodisponibilidad parece diferir ampliamente entre varios polifenoles [280], siendo esencial conocer la absorción y el metabolismo de estos polifenoles a nivel de organismo mediante estudios de su biodisponibilidad *in vivo*. Se ha publicado que los polifenoles de las bayas ingeridas sobreviven a la digestión en el tracto digestivo superior, donde una pequeña parte de ellas se metabolizan de polifenoles oligoméricos a polifenoles monoméricos, los cuales son absorbidos en el

intestino delgado, previa modificación enzimática. Durante el proceso de absorción, los compuestos fenólicos se conjugan por procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación en el intestino delgado y más tarde en el hígado para su excreción urinaria y su circulación sistémica para llegar a los órganos y tejidos. Los polifenoles no conjugados son virtualmente inexistentes en el plasma [280]. La otra parte de los compuestos bioactivos que no son absorbidos pasan inalteradas por el intestino delgado y alcanzan diferentes partes del colon proximal y distal en dosis sustanciales. A este nivel, en el epitelio colónico, tanto los compuestos fenólicos como sus productos de degradación se metabolizan ampliamente a ácidos fenólicos y compuestos más simples mediante la microbiota colónica, para luego ser absorbidas al sistema circulatorio [285]. La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos totales y flavonoides del maqui después de la digestión gástrica es descrita entre el 113% y 103%, respectivamente, mientras que su bioaccesibilidad después de la digestión intestinal varía entre el 78.2% y 14.10%, respectivamente. Se ha postulado que la concentración de todos los compuestos fenólicos del maqui disminuye después de la digestión oral e intestinal, especialmente las antocianinas. Sin embargo, la concentración de todos los compuestos fenólicos aumenta ligeramente después de la digestión gástrica. Por lo tanto, se postula que los flavonoides, incluidas las antocianinas liberadas después de la digestión gástrica, pueden estar biodisponibles y, por lo tanto, ejercer una actividad antioxidante a nivel intestinal [368]. Esta información es altamente relevante si consideramos que la afectación en la EC es principalmente en íleon o en colon, como es el caso de este modelo de simulación de inflamación aguda tipo Crohn.

Los resultados obtenidos del modelo experimental de EC en roedores mediante la inducción química por TNBS con EtOH por vía intracolónica fue exitosa. Esto se debe en parte gracias a las propiedades cáusticas de esta mezcla, así como por mediar una respuesta inmune/inflamatoria [223]. En primera instancia, la inducción del modelo por vía intracolónica tuvo por objetivo simular la EC desde el punto de vista patogénico, ya que la administración del heptano fue a nivel colónico por la facilidad de acceder a este nivel. La inducción no pretendió lograr una inflamación desde el punto de vista etiopatogénico, ya que, como es sabido, la EC en humanos presenta una afectación principalmente ileal [23]. En nuestro estudio se seleccionaron roedores machos de la línea Balb/c. La selección de machos se tuvo en cuenta ya que las hembras presentan

mayor mortalidad en el transcurso del estudio que los machos, probablemente por el hecho que las hembras tienen un peso corporal más bajo y son más susceptible a emaciación y pérdida severa de peso asociado a la colitis inducida por TNBS [210]. La elección de una única dosis y a una concentración de 100 mg/kg de TNBS en EtOH al 50% tuvo la finalidad de lograr una inflamación aguda y evitar altas tasas de mortalidad, frecuentemente asociadas con concentraciones superior a 150 mg/kg [222].

La inducción de inflamación tipo Crohn en roedores de la línea Balb/c fue caracterizada por la aparición de úlceras en tejido colónico, infiltración de células inflamatorias, necrosis y pérdida de la función muco-secretora. Diversos autores han demostrado que el TNBS es un fármaco que induce exitosamente colitis como modelo de EC debido a que se evidencia una marcada hiperemia, inflamación y necrosis ulcerativa en el tejido de colon de los ratones así como características microscópicas asociadas a inflamación multifocal y transmural evidenciada por la infiltración de células inflamatorias, ulceraciones en la mucosa y submucosa, pérdida de células caliciformes y fibrosis propias de la EC [84, 217, 225]. A nivel clínico, las características fueron muy similares a las observadas en humanos. La inducción de EC por TNBS generaba pérdida severa de peso al día siguiente de la inducción, diarrea y heces sanguinolentas durante todo el experimento. Estas características representadas en el índice DAI también son comúnmente observadas en ratas y ratones con colitis mediada por TNBS o DSS [218, 221]. En ratones SJL/J, altamente susceptibles a colitis inducida por TNBS el rápido desarrollo de diarrea acompañada de una severa pérdida de peso ($22\% \pm 4\%$) 4 días después de la inducción de la colitis, así como el daño microscópico y macroscópico del intestino (grado 3 a 4 sobre 4) en ese mismo tiempo [210] indica la importancia de evaluar la eficacia de la inducción y el tratamiento posterior durante la fase más aguda. En nuestro estudio de investigación, se realizó un ensayo piloto para comprobar esta información. En este estudio piloto se inocularon 5 ratones con TNBS a una concentración de 100 mg/kg en EtOH50% en una única dosis [217] para la valoración histopatológica en los días 4, 7 y 14 después de la inducción. Los resultados del análisis microscópico revelaron la ausencia de inflamación y de alteraciones estructurales de la mucosa en el día 7 y a las dos semanas después de la inducción de la enfermedad. Hallazgos de edema en la mucosa a nivel local y depósitos de fibrina indicaron un aumento de la permeabilidad vascular, lesiones características postraumáticas

relacionadas con la inflamación, que al tiempo de 7 días o más se recuperaba casi por completo. Contrariamente a estos resultados, la valoración a 4 días después de la inducción mostró características histopatológicas propias de la EC aguda. Finalmente, las modificaciones realizadas después del ensayo piloto respecto al modelo sugerido por Liu T.J y cols.[217] fueron las siguientes: mayor edad y peso de los ratones, menor volumen final del TNBS y EtOH50% y los cuidados después de la inducción para impedir la deshidratación de los animales y posible muerte.

Una vez comprobada la eficacia del TNBS y el tiempo de la inflamación en este modelo experimental de EC, el presente estudio tuvo por objetivo investigar la influencia del extracto polifenólico del maqui, como un poderoso antioxidante y antiinflamatorio, sobre el proceso inflamatorio inducido por el TNBS en este modelo murino y describir los mecanismos relacionados subyacentes.

El efecto de los polifenoles sobre el amplio rango de actividad biológica, que no solo se limita a efectos antioxidantes, ha sido ampliamente descrito también como agente antiinflamatorios y moduladores del sistema inmune [305]. Scarano y cols. [326] han demostrado que los alimentos enriquecidos en diferentes polifenoles son capaces de reducir el daño clínico y la gravedad de la enfermedad en modelo de colitis inducido por DSS, mejorando de forma significativa la consistencia de las heces, el contenido de sangre fecal y peso corporal. El Dosmalfato, un citoprotector derivado de flavonoide administrado a concentraciones de 400 a 800 mg/kg, dosis superiores a la realizada por nuestro grupo, en modelo experimental inducido por DSS, redujo significativamente la actividad clínica de la colitis de un modelo experimental inducido por DSS, pero no logró recuperar la longitud del colon de forma significativa [325]. Otros extractos de fuentes naturales han sido evaluados sobre el efecto clínico en colitis, mostrando una recuperación del peso corporal en roedores, pero a concentraciones de 200 mg/kg de peso corporal [103], valores mayores a la establecidas en nuestro estudio.

El maqui, un fruto que crece salvaje en el Sur de Chile, ha sido descrito como uno de los frutos con mayor poder antioxidante tanto por su contenido y tipo de polifenoles [344, 363]. Dado el curso clínico de la EII, con periodos de brote (agudo) y de remisión hemos, hemos analizado el efecto profiláctico del extracto polifenólico de maqui, así como su efecto como tratamiento curativo durante la fase aguda de la enfermedad. Los

resultados revelan claramente el efecto protector y curativo de *Ach* en la EC inducida por TNBS. La administración de 50 mg/kg de *Ach*, fue capaz de mejorar el estado de salud (movilidad, postura y pelaje), las características clínicas (valoradas mediante el índice DAI) y recuperar la pérdida de peso de los ratones con EC inducido químicamente. Adicionalmente, la administración preventiva y curativa del extracto hizo disminuir marcadores de inflamación macroscópicos como el acortamiento y el peso del intestino grueso y logró atenuar el score macroscópico alcanzado en los ratones enfermos no tratados.

A nivel histológico, el extracto de *Ach* mostró una actividad protectora sobre la actividad inflamatoria en el modelo animal de EC, mostrando una reducción significativa del daño microscópico y restauración del daño intestinal. La infiltración de células inflamatorias como neutrófilos en la mucosa y capas adyacentes ha sido sugerida a contribuir significativamente en la disfunción de la mucosa y en la necrosis del tejido de la pared intestinal [43]. El extracto de maqui administrado tanto preventivamente como de forma curativa mostró una disminución del infiltrado inflamatorio y una recuperación significativa de la arquitectura de la mucosa y de su función muco-secretora evidenciado por la técnica PAS. Esta propiedad de los polifenoles ha sido previamente descrita. El uso de ácido elágico, un polifenol encontrado especialmente en granada y frambuesa, favorece la reepitelización y curación del epitelio, comprobado mediante la capa de mucina claramente visible y células positivas a Alcian-Blue en mucosa de ratas tratadas a las 48, 24 y 1 hora previa a la inducción con TNBS y 24 horas después [85]. Otros agentes farmacológicos como Losartán (un inhibidor de los receptores de angiotensina) han sido descrito como agentes protectores, al restaurar la histología normal en la colitis inducida por TNBS, disminuyendo las citoquinas inflamatorias mediadas por Th1 y Th17 (IL-17 e IL-23) en tejido colónico e inhibiendo la apoptosis de IEC [217]. En un estudio llevado a cabo por Fatani y cols., el tratamiento preventivo con Carvedilol, un bloqueador β -adrenérgico no selectivo de tercera generación, protegió la mucosa del colon e impidió la respuesta oxidativa e inflamatoria en el colon de ratas con CU inducida por AcOH [30].

No existe en la actualidad ningún estudio donde se aplique el extracto de maqui en modelos experimentales con EC. No obstante, es posible comparar los efectos de

Ach sobre parámetros clínicos y fisiopatológicos en modelos animales relacionados con patologías cardiovasculares. La inducción de isquemia cardiaca en roedores ha sido desarrollada para la valorar los efectos de la administración de extracto de MeOH de maqui. Una dosis de 10 mg/kg previo a la inducción de daño al miocardio restaura la presión arterial sistólica, previene eventos de arritmias y reduce procesos de oxidación lipídica durante la reperfusión [341]. Adicionalmente, se ha demostrado que la exposición de alcaloides derivados de la hoja del maqui ha mostrado inducir vasorelajación en anillos de aorta de ratas normotensas pre contraídas con fenilefrina o KCl [349].

El EO, asociado a un incremento de especies reactivas y a una inhibición de sistemas antioxidantes, resulta en efectos lesivos en el tejido colónico, contribuyendo desde la ruptura de la barrera epitelial e incremento de infiltración leucocitaria y moléculas inflamatorias en el tejido hasta una actividad oxidante en sangre periférica [30, 369], sugiriendo que el EO podría participar en la iniciación y progresión de la inflamación en EC. En condiciones de EO, Nrf-2, un factor de transcripción responsable de la regulación del equilibrio redox, aumenta la producción de HO-1, un poderoso antioxidante ampliamente reconocido por presentar un efecto citoprotector y de reducción de peroxidación lipídica en respuesta a EO a través de la producción de biliverdina y bilirrubina [65]. Numerosos estudios indican que Nrf-2 regula el EO a través de vías de señalización y conexiones intracelulares con NF- κ B y PPAR- γ [67]. Específicamente, hemos encontrado en nuestro estudio que el modelo de EC por TNBS presenta una activación y aumento de expresión de Nrf-2 y HO-1. Sin embargo, diversos autores han mostrado una subregulación de Nrf-2 y HO-1 en colon dañado por TNBS en un modelo recidivante de inflamación [67] y en modelos celulares de inflamación intestinal (células HT-29 estimulas con citoquinas) [313]. Sin embargo, Talapka y cols. han descrito un incremento de la expresión de ARNm de HO-1 en tejido inflamado sobre el día 4 después de una primera dosis de TNBS, expresión que disminuye un 50% luego de la tercera dosis de TNBS (modelo crónico) [104]. Estos resultados podrían explicar que, en un modelo agudo, como el realizado en nuestro trabajo, los niveles de vías antioxidantes como Nrf-2/HO-1 estén sobrerregulados, probablemente por sistemas compensatorios para aliviar la inflamación y el daño tisular, mientras que en la cronificación de la inflamación estos mecanismos estén deteriorados o disminuidos.

Estos resultados son concordantes en humanos con CU, donde los niveles de la expresión de proteína Nrf-2 son detectados al alza en biopsias colónicas inflamadas [68]. Moléculas como polifenoles y flavonoides son consideradas agonistas de Nrf-2, capaces de modificar el grupo sulfhidrilo de los residuos de cisteína de Keap1 por oxidación o por alquilación e inducir la vía antioxidante mediada por ARE [370]. Los polifenoles del té verde, epigallocatequina 3-galato (EGCG) y epigallocatequina (ECG), han sido identificados como activadores de ARE a través de la activación de las proteínas MAPKs (ERK, JNK y p38) [371]. En nuestra investigación, el tratamiento con *Ach* generó una leve tendencia a incrementar estas vías antioxidantes, sin embargo, es posible que los efectos significativos, incluso sobre los mecanismos de defensas propios del organismo, sean observados a largo plazo, específicamente en modelos donde existan episodios de brotes y remisión. La valoración de *Ach* sobre otros sistemas antioxidantes deberían de ser evaluados, ya que se ha mostrado que flavonoides podrían prevenir la producción de ROS mediante la inhibición de enzimas oxidantes, como la XO [372]. Adicionalmente, creemos que los mecanismos por los cuales el maqui presenta un efecto protector están relacionados no sólo en modular las señales redox, sino que también, y más fuertemente, a influir sobre las vías inflamatorias.

La inflamación crónica de la mucosa en la EII es causada por la activación del sistema inmunitario, produciendo altos niveles de mediadores proinflamatorios que ocasionan daño en el tejido. La vía de señalización NF- κ B es clave en la regulación de este entorno inmunológico. Su activación se encuentra notablemente marcada y permanentemente activada en pacientes con EII, promoviendo la transcripción de varios genes que se traducirán en proteínas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS [86]. En el presente estudio pudimos confirmar que COX-2 e iNOS, proteínas inductoras de moléculas inflamatorias, se encuentran aumentadas al cuarto después de la inducción de la EC. Estos hallazgos son consistentes con los publicados por Rosillo y cols. [85], donde un incremento de estas proteínas y de su vía de señalización se encuentran fuertemente expresadas en tejido de ratón desde el segundo día de la inducción de la enfermedad con TNBS, demostrando que estas proteínas son eventos inflamatorios tempranos en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, en diversos modelos de inflamación severa que cursan con desórdenes agudos y graves, como es el caso de

injuria pulmonar, se ha mostrado el efecto del resveratrol y quercitina, polifenoles proveniente del vino, después de 7 días del tratamiento sobre la reducción de la expresión de iNOS, como indicador de la producción de NO, y de COX-2, aunque sólo se veía afectada por resveratrol y no por quercitina [373]. Además, el resveratrol, ampliamente estudiado por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios, muestra un efecto sobre COX-2 y PGE₂, pero no sobre COX-1 ni sobre los niveles de PGE₂ [374]. Aunque el rol de las PG generalmente se correlaciona con la actividad de la enfermedad, otros autores han sugerido que una disminución de la producción de PGE₂ y PGD₂ estaría relacionada a la inflamación tipo colitis y que el uso de flavonoides impide la disminución de la producción de PG en la mucosa colónica, generando una inmunoregulación mediante el descenso del infiltrado inflamatorio y citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α [325].

Los resultados de nuestros estudios demuestran que *Ach* es capaz de reducir de forma significativa los niveles de COX-2 e iNOS del tejido colónico cuando se administra una vez inducida la enfermedad y presenta una fuerte tendencia a la disminución cuando es administrado de forma preventiva, en comparación con el grupo enfermo sin tratamiento. Estos resultados son prometedores ya que, por una parte, la reducción de la actividad inflamatoria mediada por las proteínas COX-2 e iNOS durante el transcurso de la fase aguda de la enfermedad se ha logrado con un tratamiento de corta duración (4 días) y, por otra, podría disminuir el grado de actividad clínica e inflamatoria al ser administrado durante las fases de remisión. Estos datos indican que el maqui, con su composición y contenido de polifenoles antocianinas y no antocianinas, podría ejercer su acción mediante mecanismos antiinflamatorios.

Recientemente se ha identificado que el papel del inflamasoma es necesario para la homeostasis intestinal y es fundamental para regular el sistema inmune intestinal. El inflamasoma NLRP3, que se expresa en niveles bajos o basales en células fagocíticas no estimuladas y en células epiteliales, puede activarse y actuar en respuesta a señales exógenas y endógenas [115]. Se ha descrito que la actuación del inflamasoma NLRP3 para activar la maduración de IL-1 β podría jugar un papel vital en la patogénesis y en el desarrollo de la EII. Aunque existen pocos datos al respecto, se ha determinado la presencia de SNP en pacientes con EC [147] y son pocos los estudios que han descrito la

participación de inflammasoma NLRP3 en modelos *in vitro* e *in vivo* [123, 149-151]. Adicionalmente, parece ser que la activación de las vías NF- κ B y MAPK son responsables de la expresión y activación del inflammasoma NLRP3 [375].

En el presente estudio, nuestros resultados indican de forma significativa una fuerte reducción de la expresión de proteína NLRP3 causada por la administración de extracto de *Ach*, alcanzando niveles basales en tejido colónico cuando se compara con grupo experimental control. Del mismo modo, se observó una fuerte expresión de NLRP3 en el grupo experimental con EC sin tratamiento. Estudios *in vitro* en macrófagos han demostrado el papel del inflammasoma en células inflamatorias y el papel de componentes bioactivos en modular su activación [123, 306]. Estos resultados también se han observado en un modelo de colitis inducida por DSS, donde la administración con curcumina a una concentración de 100 mg/kg/día durante 7 días redujo significativamente los niveles de NLRP3 [123]. Así mismo, el efecto del pretratamiento con resveratrol en un modelo de reperfusión isquémica intestinal suprimió la expresión de NLRP3 y la piroptosis relacionada con el inflammasoma. Por otro lado, es muy interesante la estrecha relación encontrada entre la actividad de HO-1 y la inhibición del inflammasoma. En un modelo animal de nefropatía, EGCG favorecía un incremento en los niveles de HO-1 y una disminución de la expresión de NLRP3. Un bloqueo de HO-1 impedía la inhibición del inflammasoma y la producción de IL-1 β por el polifenol derivado del té verde [376]. Estas asociaciones establecen un vínculo de gran interés entre moléculas antioxidantes, marcadores inflamatorios y uso de polifenoles.

Como era de esperar, durante la inflamación aguda de la EC, una vez que se ha identificado la activación de NLRP3, otras proteínas que conforman el ensamblaje inflammasoma, ASC y caspasa 1, presentaron una sobreexpresión en tejido colónico de nuestros ratones enfermos. El uso de una dosis de 50 mg/kg/día de *Ach*, durante 4 días desde la inducción de la enfermedad y hasta el sacrificio, reduce todos los elementos del complejo multiproteico estudiados. Los mismos resultados se obtuvieron tras la administración del extracto polifenólico de maqui de forma preventiva una semana antes de la inducción de la enfermedad. Estos datos otorgan fuertes indicios de que el tratamiento preventivo y curativo con extracto polifenólico del maqui revierte la

activación de NLRP3 y su ensamblaje en la inflamación intestinal de nuestro modelo murino de EC.

Numerosos estudios muestran que la liberación de IL-1 β está mediada principalmente por la activación de caspasa 1 a través de la activación de NLRP3. Se ha descrito que la colitis inducida por DSS dispara la liberación de IL-1 β en macrófagos peritoneales estimulados con LPS [123]. La instilación intracolónica de AcOH induce la movilización de granulocitos y macrófagos al epitelio dando como resultado la sobreproducción de mediadores proinflamatorios, como IL-1 β [192].

En nuestro estudio, tras los resultados obtenidos sobre la activación del inflamasoma en el modelo animal y la inhibición de la expresión de éste producida por el tratamiento con *Ach*, se llevó a cabo un análisis de ELISA para determinar la expresión de IL-1 β en el tejido colónico de todos los ratones. Se observó una disminución significativa de los valores de producción de esta citoquina inflamatoria en el grupo de ratones tratados con *Ach* previo y después de la inducción respecto al grupo de ratones enfermos sin tratamiento. Estos resultados indican el papel de IL-1 β en este proceso inflamatorio y completa el eje de inflamación que subyace a la EC. Estudios previos informan del efecto de polifenoles derivados del vino sobre la producción de citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-8, además de IL-1 β [307, 374]. Junto con nuestro estudio, esta información indicaría la participación de los componentes bioactivos en la modulación de las cascadas inflamatorias.

Dado el conocimiento de que citoquinas inflamatorias juegan un papel clave en la EII, más específicamente la IL-1 β , cuya producción está mediada por la activación del complejo inflamasoma NLRP3, algunos estudios clínicos relacionados con esta vía inflamatoria se han llevado a cabo en pacientes con EII. Los resultados, aunque incipientes, indican una mayor prevalencia de activación del inflamasoma NLRP3 y producción de IL-1 β en pacientes con EC que en pacientes con CU [149]. Debido a que *Ach* inhibe la expresión de NLRP3 y la activación del complejo multiproteico, el maqui podría ser una opción terapéutica para combatir la inflamación en la EII, específicamente en la EC.

Sin embargo, son pocos los ensayos llevados a cabo en humanos que valoran el efecto de polifenoles en pacientes con EII. Un estudio multicéntrico europeo prospectivo de 12 a 19 años de más de 400.000 mujeres y hombres entre 20 y 80 años, de 8 países europeos, ha indicado una relación inversa entre la ingesta específica de flavonoides y resveratrol y el riesgo de desarrollar EC, sin identificar un papel potencial de este tipo de polifenoles en el desarrollo de CU [13]. Asimismo, se ha realizado un estudio piloto abierto, prospectivo, simple (no cegado o enmascarado) en 13 pacientes adultos con CU leve a moderada, a los cuales se les proporcionó un preparado de 40 gramos de arándanos (*Vaccinium myrtillus*) ricos en antocianinas, 4 veces al día (160 g total, correspondiente a 600 gramos de fruta fresca), durante 6 semanas. Los resultados mostraron una disminución significativa del índice de Mayo y del score histológico en todos los pacientes y bajos niveles de calprotectina durante el tratamiento, considerando que 4 pacientes lograron valores indetectables de calprotectina al finalizar el tratamiento [327].

Respecto al uso de maqui, hasta ahora no existe ningún estudio en humanos que evalúe el efecto de *Ach* en la inflamación intestinal, específicamente en la EC. La existencia de ensayos clínicos de los efectos de *Ach* son escasos y los que hay están realizados en sujetos sanos o con alguna alteración de la glicemia o relacionados con la salud ocular [377, 378]. En este sentido, se ha informado de la efectividad del Delfinol[®], un compuesto estandarizado de maqui soluble en agua y rico en antocianina (delfinidina), sobre la reducción del EO. La administración tres veces al día de 162 mg de antocianinas (Delfinol[®]) durante 4 semanas en personas fumadores y con sobrepeso sometidos a un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo logró una reducción de los niveles de LDL-oxidado y una disminución urinaria de 8-iso-prostaglandina F₂α con ausencia de efectos adversos [315]. Estos resultados presentan indicios interesantes de los posibles efectos antioxidantes y antiinflamatorios del maqui y de la rápida y adecuada biodisponibilidad de las antocianinas cuando se consume oralmente [379]. Sin embargo, cabe destacar que los beneficio obtenidos en los estudios que han utilizado extractos polifenólicos en humanos cesan cuando se detiene su consumo. Por tanto, de momento, estos tratamientos, permitirían controlar los procesos inflamatorios en la EII y mantener en remisión la EC.

Finalmente, se propone un modelo en el que se explican las vías y mecanismos por los cuales el maqui tendría los efectos antioxidantes y antiinflamatorios en la EC (**Figura 41**). Algunos estímulos de daño celular como LPS y citoquinas inflamatorias pueden ser reconocidos por receptores TLR4, los cuales generarían un incremento en la producción de ROS intracelular. Por una parte, los ROS activarían las vías de señalización MAPKs y factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B. Este último promovería la síntesis de las proteínas que conforman el inflamasoma NLRP3. Por otro lado, los ROS activarían los receptores citoplasmáticos NLR, específicamente NLRP3 y favorecerían el ensamblaje del inflamasoma y su consecutiva producción de IL-1 β . Al mismo tiempo, la activación de la ruta MAPK, específicamente la proteína p38, otorgaría las señales necesarias para el ensamblaje del inflamasoma, como por ejemplo el eflujo de potasio. Además, el factor de transcripción NF- κ B regularía positivamente la síntesis de iNOS y su producción de NO \bullet y la síntesis de COX-2 junto con su producción de Tx y PG $_2$, que tendrían un efecto sobre la inflamación, la hiperemia y el edema. Desde esta perspectiva, el maqui actuaría inhibiendo la expresión de las dos vías inflamatorias: el complejo multiproteico inflamasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1 y su respectiva producción de IL-1 β y las respuestas inflamatorias relacionadas con iNOS y COX-2. En paralelo, la producción intracelular de especies reactivas (ROS, RNS) activarían Pi3K que resultaría en un aumento de la síntesis de HO-1 mediante Nrf-2, probablemente como mecanismo compensatorio. Sin embargo, el maqui parece sobrerregular aún más la expresión de la vía Nrf-2 y HO-1, presentando un efecto antioxidante.

La descripción, al menos en parte, de los mecanismos antiinflamatorios/antioxidante en un modelo animal de daño intestinal similar a la EC en humanos, y los resultados obtenidos en este estudio permiten vislumbrar los posibles efectos beneficiosos del uso del maqui, uno de los frutos con mayor poder antioxidante descrito en la naturaleza, para el tratamiento de la EC e incluso para otras patologías inflamatorias. El extracto de maqui rico en polifenoles utilizado en este estudio fue obtenido mediante metanol ácido y liofilizado para evitar cambios en sus propiedades, cuestión importante de cara a los resultados obtenidos. No cabe duda de que este es un punto de partida de una investigación muy interesante que debe seguir su marcha. Estudiar los mecanismos descritos y otros relacionados en un modelo crónico de la EC

podría ser un siguiente paso. Por último, sería deseable que en un futuro se pudiera plantear la posibilidad de realizar ensayos clínicos con pacientes.

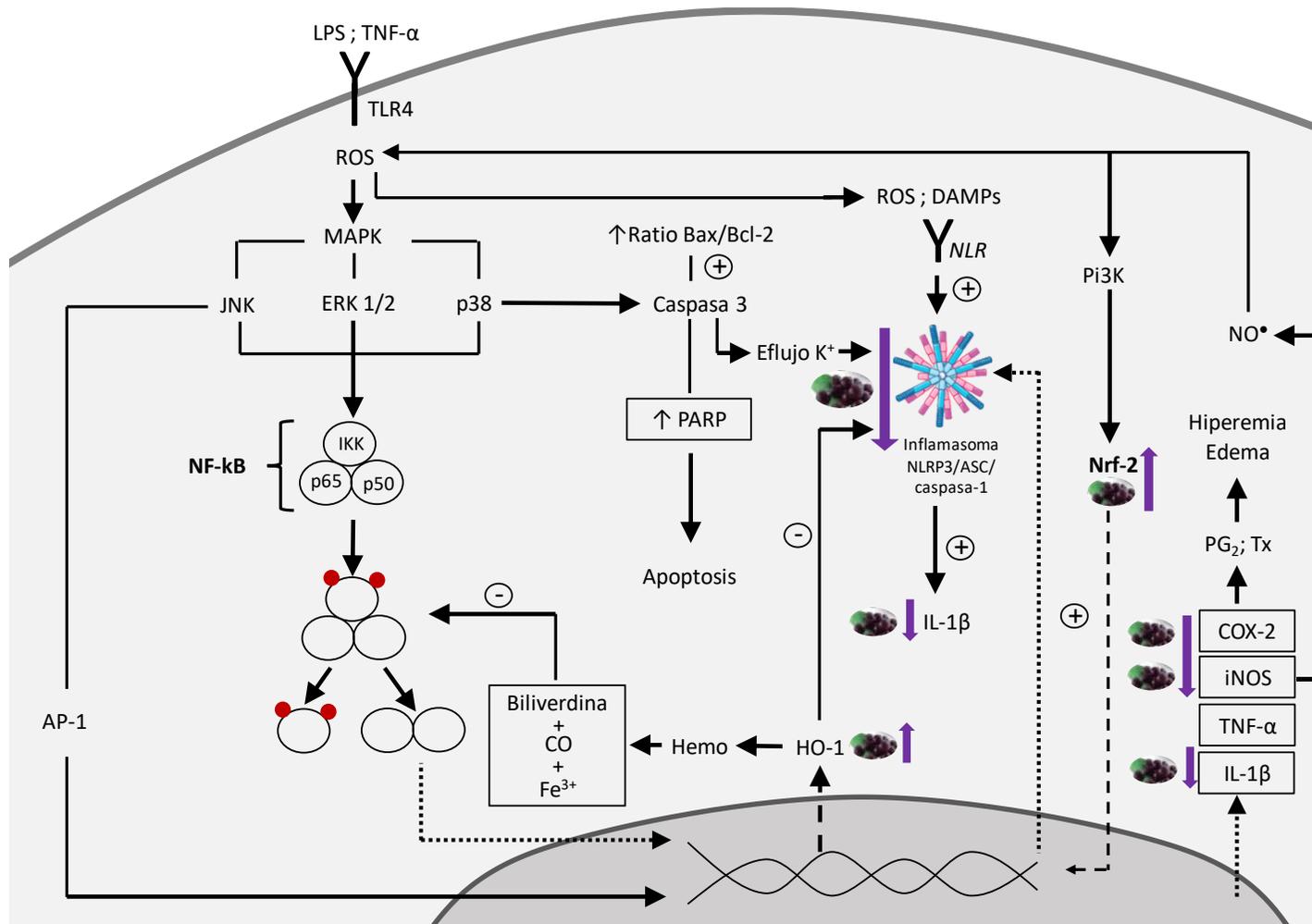


Figura 41: Vías de señalización involucradas en la enfermedad de Crohn y efectos propuestos de polifenoles derivados de *Ach* sobre estos mecanismos.

IX. CONCLUSIONES

1. Nuestro procedimiento de extracción de polifenoles del maqui con metanol ácido es un método muy eficaz para la obtención de un importante contenido de polifenoles con una alta capacidad antioxidante.
2. Los estudios en los cultivos de células epiteliales y macrófagos activados han demostrado que nuestro extracto polifenólico del maqui es un potente antioxidante que presenta un comportamiento dosis dependiente y sin efectos citotóxicos. Además, el extracto del maqui parece tener un efecto sinérgico con 5-ASA, fármaco de uso clínico en la enfermedad inflamatoria intestinal.
3. Las modificaciones efectuadas sobre el modelo de enfermedad de Crohn descrito por Liu T.J y cols. respecto a la edad, peso, volumen final del agente inductor y los cuidados después de la inducción para evitar la deshidratación, han logrado un modelo agudo de enfermedad de Crohn con síntomas clínicos e histopatológicos similares a los humanos, por lo que parece ser un modelo idóneo para estudiar mecanismos patogénicos y ensayar posibles terapias para esta enfermedad.
4. El extracto polifenólico del maqui, tras su administración tanto de forma preventiva como una vez iniciada la enfermedad, disminuye drásticamente los síntomas clínicos y el daño en el tejido colónico presente en los animales con enfermedad de Crohn.
5. En la inflamación aguda tipo Crohn de nuestro modelo animal, la vía antioxidante Nrf-2/HO-1 está sobreexpresada en la mucosa intestinal, probablemente como mecanismo compensatorio del daño oxidativo que acompaña a la inflamación. La administración preventiva y curativa del extracto polifenólico del maqui provoca un incremento de esta vía antioxidante, lo que ayudaría a disminuir el estrés oxidativo y el daño tisular.

6. Los parámetros inflamatorios COX-2 e iNOS, aumentados en el tejido colónico de los ratones con enfermedad de Crohn, disminuyen tras la administración del extracto polifenólico del maqui, y de forma significativa en el caso del tratamiento posterior a la inducción de la enfermedad. Además, nuestro extracto inhibe la expresión del complejo inflamasoma NLRP3/ASC/Caspasa 1, especialmente el receptor NLRP3 y la producción de IL-1 β .

7. Estos resultados indican que los polifenoles del fruto del maqui son una fuente antioxidante y antiinflamatoria importante, y podrían ser un buen candidato para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, especialmente la enfermedad de Crohn. Consecuentemente, la traslación clínica de estos hallazgos debería ser evaluada y desarrollada en el futuro.

X. ANEXOS

ANEXO 1: CULTIVO CELULAR

A. CAMBIO DE MEDIO Y MANTENIMIENTO

Procedimiento:

1. Medio en baño a 37°C por 30 minutos previos al cambio de medio.
2. Aspirar el medio. Evaluar si es necesario dejar un poco del medio antiguo para mantener sustancias positivas para el crecimiento, ya que, si el medio está completamente nuevo, induciría un retraso en su crecimiento.
 - Para Flask-25 agregar 4-5 ml de medio.
 - Para Flask-75 agregar 10-12 ml de medio.
3. Incorporar Medio (DMEM, RPMI u otro) a frasco.
4. Incubar células en incubadora de CO₂.

B. CONGELACIÓN

Procedimiento:

1. Tripsinizar (Tripsina-EDTA 1X, Biowest Cod: L0940) el cultivo celular con 1ml para flask 25cc y 2ml para flask 75cc.
2. Agregar medio para inactivar la acción de la tripsina.
3. Resuspender para levantar las células por 3 veces y finalmente soltar desde una esquina del flask con el fin de evitar aglomeración.
4. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Aspirar el sobrenadante dejando solo el pellet.
6. Agregar al pellet MEDIO SIN suplementar. Resuspender 3 veces.
7. Aproximadamente se puede almacenar 2 viales a partir de un flask de 25 y 3 viales a partir de un flask de 75.
8. Agregar 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich Cod: C6164) en volumen final de 1.5 ml.
9. Mantener flujo de temperatura de: 4°C, -20°C por 2 horas y -80°C *over night*.
10. Finalmente guardar en nitrógeno líquido.

C. DESCONGELACIÓN

Procedimiento:

1. Descongelar en la mano con guantes (hasta que queden algunos trocitos de hielo)
2. Poner las células en un tubo de 15ml cónico y añadir 5ml de medio a 37°C.
3. Centrifugar 5 minutos, 1300 rpm, 37°C.
4. Retirar sobrenadante con ayuda de una pipeta.
5. Añadir al pellet 3 ml de medio y Resuspender varias veces.
6. Verter el contenido en el flask de cultivo (25cm²).
7. Añadir medio: 4 a 5ml para los flask de 25cm² y 10 ml para los de 75cm².
8. Incubar en estufa a 37°C, 5% CO₂.

D. TRIPSINIZACIÓN

Procedimiento:

1. Aspirar el medio de cultivo.
2. Lavar con 5ml de buffer fosfato salino ([PBS], Biowest, cód.: L0615) para eliminar restos de suero que contiene inhibidores de tripsina.
3. Desechar PBS.
4. Incorporar al frasco de cultivo 1 o 2 ml de tripsina según tamaño del flask. Mover horizontalmente por 1 minuto para cubrir toda la superficie.
5. Incubar por 5 minutos a 37° C.
6. Observar bajo el microscopio que, las células se vean redondas, refringentes y en movimiento (señal de que han perdido adherencia).
7. Realizar, si es necesario, pequeños golpes para levantar las células.
8. Agregar 2 a 5ml de medio para inactivar la acción de la tripsina.
9. Resuspender y completar volumen de medio de cultivo.
10. Incubar en estufa a 37°C, 5% CO₂.

ANEXO 2: COMITÉ ÉTICO

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera

RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y GANADERA POR LA QUE SE AUTORIZA A D. MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ UN PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

Examinada la solicitud de autorización de D. Manuel de Miguel Rodríguez, con D.N.I. 28727093R, para la realización de un proyecto de experimentación animal, se han apreciado los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero. Con fecha 09 de Febrero de 2017, D. Manuel de Miguel Rodríguez, en su condición de responsable del proyecto, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación: "Nuevas Terapias Bioactivas Preventivas y Terapéuticas para la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Modelo Animal".

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el informe del Comité Ético, resumen no técnico e informe de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo. La documentación aportada acredita que el interesado tiene la titulación y formación específica para desarrollar proyectos experimentales con animales y cuenta con la capacitación específica para ello.

Tercero. El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como centro usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número ES410910008010.

Cuarto. Con fecha 27 de Enero de 2017, el Comité de Ética del centro emiten un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Quinto. Con fecha 30 de Enero de 2017, Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla, Órgano Habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el procedimiento cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero. El artículo 3.2 del Decreto 133/2005, de 24 de Mayo, por el que se regula la distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca, dispone que corresponde a la segunda "la autorización previa de toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte, prevista en el artículo 7.2 de la Ley".

Por su parte, artículo 13 del Decreto 215/2015, de 14 de Julio, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural prevé:
"Corresponde a la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, además de las funciones establecidas en el artículo 30 de la Ley 9/2007, de 22 de octubre, las siguientes:

i) La ordenación y fomento de la protección y del bienestar animal".



Código:640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGEL OLVERA PORCEL	FECHA	10/03/2017
ID. FIRMA	640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c	PÁGINA	1/3

Segundo. El artículo 7.2 de la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, manifiesta que "toda actividad experimental con animales que pueda causarles dolor, sufrimiento, lesión o muerte requerirá autorización previa de la Consejería competente por razón de la materia y supervisión veterinaria".

Por su parte, el artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable".

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

"1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva".

Tercero. El artículo 15 del RD 53/2013 de 1 de febrero, establece que el órgano competente podrá autorizar que personas que aún no hayan demostrado su total capacitación desempeñen esas funciones de forma temporal y bajo supervisión responsable. El artículo 11.2 de la Orden ECC/556/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, establece que "siempre que, en el caso de la función de realización de los procedimientos, las actuaciones sobre los animales sean un procedimiento clasificado como leve o sin recuperación. Este período provisional no podrá tener una duración superior a seis meses.



Código:640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGEL OLVERA PORCEL	FECHA	10/03/2017
ID. FIRMA	640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c	PAGINA	2/3

Cuarto. El artículo 19.1 del Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales establece:

"Todos los establecimientos cuyo objeto sea la producción, comercialización o uso de animales con fines experimentales, científicos o educativos ubicados en la Comunidad Autónoma de Andalucía, previo al inicio de la actividad, de conformidad con lo establecido en el artículo 7 de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, deberán inscribirse en el Registro Único de Ganadería de Andalucía, en la sección de Explotaciones Ganaderas de Andalucía, de conformidad con el artículo 33 y deberán contar para su inscripción con la autorización prevista en el artículo 36.1 de la Ley 8/2003, de 24 de abril".

Quinto. El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del tipo II, puesto que implica procedimientos clasificados como moderado y no utiliza primates. Además, el centro donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización y la persona encargada de la realización del proyecto tiene capacitación para ello. A ello se une el carácter favorable de los informes emitidos al respecto, por lo que cumpliendo con los requisitos previstos ha de procederse a su autorización y no debe someterse a evaluación retrospectiva.

En consecuencia, de conformidad con los preceptos citados y demás de general aplicación,

RESUELVO

Primero. Autorizar a D. Manuel de Miguel Rodríguez, el proyecto denominado: "Nuevas Terapias Bioactivas Preventivas y Terapéuticas para la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Modelo Animal", con un periodo de 2 años y un máximo de 5 años.

Segundo. Asignar el número 03/03/2017/032, al proyecto a los efectos de cumplir con lo requerido en el art. 41.1 del RD 53/2013 de 1 de febrero y la Decisión 2012/707/UE, sobre la regulación y transmisión de información referente al uso de los animales.

Tercero. Autorizar a D^a. Tamara Ortiz Cerda, a participar con anterioridad a finalizar su total capacitación en el proyecto bajo supervisión responsable, en actuaciones o procedimientos leve o sin recuperación por período no superior a seis meses.

Cuarto. Ordenar la notificación de la presente Resolución a la persona interesada, con indicación de que contra la misma, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponer recurso de alzada ante la Sra. Consejera de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación del presente acto, de conformidad con lo establecido en el artículo 121 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Sevilla, 19 de Enero de 2017
EL DIRECTOR GENERAL DE LA PRODUCCIÓN
AGRICOLA Y GANADERA.

Fdo.: Rafael Olvera Porcel.



Código:640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/			
FIRMADO POR	RAFAEL ANGIEL OLVERA PORCEL	FECHA	10/03/2017
ID. FIRMA	640xu737PFIRMAX6FL8Uj/0z0NXj9c	PÁGINA	3/3

ANEXO 3: ANESTESIA

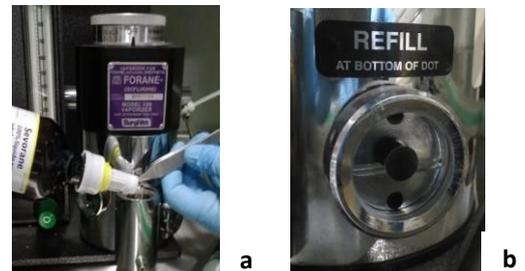
A. ANESTESIA VENTILATORIA

Materiales:

Bombona de oxígeno	Asegurar contenido suficiente de la bombona
Isoflurano	Mantener refrigerado
Vaporizador	Contenido suficiente de Isoflurano y columna de oxígeno
Cámara de anestesia	Asegurar apertura y cierre de las llaves de ingreso
Mascarilla facial	Asegurar apertura y cierre de las llaves de ingreso

Procedimiento:

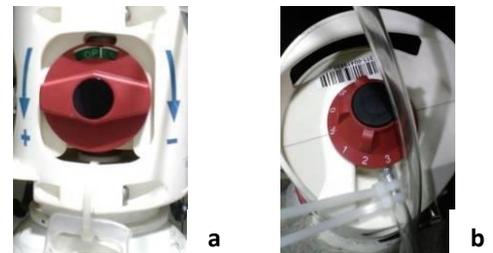
1. Rellenar (**imagen a**) (o comprobar) el nivel de isoflurano en el vaporizador (**imagen b**) y llenarlo en caso necesario. El líquido debe llegar hasta el punto medio del punto negro del dispensador etiquetado como "Refill".



2. Abrir válvulas

2.1 Abrir la válvula general de la bombona de oxígeno como se muestra en la **imagen a**.

2.2 Mantener en nivel 3 la válvula de la bombona de oxígeno como se muestra en la **imagen b**.



3. Fase de Inducción:

3.1 Colocar el animal en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador al 4-5% de isoflurano.

3.2 Regular el flujo de oxígeno a 0.5-1.0 l/min. *Observar que en la columna de Presión de Oxígeno la bolita roja esté en promedio 700.*

3.3 Abrir la llave de entrada a la cámara.

3.4 Cuando el animal pierda la consciencia, cerrar la llave de entrada de la cámara.

3.5 Sacarlo de la cámara y colocarle la mascarilla.

4. Fase de Mantenimiento:

4.1 Regular el vaporizador de anestésico al 2-4%.

4.2 Abrir llave de entrada al tubo con mascarilla facial para asegurar oxígeno al 100%, como se muestra en la siguiente imagen:



Nota: Las dos llaves superiores se encuentran en posición vertical y las dos llaves inferiores se encuentran en posición horizontal.

4.3 Mantener el flujo de oxígeno a 0.5-1.0 l/min. *Observar que en la columna de Presión de Oxígeno la bolita roja esté en promedio 700.*

5. Fase de Recuperación:

5.1 Cerrar llave de entrada al tubo con mascarilla facial.

5.2 Desconectar el vaporizador a 0% y después cerrar válvula de oxígeno.

5.3 Prevención de la hipotermia (principal causa de mortalidad). Mantener en una cama tibia.

6. Duración con la anestesia ventilatoria: 5 minutos.

B. ANESTESIA INTRAPERITONEAL

Materiales:

Anestesia	Ketamina (Ketolar) Valium (diazepam)
Jeringa Insulina	1 ml (Aguja de 25 G x 5/8")

Procedimiento:

1. Pesar a cada animal para la determinación de dosis de anestesia

2. La anestesia consiste en:

Componente	Descripción	Dosis	Presentación
Ketamina	Anestésico antagonista de receptores NMDA	100mg/kg	Ketolar 100mg/ml
			Ketolar 50mg/ml
Diazepam	Potenciador de neurotransmisor GABA	5mg/kg	Valum10, 10mg/2ml

3. Con jeringuilla de insulina de 1 ml tomar 0.2 ml de Diazepam y luego 0.4 ml de Ketolar.

Mezclar bien haciendo subir y bajar una pompa de aire, luego quitar aire.

4. Para cada ratón anestesiar con 60 µl.

5. Poner al ratón en posición decúbito supino.

6. Anestesiar por inyección i.p. al lateral izquierdo respecto a la línea media, inclinándolo levemente cabeza abajo.

7. Duración de la anestesia entre 30 y 45 minutos.

8. Prevención de la hipotermia. Mantener en una cama tibia.

10.- La mezcla de la anestesia en jeringuilla de insulina se guarda a 4º C.

ANEXO 4: PREPARACIÓN DE TNBS

Materiales:

TNBS (Sigma-Aldrich, cód.: 92822)	Mantener en frío. Sacar sólo antes del experimento
EtOH	Etanol 100%
Anestesia	Ketamina (Ketolar) + Valium (diazepam) / Isoflurano
Jeringa insulina	Tamaño 1 ml (27-30-gauge needle)
Sonda o catéter poliuretano	2 mm de grosor

Procedimiento:

1. Para la instilación rectal de TNBS (100 mg/Kg) **en ratones, preparar 2 mg de TNBS/100 µL de etanol al 50%**. Los ratones sólo con etanol al 50% se utilizarán como grupos control.

Preparación TNBS: Densidad: 1.14 g/mL a 20 °C

$$1 \text{ ml} \text{ ---- } 1.14 \text{ g}$$

$$x \text{ ml} \text{ ---- } 0.02 \text{ g}$$

$x = 0.0175 \text{ ml}$ o **17.5 µL del producto (TNBS 1M) en 50 µL H₂O + 50 µL EtOH = 100 µL volumen total** (250 µL para ratas).

2. Conectar jeringa de 1 ml sin aguja a una sonda o catéter de poliuretano (2 mm de grosor).

3. El ratón debe estar en ayuna 18 horas previo al experimento.

4. Introducir suavemente el catéter (humedecido con suero) por vía rectal girándolo sobre sí mismo profundizando aproximadamente 3-4 cm para ratones. *Nota: Si se siente resistencia al insertar el catéter, no continuar ya que esto puede conducir a la perforación de la pared intestinal. Retirar el catéter e intentarlo de nuevo.*

5. Lentamente inyectar 100 µL de TNBS (250 µL para ratas). Después de inyectar el TNBS, colocar el animal cabeza abajo durante 3-4 minutos para evitar pérdida de TNBS.

6. Hidratación posadministración de TNBS. **Opción 1:** Alimentar a los animales durante la primera semana con sales de rehidratación oral (SRO) comercial o preparada en laboratorio: 8% de sacarosa + 0,2% de solución salina (200 mg NaCl + 8 g sacarosa en 100 ml H₂O) para prevenir la deshidratación. **Opción 2:** Administración subcutánea de Ringer Lactato 10ml/kg (20µL en un ratón de peso promedio 20 g) postoperatorio y 24 horas después.

7. Realizar seguimiento diario de peso y signos de deshidratación.

ANEXO 5: TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

A. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)

Introducción: Método que aplica la tinción de: 1) Hematoxilina, colorante básico, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, como i) Núcleos celulares (ADN, ARN); ii) Estructuras citoplasmáticas (ribosoma, RER) y 2) Eosina, colorante ácido, que tiñe componentes básicos en tonos de color rosa, como i) Citoplasma y ii) Fibras de colágeno en tejido conectivo.

Materiales:

Xileno, Alcohol (OH) de 70°, 90°y 100°	
Hematoxilina de Harris	Hematoxilina de Harris de QCA (code: 995960).
Eosina	Eosina Y alcohólica de ANACROM (code:09-209).
Reactivo de Schiff	Schiff's Reagent DC. Panreac (code: 251588.1609)
Ácido Clorhídrico	HCl 37% de PANREAC (code: 141020.1611).
Carbonato de litio	Carbonato de litio de PANREAC (ref. 141391.1209).
Resina EUKITT para montar.	

Procedimiento:

1. Desparafinado (previa incubación a 60°C, 1.5h): 2 x 10 min de Xileno.
2. Hidratación: OH 100° (30 seg.) → OH 100° (30 seg.) → OH 90° (30 seg.) → OH 70° (30 seg.).
3. Agua corriente (30 seg.).
4. Tinción con hematoxilina de Harris (2 min): Sobrecoloración.
5. Lavar con agua hasta que el corte se vea claro.
6. Diferenciar con alcohol-ácido (15 seg.): 2 gotas de HCl 0.1% (10 µl HCl 37% en 50ml H₂O_d) en 200 ml EtOH 70% de la cubeta.
7. Lavar con agua corriente.
8. Azular en carbonato de litio (1% en agua destilada) hasta virar de color.
9. Lavar con agua corriente.
10. Tinción de eosina (2 min).
11. Lavar bien con agua corriente.
12. Deshidratación:
EtOH 90° (30 seg.) → EtOH 90° (30 seg.) → EtOH 100° (30 seg.) → EtOH 100° (30 seg.).
13. Aclaramiento: Xileno (30 seg.) → Xileno (30 seg. o hasta montar).

B. TINCIÓN ÁCIDO PERYÓDICO-REACTIVO DE SCHIFF (PAS)

Introducción: Técnica utilizada para detectar componentes celulares que contienen hidratos de carbono, Por ejemplo: algunas membranas celulares, células caliciformes en la mucosa del intestino, fibras reticulares que están rodeados por hidratos de carbono, etc. El ácido periódico, colorante incoloro, al ponerse en contacto con los grupos aldehídos se torna color rojizo.

Materiales:

Xileno, Alcohol (OH) de 70°, 90°y 100°	
Hematoxilina de Harris	Hematoxilina de Harris de QCA (code: 995960).
Ácido Peryódico	Peyodic acid 1% solution. Bio-Optica (code: 05-M05030)
Reactivo de Schiff	Schiff's Reagent DC. Panreac (code: 251588.1609)

Procedimiento:

1. Desparafinar y rehidratar:
 - Xilol (10min) → Xilol(10min)
 - OH 100° (5min) → OH 100° (5min) → OH 90° (35 pases) → OH 80° (35 pases) → OH 70° (35 pases)
2. Rodear la muestra con un círculo mediante un lápiz de diamante para canalizar y separar la muestra del resto del portaobjeto.
3. Sumergir en una solución de Ácido Peryódico al 0.5% durante 5 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Incubar con el reactivo de Schiff durante 20 minutos.
6. Lavar con agua de grifo durante 5 minutos.
7. Contra-teñir con Hematoxilina de Harris realizando dos inmersiones en Hematoxilina pura.
8. Lavar con agua de grifo durante 5 minutos.
9. Deshidratación:
EtOH 90° (30 seg.) → EtOH 90° (30 seg.) → EtOH 100° (30 seg.) → EtOH 100° (30 seg.)
10. Aclaramiento: Xileno (30 seg.) → Xileno (30 seg. o hasta montar)
11. Montar con DPX y cubreobjetos.

ANEXO 6: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Preparación tampón de lisis para realizar Western blot

A.- Mezclar los siguientes reactivos y completar con H_2O hasta volumen de 20 ml. Para ajustar pH preparar:

Preparación **HCl 37% 5M** en 100ml → 49.2ml HCl + 50.8ml H_2O

Preparación **NaOH 7N** en 100ml → 16.8g de NaOH + H_2O hasta completar 100 ml

Reactivos	Concentración	Cantidad 20ml	Origen
Tris HCl (Applichem cód.:A2264,1000) pH 7.5	50mM	2 ml	500 mM
MgCl ₂	8 mM	0.0326 g	203.31 g/mol
NaCl	250 mM	0.2933 g	58.44 g/mol
EGTA (Sigma Aldrich cód.: 4759-48-2)	5 mM	100 μl	1 M (0.47 g/1ml)
EDTA (Sigma Aldrich cód.:60-00-4)	0.5 mM	100 μl	0.1 M (0.037 g/1ml)
Leupeptina (Sigma Aldrich cód.:L0649)	0.01 mg/ml	200 μl	1 mg/ml
Pepestatina en DMSO (Sigma Aldrich cód.:P4265)	0.01 mg/ml	200 μl	1 mg/ml
Aprotinina (Sigma Aldrich cód.:A1153)	0.01 mg/ml	200 μl	1 mg/ml
PMFS en MeOH (ThermoFisher Cód.:36978)		200 μl	100mM (0.174g/10ml)
B.- Agregar Al momento del lisado			
Triton X-100 (Sigma Aldrich, cód.:T8787)	1% v/v	200 μl	
Inhibidores de fosfatasa II	1% v/v	200 μl	
Inhibidores de fosfatasa II	1% v/v	200 μl	

C.- Guardar o.v a 4°C y conservar a 4°C

D.- Con la rotura celular se liberan enzimas proteasas y fosfatasa que pueden degradar la proteína de interés, por lo que se debe **i)** Evitar excesivos ciclos de congelación /descongelación, **ii)** Trabajar rápido y mantener las **MUESTRAS EN FRÍO** durante todo el proceso.

Procedimiento lisado a partir de tejido:

1. Pesar 100 mg de tejido.
2. Homogeneizar en sonicador con tampón de lisis en eppendorf (dilución para colon 1:3).

Método	Descripción	Tipo de Muestra
Licuadora	La muestra se tritura mediante cuchillas	Gran cantidad de tejido
Homogenizador de ultrasonidos	Ondas de sonido emitidas para romper las membranas celulares. Utilizar ciclo de 0.8 a una amplitud de 60 por 15 segundos x 3 veces	Células, tejidos, bacterias
Pulverización en Nitrógeno Líquido	La muestra se pulveriza utilizando un mortero y una almirez refrigerados	Tejido animal o vegetal

Nota: Recordar mantener siempre las muestras en Frío para minimizar la acción enzimática y por tanto rotura de proteínas de interés.

3. Centrifugar a 12000g por 15 minutos a 4°C (al iniciar el experimento, poner temperatura a centrifuga para lograr esta temperatura).
4. Recoger el sobrenadante y pasarlo a un eppendorf para la posterior cuantificación de proteínas.
5. Almacenar a -80°C.

ANEXO 7: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BRADFORD

Introducción: La cuantificación de proteínas es indispensable ya que permite asegurar la carga de la cantidad correcta de proteínas en el gel y comparar los niveles relativos de la proteína de interés. El método Bradford se basa en el acoplamiento del colorante con la proteína y se determina colorimétricamente, existiendo una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas. Una de las desventajas de este método es la interferencia con SDS u otros detergentes a altas concentraciones.

Procedimiento:

1. Dilución de proteínas. Para tejido colónico se determina una dilución de 1:20.

Volumen final (40µl) = 2 µl de muestra + 38 µl de dH_2O

2. Curva patrón.

2.1 Reactivos:

- Gamma Globulina (Bio-Rad, alicuotada a $-40^{\circ}C$)
- Reactivo A Biorad, cód.: 500-0006) a $4^{\circ}C$

2.2 Diluir un volumen de reactivo A en 4 volúmenes de H_2O_d .

2.3 Usar material de cristal para preparar el reactivo y solo la cantidad necesaria para el ensayo.

Gamma-globulina 0.9994 mg/ml

Patrón (µg/ml)	BSA [g-globulina] mg/ml	µl de g- globulina stock (0.9994)	Volumen (µl)	dH_2O	Volumen reactivo A
P0	2,982	15	0		240
P1	1,988	10	0		245
P2	0,994	5	0		250
P3	0,596	3	2		250
P4	0,198	1	4		250
Blanco	0	0	5		250

3. En una P96 poner la curva patrón **por duplicado** en un volumen final de 250 µl.
4. En la misma placa poner en cada pocillo 5µl de muestra homogeneizada (previa dilución de 1:20 + 250 µl de reactivo A (Reactivo A en cuatro partes de H_2O_d) **por duplicado**.
5. Agitar y esperar por 10 minutos.
6. Leer absorbancia a 595 nm.

7. Obtener la recta patrón y sustituir el valor de “y” por el valor de absorbancia obtenida del promedio de la muestra. El resultado será el valor de “x”, donde “x” será la cantidad de proteínas de la muestra en mg/ml.
8. Promediar diluciones realizadas y dividir en 5 para obtener la cantidad real en 1ul, esto debido a que se utilizaron 5 μ l de muestra y posteriormente multiplicar por 20, ya que fue de dilución realizada para la cuantificación.

ANEXO 8: WESTERN BLOT

A. PREPARACIÓN GEL DE ACRILAMIDA

Introducción: El porcentaje del gel, según la cantidad de acrilamida y bisacrilamida, determina el tamaño del poro. A más porcentaje menos tamaño de poro.

Reactivos	Producto	Preparación
Trizma base	Sigma Aldrich cód.: T6791	12.1 g de trizma base en 50 ml de dH ₂ O ajustado a pH 8.8 o 6.8 y completar a 100 ml
SDS	Sigma Aldrich, cód.: L3731	SDS 20%: 20g de SDS en 100 ml de dH ₂ O
Persulfato de amoniaco (PSA)	PSA ≥98%, Sigma Aldrich, cód.: A3678	PSA 10%:
Acilamida/Bis-Acilamida	Acrylamide-Bis, 30% Sigma Aldrich cód.: A3699	
TEMED	Sigma Aldrich cód: T9281	
Espaciador y Placas de Cristal	Mini PROTEAN© System BIO-RAD	
Soporte para geles	Short Glass plate cód.: 1653308)	

Preparación de geles:

- **GEL DE SEPARACIÓN** (Volúmenes para 1 gel de 10 pocillos)

Porcentaje (%)	10	15
dH ₂ O (ml)	2.76	1.1
TRIS 1ML pH 8.8 (ml)	3.75	3.75
Acil/Bis-Acil (ml)	3.3	5
SDS 20% (μl)	30	50
PSA 10% (μl)	100	100
TEMED (μl)	16.5	16.5

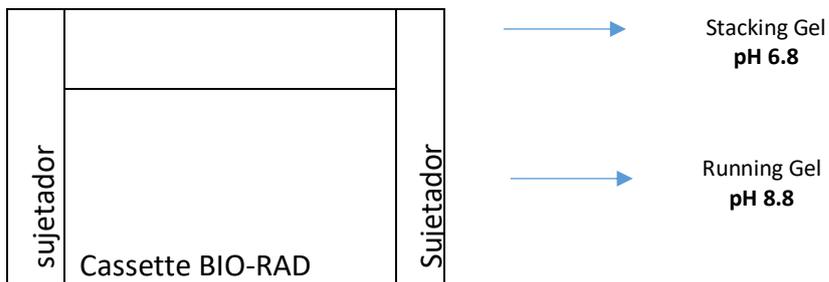
- **GEL STACKING** (Volúmenes para 1 gel de 10 pocillos)

Porcentaje (%)	10	15
dH ₂ O (ml)	2.3	2
TRIS 1ML pH 6.8 (μl)	420	420
Acil/Bis-Acil (μl)	560	840
SDS 20% (μl)	16.6	16.6
PSA 10% (μl)	33.3	33.3
TEMED (μl)	3.3	3.3

Procedimiento:

- 1.- Lavar las placas de cristal y los espaciadores con EtOH y luego con dH₂O.
- 2.- Juntar una placa de cristal pequeña con el espaciador usando la pinza verde. El cristal va por delante del espaciador.
- 3.- Encajar el conjunto en cassette para luego poner en soporte de BIO-RAD sujetando por los costados y por arriba.
- 4.- Añadir la mezcla del GEL DE SEPARACIÓN.

- 5.- Depositar sobre la superficie con cuidado 500µl de butanol.
- 6.- Dejar polimerizar por aproximadamente 15 minutos.
- 7.- Retirar el butanol después de la polimerización del gel de separación y enjuagar con dH₂O y secar con papel Whatman.
- 8.- Añadir el GEL DE CONCENTRACIÓN justo hasta el borde.
- 9.- Colocar el peine y dejar polimerizar.
- 10.- Se puede guardar el gel envuelto en papel mojado en PBS y guardado en una bolsa a 4°C.



B. ELECTROFORESIS

Procedimiento:

1. Mezclar en eppendorf de 500 μ l el volumen de muestra previamente calculado con Laemmly al que se le ha añadido β -Mercaptoetanol (1 μ l por cada 50 μ l de Laemmly 1x).

Preparación Laemmly:

Componentes	Propósito	Cantidad
Tris-HCl pH 6.8	Mantiene pH adecuado.	1.25 ml
SDS	Detergente desnaturizante; se une a la proteína aportando carga negativa de manera que cada una se separe en función del tamaño.	2 ml (10g/100 ml)
Azul de Bromofenol (Sigma Aldrich, cód.: B8026)	Molécula que da color a la muestra para ayudar a la carga; migra por delante de las proteínas, de modo que se puede hacer más fácil el seguimiento de las muestras en el gel.	2 mg
Glicerol (Panreac cód.: 141339)	Aportan Viscosidad/densidad para arrastrar la muestra al fondo del pocillo y evitar que se extienda a los pocillos adyacentes.	1ml
dH ₂ O	Volumen.	10 ml
β -Mercaptoetanol	Agente reductor, evita la oxidación de proteínas. Completa la linealización de la proteína al romper los puentes disulfuros.	1:50

2. Colocar los eppendorfs en el termobloque (MJ Mini BIO-RAD) a 100°C durante 10 minutos para desnaturización de las proteínas y mantener en hielo.
3. **Inicio de electroforesis:** Para la electroforesis utilizar Buffer de electroforesis 1X, a partir de Solución Madre (SM) 10X.

- 30.2g de TRIS BASE + 188g de glicina
- 600 ml de dH₂O. Añadir 50 ml de SDS 20%
- Llevar a volumen total de 1000 ml de dH₂O

3.1 Colocar los cristales (mirando hacia el interior) en la cubeta de electroforesis (marca: Mini-PROTEAN Tetra, BIO-RAD).

3.2 Agregar a la cubeta Buffer de electroforesis 1X y quitar el peine.

3.4 Cargar el primer pocillo con 6 μ l de marcador de peso molecular (Precision plus protein "All Blue" cód.: 161-0337) y 28 μ l de muestras con puntas para gel (marca: Labsen). El volumen máximo de cada pocillo es de 30 μ l.

3.5 Una vez finalizada la carga, el gel se somete a un campo eléctrico generado por una fuente de alimentación. Correr el gel, inicialmente a una corriente de 75V, aumentando paulatinamente hasta alcanzar los 125V (durante app. 1 hora) para asegurar que todas las proteínas alcancen el frente de separación.

C. TRANSFERENCIA DE MEMBRANA

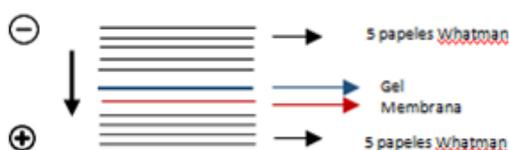
Introducción: La membrana es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo. Los sistemas de transferencia utilizan la generación de un campo eléctrico para conducir las proteínas desde el electrodo negativo al positivo.

Materiales y Reactivos:

Materiales y Reactivos	Descripción y/o Componentes	Cantidad
Papel Whatman (cód.: 10427818)	Se utilizarán para la preparación del sándwich entre membrana y gel para la transferencia	10 unidades x gel Tamaño del gel
Nitrocelulosa	Proporciona poco fondo y NO requiere un pre-tratamiento con MeOH.	1 unidad x gel Tamaño del gel
Sistema de Transferencia Rojo Ponceau (Applichem, cód: 2935,0500)	Trans-Blot® Turbo™ BIO-RAD El colorante Ponceau se utiliza para teñir la membrana y asegurarse de la eficacia de la transferencia.	20 a 40ml

Procedimiento:

- 1.- Cortar papel Whatman y membrana de tamaño adecuado para el gel.
- 2.- Cortar la esquina de la membrana como criterio de orientación y desechar gel.
- 3.-. Previo a la transferencia, tanto el gel como la membrana y papel Whatman se humedecen en buffer de transferencia 1X, a partir de Buffer de transferencia 10X:
 - 100 ml de tampón de electroforesis 10x
 - 250 ml de EtOH 96º
 - Llevar a volumen total de 1000 ml de H₂O_d
- 4.- Preparar el Sándwich (se requiere un estrecho contacto entre el gel y la membrana)



- 5.- Eliminar burbujas de aire entre el gel y la membrana.
- 6.- Ajustar tiempo de transferencia. Aproximadamente entre 30 minutos a 1 hora y ajustar Amperios (A) según tamaño de la membrana (3mA/cm² de membrana).
- 7.- Comprobar la calidad de transferencia tras teñir con Rojo Ponceau.
- 8- Lavar con PBS 1x para retirar el exceso de Rojo Ponceau.

D. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Procedimiento:

1. Bloqueo: Incubar en solución de bloqueo durante 1 ½ hora a temperatura ambiente y en agitador (Pselecta móvil-rod). **Solución de Bloqueo:**

- Albúmina de suero bovino [BSA] Fracción V pH 7 (Applichem panreac, cód.: A1391,0050) al 5%.
- 5 ml de **Solución B:**
 - 5 ml (0.5%) de Nonidet™ P 40 [NP-40] (Sigma Aldrich, cód.: BCBG7424V).
 - PBS 1X pH 7.4.

2. Incubación de anticuerpo (Ac) 1°: Después del proceso de bloqueo, la membrana se incuba con Ac 1° en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente y luego a 4°C *over night* en agitador.

2.1 Retirar el Ac 1°. La disolución con el Ac puede re-utilizarse debiendo guardar a -20°C

2.2 Lavados:

- **1º Lavado** → Solución C x 15 a 20 minutos.

Solución C: 50.38ml de NaCl 5M (29.22g en 100ml de d_4H_2O) + 1000ml de solución B

- **2º Lavado** → Solución B x 15 a 20 minutos.
- **3º Lavado** → PBS 1X x 15 a 20 minutos.

3. Incubación de Ac 2°: Estos anticuerpos están conjugados con **Peroxidasa (HRP)** para su detección por quimioluminiscencia durante 1 ½ hora a temperatura ambiente.

E. Detección

La inmunodetección se realiza mediante un kit de quimioluminiscencia SuperSignal West “Femto” para todas las proteínas y “Pico” para β -actina.

Procedimiento:

1. Escurrir bien las membranas y añadir reactivo super signal en relación 1:1.
2. Colocar la membrana en bandeja del transluminador LAS-3000.
3. Dar una primera exposición y luego una segunda exposición en modalidad semiautomático en sistema de imagen molecular Amersham 600.
4. Guardar imagen para su posterior cuantificación con sistema de imagen (Biophotonics ImageJ v 1.45 (NIH, EEUU).

ANEXO 9: DETERMINACIÓN DE IL-1 β

A. Preparación tampón de lisis para realizar ELISA

Reactivos	Concentración	Cantidad 20ml	Origen
PBS 1X		19.1	
EDTA (Sigma Aldrich cód.:60-00-4)	0.5 mM	100 μ l	0.1 M (0.037 g/1ml)
Leupeptina (Sigma Aldrich cód.:L0649)	0.01 mg/ml	200 μ l	1 mg/ml
Pepestatina en DMSO (Sigma Aldrich cód.:P4265)	0.01 mg/ml	200 μ l	1 mg/ml
Aprotinina (Sigma Aldrich cód.:A1153)	0.01 mg/ml	200 μ l	1 mg/ml
PMFS en MeOH (ThermoFisher Cód.:36978)	1 mM	200 μ l	100mM(0.174g/10ml)

B. Procedimiento lisado a partir de tejido:

1. Pesar 25 mg de tejido.
2. Añadir tampón inhibidor de proteasas en proporción 1:20.
3. Centrifugar a 12000g por 15 minutos a 4°C.
4. Recoger el sobrenadante, pasarlo a un eppendorf y almacenarlo a -80°C.

C. Inicio ensayo ELISA (Murine IL-1 β , PeptoTech cód.: 900-K47)

1. Preparación de la placa (P96)

1.1 Diluir “*capture antibody*” con PBS a una concentración de 2.0 μ g/ml a partir de 200 μ g/ml (200 μ g de antígeno anti-mIL-1 β + 2.5 mg D-manitol).

1.2 Añadir 100 μ l a cada pocillo de la placa (ELISA microplate Nunc MaxiSorp, cód.: 439454).

1.3 Tapar la placa e incubar *over night* a temperatura ambiente.

1.4 Aspirar el líquido y lavar 4 veces usando 300 μ l de “*Wash Buffer*”

- *Wash Buffer*: 0.05% Tweens 20 en PBS 1x.

1.5 Añadir 300 μ l de “*Block Buffer*” a cada pocillo e Incubar por al menos 1 hora a temperatura ambiente.

- *Block Buffer*: 5% BSA en PBS 1x.

2. Preparación del estándar

2.1 Realizar la curva patrón partir de alícuotas de 100 ng/ml.

Patrón (µg/ml)	BSA	Estándar (pg/ml)	Volumen estándar (µl)	Diluent Buffer (µl)	Volumen final (ml)
P1		4000	40	960	1
P2		2000	500 de P1	500	1
P3		1000	500 de P2	500	1
P4		500	500 de P3	500	1
P5		250	500 de P4	500	1
P6		150	500 de P5	500	1
P7		62.5	500 de P6	500	1
Blanco		0	0	100	

- *Diluent Buffer*: 0.05% Tweens 20 (Sigma Aldrich cód.:P-7949) + 0.5% BSA en PBS 1x

2.2 En una placa 96 poner curva patrón por duplicado + muestras (tejido) en una dilución de 1:2 con “*diluent buffer*” en un volumen final de 100 µl. Incubar por al menos 2 horas a temperatura ambiente.

2.3 Aspirar y lavar 4 veces usando 300 µl de “*Wash Buffer*”.

2.4 Diluir “*Detection Antibody*” en “*diluent buffer*” a una concentración de 0.5 µg/ml y añadir 100 µl a cada pocillo. Incubar por al menos 2 horas a temperatura ambiente.

2.5 Aspirar y lavar 4 veces usando 300 µl de “*Wash Buffer*”.

2.6 Diluir 5.5 µl de conjugado Avidina-HRP en proporción de 1:2000 con “*diluent buffer*” para un volumen total de 11ml.

2.7 Añadir 100 µl e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

3. Sustrato ABTS

3.1 Aspirar y lavar 4 veces usando 300 µl de “*Wash Buffer*”

3.2 Añadir 100 µl de sustrato ABTS (Sigma Aldrich cód.: A3219) a cada pocillo

3.3 Incubar a temperatura ambiente hasta que aparezca el color.

4. Monitorizar la aparición del color en el lector de placa a una longitud de onda de 415 nm. Los valores se registran y procesaron en software MPM6.

4.1 La lectura es obtenida cuando el blanco de la curva patrón no excede el valor de 0.2 unidades o el punto de la curva más alto no excede 1.2 unidades.

4.2 La lectura de la placa debe ser monitorizada al menos cada 5 minutos por aproximadamente 40 a 80 minutos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Tian, T., Z. Wang, and J. Zhang, *Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 4535194.
2. Cui, G. and A. Yuan, *A Systematic Review of Epidemiology and Risk Factors Associated With Chinese Inflammatory Bowel Disease*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. **5**: p. 183.
3. M'Koma, A.E., *Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem*. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 2013. **6**: p. 33-47.
4. Weimers, P. and P. Munkholm, *The Natural History of IBD: Lessons Learned*. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2018. **16**(1): p. 101-111.
5. Puig, L., et al., *[Prevalence of ten Immune-mediated inflammatory diseases (IMID) in Spain]*. *Rev Esp Salud Publica*, 2019. **93**.
6. Chaaro Benallal, D., et al., *Evolution of the incidence of inflammatory bowel disease in Southern Spain*. *Rev Esp Enferm Dig*, 2017. **109**(11): p. 757-760.
7. Harbord, M., et al., *The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease*. *J Crohns Colitis*, 2016. **10**(3): p. 239-54.
8. D'Souza, S., et al., *Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(3): p. 367-73.
9. Niewiadomski, O., et al., *Influence of food and lifestyle on the risk of developing inflammatory bowel disease*. *Intern Med J*, 2016. **46**(6): p. 669-76.
10. Devkota, S., et al., *Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*^{-/-} mice*. *Nature*, 2012. **487**(7405): p. 104-8.
11. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
12. Kaplan, G.G. and S.C. Ng, *Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(2): p. 313-321.e2.
13. Lu, Y., et al., *Dietary Polyphenols in the Aetiology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis-A Multicenter European Prospective Cohort Study (EPIC)*. *Inflamm Bowel Dis*, 2017. **23**(12): p. 2072-2082.
14. Moret, I., et al., *Oxidative stress in Crohn's disease*. *Gastroenterología y Hepatología*, 2014. **37**(1): p. 28-34.
15. Pereira, C., et al., *Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(10): p. 2403-17.
16. Burisch, J., *Crohn's disease and ulcerative colitis. Occurrence, course and prognosis during the first year of disease in a European population-based inception cohort*. *Dan Med J*, 2014. **61**(1): p. B4778.
17. Spinelli, A., et al., *Review article: optimal preparation for surgery in Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(9): p. 1009-22.
18. Sairenji, T., K.L. Collins, and D.V. Evans, *An Update on Inflammatory Bowel Disease*. *Prim Care*, 2017. **44**(4): p. 673-692.
19. Kleessen, B., et al., *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*. *Scand J Gastroenterol*, 2002. **37**(9): p. 1034-41.
20. Vrakas, S., et al., *Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0170034.
21. Tibble, J.A., et al., *Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(1): p. 15-22.
22. Feuerstein, J.D., A.C. Moss, and F.A. Farraye, *Ulcerative Colitis*. *Mayo Clin Proc*, 2019. **94**(7): p. 1357-1373.
23. Cheifetz, A.S., *Management of active Crohn disease*. *JAMA*, 2013. **309**(20): p. 2150-2158.

24. Piechota-Polanczyk, A. and J. Fichna, *Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases*. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2014. **387**(7): p. 605-20.
25. Gui, X., et al., *Histopathological Features of Inflammatory Bowel Disease are Associated With Different CD4+ T Cell Subsets in Colonic Mucosal Lamina Propria*. *J Crohns Colitis*, 2018. **12**(12): p. 1448-1458.
26. Odze, R.D., *A contemporary and critical appraisal of 'indeterminate colitis'*. *Mod Pathol*, 2015. **28 Suppl 1**: p. S30-46.
27. Yu, Y.R. and J.R. Rodriguez, *Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes*. *Semin Pediatr Surg*, 2017. **26**(6): p. 349-355.
28. Levine, A., R. Sigall Boneh, and E. Wine, *Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases*. *Gut*, 2018. **67**(9): p. 1726-1738.
29. Patlevic, P., et al., *Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases*. *Integr Med Res*, 2016. **5**(4): p. 250-258.
30. Fatani, A.J., et al., *Carvedilol attenuates inflammatory biomarkers and oxidative stress in a rat model of ulcerative colitis*. *Drug Dev Res*, 2015. **76**(4): p. 204-14.
31. Alzoghaibi, M.A., I.A. Al-Mofleh, and A.M. Al-Jebreen, *Antioxidant activities for superoxide dismutase in patients with Crohn's disease*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2014. **25**(1): p. 59-62.
32. Dubouchaud, H., et al., *Mitochondrial NADH redox potential impacts the reactive oxygen species production of reverse Electron transfer through complex I*. *J Bioenerg Biomembr*, 2018.
33. Bhattacharyya, A., et al., *Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(2): p. 329-54.
34. Kruidenier, L., et al., *Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants*. *J Pathol*, 2003. **201**(1): p. 28-36.
35. Szanto, I., et al., *Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease*. *J Pathol*, 2005. **207**(2): p. 164-76.
36. El Hassani, R.A., et al., *Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **288**(5): p. G933-42.
37. Hausmann, M., et al., *Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(1): p. 48-55.
38. Lam, G., et al., *NADPH oxidases and inflammatory bowel disease*. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(17): p. 2100-9.
39. Ojha, R., et al., *An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout (2011-2015)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2017. **27**(3): p. 311-345.
40. Aviello, G. and U.G. Knaus, *NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract*. *Mucosal Immunol*, 2018. **11**(4): p. 1011-1023.
41. Casas, A.I., et al., *Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **23**(14): p. 1171-85.
42. Brazil, J.C., N.A. Louis, and C.A. Parkos, *The Role of Polymorphonuclear Leukocyte Trafficking in the Perpetuation of Inflammation During Inflammatory Bowel Disease*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2013. **19**(7): p. 1556-1565.
43. Hansberry, D.R., et al., *Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease*. *Cureus*, 2017. **9**(1): p. e1004.
44. Saiki, T., *Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease*. *Kurume Med J*, 1998. **45**(1): p. 69-73.
45. Fitzpatrick, F.A., *Cyclooxygenase enzymes: regulation and function*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(6): p. 577-88.

46. Romero, M., et al., *Evaluation of the immunoexpression of COX-1, COX-2 and p53 in Crohn's disease*. Arq Gastroenterol, 2008. **45**(4): p. 295-300.
47. Andersen, V., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphisms and risk of inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(4): p. 937-46.
48. Biswas, S.K., *Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 5698931.
49. Boehm, D., et al., *Lipid peroxidation markers in Crohn's disease: the associations and diagnostic value*. Clin Chem Lab Med, 2012. **50**(8): p. 1359-66.
50. Barrachina, M.D., J. Panes, and J.V. Esplugues, *Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(1): p. 31-48.
51. Talero, E., et al., *Role of different inflammatory and tumor biomarkers in the development of ulcerative colitis-associated carcinogenesis*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(3): p. 696-710.
52. Islam, B.U., et al., *Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP)*. Indian J Clin Biochem, 2015. **30**(4): p. 368-85.
53. Heydarpour, P., et al., *Behavioral despair associated with a mouse model of Crohn's disease: Role of nitric oxide pathway*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **64**: p. 131-41.
54. Martin, M.C., et al., *Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility*. Immunogenetics, 2007. **59**(11): p. 833-7.
55. Baranipour, S., et al., *Inducible nitric oxide synthase as a potential blood-based biomarker in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2018. **11**(Suppl 1): p. S124-s128.
56. Cardoso, A.R., et al., *Mitochondrial compartmentalization of redox processes*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(11-12): p. 2201-8.
57. Mohammadi, E., et al., *Evaluation of Serum Trace Element Levels and Superoxide Dismutase Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Translating Basic Research into Clinical Application*. Biol Trace Elem Res, 2017. **177**(2): p. 235-240.
58. Kruidenier, L., et al., *Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease*. J Pathol, 2003. **201**(1): p. 7-16.
59. Achitei, D., et al., *Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(5): p. 1244-9.
60. Kruidenier, L., et al., *Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease*. J Pathol, 2003. **201**(1): p. 17-27.
61. Beltran, B., et al., *Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(1): p. 76-86.
62. Iborra, M., et al., *Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(4): p. 1102-6.
63. Townsend, D.M., K.D. Tew, and H. Tapiero, *The importance of glutathione in human disease*. Biomed Pharmacother, 2003. **57**(3-4): p. 145-55.
64. Te Velde, A.A., et al., *Glutathione peroxidase 2 and aquaporin 8 as new markers for colonic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases: an important role for H₂O₂?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(6): p. 555-60.
65. Whittle, B.J. and C. Varga, *New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosaliclates: the role of heme oxygenase*. Pharmacol Rep, 2010. **62**(3): p. 548-56.

66. Loboda, A., et al., *Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(17): p. 3221-47.
67. Avila-Roman, J., et al., *Anti-inflammatory effects of an oxylipin-containing lyophilised biomass from a microalga in a murine recurrent colitis model*. Br J Nutr, 2016. **116**(12): p. 2044-2052.
68. Sabzevary-Ghahfarokhi, M., et al., *The regulatory role of Nrf2 in antioxidants phase2 enzymes and IL-17A expression in patients with ulcerative colitis*. Pathol Res Pract, 2018. **214**(8): p. 1149-1155.
69. Aw, T.Y., *Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 320-8.
70. Takahashi, Y., et al., *Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis*. Oncol Rep, 2007. **18**(3): p. 531-5.
71. Liu, Z., et al., *Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 477.
72. Hossen, I., et al., *Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019: p. 1-25.
73. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. J Nat Prod, 2000. **63**(7): p. 1035-42.
74. Talero, E., et al., *Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer*. Mar Drugs, 2015. **13**(10): p. 6152-209.
75. Abad, C., et al., *Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 961-71.
76. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
77. Zenewicz, L.A., A. Antov, and R.A. Flavell, *CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease*. Trends Mol Med, 2009. **15**(5): p. 199-207.
78. Lo, W.C., et al., *Inflammatory Bowel Disease: How Effective Is TNF-alpha Suppression?* PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0165782.
79. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 457-62.
80. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 55-72.
81. O'Connor, P.M., et al., *Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(8): p. 1411-20.
82. Docena, G., et al., *Down-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase activation and proinflammatory cytokine production by mitogen-activated protein kinase inhibitors in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 108-15.
83. Waetzig, G.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5342-51.
84. Zhang, D., et al., *Vacuolar protein sorting 4B regulates apoptosis of intestinal epithelial cells via p38 MAPK in Crohn's disease*. Exp Mol Pathol, 2015. **98**(1): p. 55-64.
85. Rosillo, M.A., et al., *Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease*. Biochem Pharmacol, 2011. **82**(7): p. 737-45.
86. Atreya, I., R. Atreya, and M.F. Neurath, *NF-kappaB in inflammatory bowel disease*. J Intern Med, 2008. **263**(6): p. 591-6.
87. Klampfer, L., *Cytokines, inflammation and colon cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(4): p. 451-64.
88. Tokuhira, N., et al., *PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review)*. Int J Mol Med, 2015. **35**(1): p. 10-6.

89. Akanda, M.R., et al., *Regulation of JAK2/STAT3 and NF-kappaB signal transduction pathways; Veronica polita alleviates dextran sulfate sodium-induced murine colitis*. Biomed Pharmacother, 2018. **100**: p. 296-303.
90. Cho, M.L., et al., *STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5652-61.
91. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
92. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
93. Zenewicz, L.A., et al., *Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 647-59.
94. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.
95. Parronchi, P., et al., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. Am J Pathol, 1997. **150**(3): p. 823-32.
96. Catalan-Serra, I. and O. Brenna, *Immunotherapy in inflammatory bowel disease: Novel and emerging treatments*. Hum Vaccin Immunother, 2018. **14**(11): p. 2597-2611.
97. Hata, K., et al., *IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(6): p. G1035-44.
98. Takaya, H., et al., *Interleukin-17 stimulates chemokine (interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(2): p. 239-45.
99. Kobayashi, T., et al., *IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2008. **57**(12): p. 1682-9.
100. Elson, C.O., et al., *Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2359-70.
101. Hausmann, M., et al., *Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 1987-2000.
102. Franchimont, D., et al., *Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis*. Gut, 2004. **53**(7): p. 987-92.
103. Vicentini, F.A., et al., *Treatment with Trichilia catigua ethyl-acetate fraction improves healing and reduces oxidative stress in TNBS-induced colitis in rats*. Biomed Pharmacother, 2018. **107**: p. 194-202.
104. Talapka, P., et al., *Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(44): p. 16690-7.
105. Boyer, L., et al., *Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis*. Auton Neurosci, 2005. **117**(1): p. 41-53.
106. Hussain, T., et al., *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7432797.
107. Fialkow, L., Y. Wang, and G.P. Downey, *Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(2): p. 153-64.
108. Wu, Y., et al., *Activation of TLR4 is required for the synergistic induction of dual oxidase 2 and dual oxidase A2 by IFN-gamma and lipopolysaccharide in human pancreatic cancer cell lines*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1859-72.
109. Malanga, D., et al., *The Akt1/IL-6/STAT3 pathway regulates growth of lung tumor initiating cells*. Oncotarget, 2015. **6**(40): p. 42667-86.

110. Li, J., et al., *Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(2): p. 1031-48.
111. Akhter, N., et al., *Oxidative Stress Induces Expression of the Toll-Like Receptors (TLRs) 2 and 4 in the Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Implications for Metabolic Inflammation*. *Cell Physiol Biochem*, 2019. **53**(1): p. 1-18.
112. David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. *Nature*, 2007. **447**(7147): p. 941-50.
113. Iyer, S.S., et al., *Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation*. *Immunity*, 2013. **39**(2): p. 311-323.
114. Yu, J.H. and H. Kim, *Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(46): p. 17324-9.
115. Opipari, A. and L. Franchi, *Role of inflammasomes in intestinal inflammation and Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(1): p. 173-81.
116. Shen, H.H., et al., *NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases*. *Autoimmun Rev*, 2018. **17**(7): p. 694-702.
117. Abais, J.M., et al., *Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?* *Antioxidants & redox signaling*, 2015. **22**(13): p. 1111-1129.
118. Ranson, N., D. Kunde, and R. Eri, *Regulation and Sensing of Inflammasomes and Their Impact on Intestinal Health*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(11).
119. Sutterwala, F.S., et al., *Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1*. *Immunity*, 2006. **24**(3): p. 317-27.
120. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
121. Wang, Y., et al., *Cellular localization of NLRP3 inflammasome*. *Protein Cell*, 2013. **4**(6): p. 425-31.
122. Elliott, E.I. and F.S. Sutterwala, *Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly*. *Immunol Rev*, 2015. **265**(1): p. 35-52.
123. Gong, Z., et al., *Curcumin alleviates DSS-induced colitis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and IL-1beta production*. *Mol Immunol*, 2018. **104**: p. 11-19.
124. Elinav, E., et al., *NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis*. *Cell*, 2011. **145**(5): p. 745-57.
125. Chen, G.Y., et al., *A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis*. *J Immunol*, 2011. **186**(12): p. 7187-94.
126. Wlodarska, M., et al., *NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion*. *Cell*, 2014. **156**(5): p. 1045-59.
127. Zhen, Y. and H. Zhang, *NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 276.
128. Miao, E.A., J.V. Rajan, and A. Aderem, *Caspase-1-induced pyroptotic cell death*. *Immunol Rev*, 2011. **243**(1): p. 206-14.
129. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. *J Immunol*, 2009. **183**(2): p. 787-91.
130. Zhang, X., et al., *Reactive oxygen species-induced TXNIP drives fructose-mediated hepatic inflammation and lipid accumulation through NLRP3 inflammasome activation*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **22**(10): p. 848-70.
131. Zhou, R., et al., *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 136-40.
132. Py, B.F., et al., *Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity*. *Mol Cell*, 2013. **49**(2): p. 331-8.

133. Lopez-Castejon, G., et al., *Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1beta secretion via assembly of the inflammasome*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2721-33.
134. Meissner, F., et al., *Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1570-3.
135. Heid, M.E., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation*. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5230-8.
136. Abais, J.M., et al., *NADPH oxidase-mediated triggering of inflammasome activation in mouse podocytes and glomeruli during hyperhomocysteinemia*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(13): p. 1537-48.
137. Shi, C.S., et al., *Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction*. Nat Immunol, 2012. **13**(3): p. 255-63.
138. Harris, J., et al., *Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9587-97.
139. Shao, B.Z., et al., *Targeting NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Putting out the Fire of Inflammation*. Inflammation, 2019. **42**(4): p. 1147-1159.
140. Uchiyama, R., et al., *Inflammasome and Fas-Mediated IL-1beta Contributes to Th17/Th1 Cell Induction in Pathogenic Bacterial Infection In Vivo*. J Immunol, 2017. **199**(3): p. 1122-1130.
141. Ben-Sasson, S.Z., et al., *IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 7119-24.
142. Jarry, A., et al., *Heterogeneity of subordination of the IL-18/IFN-gamma axis to caspase-1 among patients with Crohn's disease*. Lab Invest, 2015. **95**(10): p. 1207-17.
143. Guimaraes, P.M., et al., *Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(9): p. 824-831.
144. Singh, A.K., R. Misra, and A. Aggarwal, *Th-17 associated cytokines in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis*. Clin Rheumatol, 2011. **30**(6): p. 771-6.
145. Mahida, Y.R., K. Wu, and D.P. Jewell, *Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease*. Gut, 1989. **30**(6): p. 835-8.
146. Lissner, D. and B. Siegmund, *The multifaceted role of the inflammasome in inflammatory bowel diseases*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 1536-47.
147. Villani, A.C., et al., *Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 71-6.
148. Schoultz, I., et al., *Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(5): p. 1180-8.
149. Lazaridis, L.D., et al., *Activation of NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Differences Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. Dig Dis Sci, 2017. **62**(9): p. 2348-2356.
150. Bauer, C., et al., *Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome*. Gut, 2010. **59**(9): p. 1192-9.
151. Mehto, S., et al., *The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy*. Mol Cell, 2019. **73**(3): p. 429-445.e7.
152. Rudolph, K., et al., *Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11**(10): p. 738-46.

153. Hwang, I., et al., *Histone deacetylase 6 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **467**(4): p. 973-978.
154. Yan, Y., et al., *Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1154-63.
155. Zhao, J., et al., *P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(12): p. 3176-85.
156. Deigendesch, N., A. Zychlinsky, and F. Meissner, *Copper Regulates the Canonical NLRP3 Inflammasome*. J Immunol, 2018. **200**(5): p. 1607-1617.
157. Xue, Y., M. Du, and M.J. Zhu, *Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by Escherichia coli O157:H7*. Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 760-769.
158. Antoniou, E., et al., *The TNBS-induced colitis animal model: An overview*. Ann Med Surg (Lond), 2016. **11**: p. 9-15.
159. Mane Almero, J., *[In vivo experimental models of inflammatory bowel disease and colorectal cancer]*. Nutr Hosp, 2007. **22**(2): p. 178-89.
160. Mizoguchi, A., et al., *Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease*. J Pathol, 2016. **238**(2): p. 205-19.
161. Chalifoux, L.V. and R.T. Bronson, *Colonic adenocarcinoma associated with chronic colitis in cotton top marmosets, Saguinus oedipus*. Gastroenterology, 1981. **80**(5 pt 1): p. 942-6.
162. Johnson, L.D., et al., *A prospective study of the epidemiology of colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (Saguinus oedipus)*. Gastroenterology, 1996. **110**(1): p. 102-15.
163. Mizoguchi, A., *Animal models of inflammatory bowel disease*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **105**: p. 263-320.
164. Matharu, K.S., et al., *Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous Helicobacter-dependent colitis in IL-10-deficient mice*. Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1380-90.e1-3.
165. Qiu, J., et al., *Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 386-99.
166. Vijay-Kumar, M., et al., *Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3909-21.
167. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
168. Mizoguchi, A., et al., *Limited CD4 T-cell diversity associated with colitis in T-cell receptor alpha mutant mice requires a T helper 2 environment*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 983-95.
169. Watanabe, M., et al., *Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 389-402.
170. Zhao, F., et al., *Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in Agr2^{-/-} mice*. Dev Biol, 2010. **338**(2): p. 270-9.
171. Esworthy, R.S., et al., *Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(3): p. G848-55.
172. Itoh-Nakadai, A., et al., *The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1171-80.
173. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 767-77.
174. Saitoh, T., et al., *Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 264-8.

175. Poussier, P., et al., *Intestinal inflammation observed in IL-2R/IL-2 mutant mice is associated with impaired intestinal T lymphopoiesis*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(5): p. 880-91.
176. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 171-81.
177. Alonzi, T., et al., *Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis*. *Cytokine*, 2004. **26**(2): p. 45-56.
178. Kajino-Sakamoto, R., et al., *Enterocyte-derived TAK1 signaling prevents epithelium apoptosis and the development of ileitis and colitis*. *J Immunol*, 2008. **181**(2): p. 1143-52.
179. Gao, P., et al., *The Inflammatory Bowel Disease-Associated Autophagy Gene Atg16L1T300A Acts as a Dominant Negative Variant in Mice*. *J Immunol*, 2017. **198**(6): p. 2457-2467.
180. Gerth, A.J., et al., *An innate cell-mediated, murine ulcerative colitis-like syndrome in the absence of nuclear factor of activated T cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(4): p. 1115-21.
181. Weigmann, B., et al., *The transcription factor NFATc2 controls IL-6-dependent T cell activation in experimental colitis*. *J Exp Med*, 2008. **205**(9): p. 2099-110.
182. Kranjc, T., et al., *Functional characterisation of the YIPF protein family in mammalian cells*. *Histochem Cell Biol*, 2017. **147**(4): p. 439-451.
183. Brandl, K., et al., *Yip1 domain family, member 6 (Yipf6) mutation induces spontaneous intestinal inflammation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. 12650-5.
184. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. *Int Immunol*, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
185. Powrie, F., et al., *Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells*. *Immunity*, 1994. **1**(7): p. 553-62.
186. Song-Zhao, G.X. and K.J. Maloy, *Experimental mouse models of T cell-dependent inflammatory bowel disease*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1193**: p. 199-211.
187. Eden, K., *Adoptive Transfer Colitis*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1960**: p. 207-214.
188. Gadaleta, R.M., O. Garcia-Irigoyen, and A. Moschetta, *Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD)*. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2017. **7**(1): p. 13-28.
189. Colombo, B.B., et al., *Vinpocetine Ameliorates Acetic Acid-Induced Colitis by Inhibiting NF-kappaB Activation in Mice*. *Inflammation*, 2018. **41**(4): p. 1276-1289.
190. Chamanara, M., et al., *Thymol reduces acetic acid-induced inflammatory response through inhibition of NF-kB signaling pathway in rat colon tissue*. *Inflammopharmacology*, 2019.
191. Dodda, D., R. Chhajed, and J. Mishra, *Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: possible morphological and biochemical alterations*. *Pharmacol Rep*, 2014. **66**(1): p. 169-73.
192. Almeer, R.S., et al., *Ziziphus spina-christi fruit extract suppresses oxidative stress and p38 MAPK expression in ulcerative colitis in rats via induction of Nrf2 and HO-1 expression*. *Food Chem Toxicol*, 2018. **115**: p. 49-62.
193. Martino, J.V., J. Van Limbergen, and L.E. Cahill, *The Role of Carrageenan and Carboxymethylcellulose in the Development of Intestinal Inflammation*. *Front Pediatr*, 2017. **5**: p. 96.
194. Moyana, T. and J.M. Lalonde, *Carrageenan-induced intestinal injury: possible role of oxygen free radicals*. *Ann Clin Lab Sci*, 1991. **21**(4): p. 258-63.
195. Fath, R.B., Jr., et al., *Degraded carrageenan-induced colitis in CF1 mice. A clinical, histopathological and kinetic analysis*. *Digestion*, 1984. **29**(4): p. 197-203.

196. Muniyaka, P.M., et al., *Carrageenan Gum and Adherent Invasive Escherichia coli in a Piglet Model of Inflammatory Bowel Disease: Impact on Intestinal Mucosa-associated Microbiota*. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 462.
197. Chassaing, B., et al., *Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome*. *Nature*, 2015. **519**(7541): p. 92-6.
198. Basivireddy, J., et al., *Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(4): p. 683-95.
199. Tawfik, D.I., et al., *Evaluation of therapeutic effect of low dose naltrexone in experimentally-induced Crohn's disease in rats*. *Neuropeptides*, 2016. **59**: p. 39-45.
200. Simon, H., et al., *Effects of Mesalazine on Morphological and Functional Changes in the Indomethacin-Induced Inflammatory Bowel Disease (Rat Model of Crohn's Disease)*. *Pathol Oncol Res*, 2017. **23**(1): p. 41-46.
201. Stadnicki, A., et al., *Kallikrein-kininogen system activation and bradykinin (B2) receptors in indomethacin induced enterocolitis in genetically susceptible Lewis rats*. *Gut*, 1998. **43**(3): p. 365-74.
202. Nagarjun, S., et al., *Ameliorative effect of chromium-d-phenylalanine complex on indomethacin-induced inflammatory bowel disease in rats*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **89**: p. 1061-1066.
203. Kojima, R., et al., *Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis*. *J Pharmacol Sci*, 2004. **96**(3): p. 307-13.
204. Nolte, T., et al., *Oxazolone and ethanol induce colitis in non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2Rgamma(null) mice engrafted with human peripheral blood mononuclear cells*. *Clin Exp Immunol*, 2013. **172**(2): p. 349-62.
205. Kitajima, S., S. Takuma, and M. Morimoto, *Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights*. *Exp Anim*, 2000. **49**(1): p. 9-15.
206. Manicassamy, S. and I. Manoharan, *Mouse models of acute and chronic colitis*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1194**: p. 437-48.
207. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
208. Morampudi, V., et al., *DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat*. *J Vis Exp*, 2014(84): p. e51297.
209. Kawada, M., A. Arihiro, and E. Mizoguchi, *Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(42): p. 5581-93.
210. Bouma, G., A. Kaushiva, and W. Strober, *Experimental murine colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(2): p. 554-65.
211. Oh, S.Y., et al., *Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease*. *Int J Mol Med*, 2014. **33**(2): p. 333-40.
212. Han, Y., et al., *Cortical Inflammation is Increased in a DSS-Induced Colitis Mouse Model*. *Neurosci Bull*, 2018. **34**(6): p. 1058-1066.
213. Chen, W., et al., *Is dextran sulfate sodium a good inducer of acute experimental enteritis?* *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019. **33**: p. 2058738419843367.
214. Babickova, J., et al., *Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens*. *Inflammation*, 2015. **38**(5): p. 1996-2006.
215. Siczek, K., et al., *Evaluation of anti-inflammatory effect of silver-coated glass beads in mice with experimentally induced colitis as a new type of treatment in inflammatory bowel disease*. *Pharmacol Rep*, 2017. **69**(3): p. 386-392.
216. Bang, B. and L.M. Lichtenberger, *Methods of Inducing Inflammatory Bowel Disease in Mice*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2016. **72**: p. 5.58.1-42.

217. Liu, T.J., et al., *AT1R blocker losartan attenuates intestinal epithelial cell apoptosis in a mouse model of Crohn's disease*. Mol Med Rep, 2016. **13**(2): p. 1156-62.
218. Buljevic, S., et al., *The effect of CD26-deficiency on dipeptidyl peptidase 8 and 9 expression profiles in a mouse model of Crohn's disease*. J Cell Biochem, 2018. **119**(8): p. 6743-6755.
219. Elson, C.O., et al., *Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2174-85.
220. Xu, C.L., et al., *Recombinant expressed vasoactive intestinal peptide analogue ameliorates TNBS-induced colitis in rats*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(6): p. 706-715.
221. Du, X., et al., *Therapeutic efficacy of carboxyamidotriazole on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis model is associated with the inhibition of NLRP3 inflammasome and NF-kappaB activation*. Int Immunopharmacol, 2017. **45**: p. 16-25.
222. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
223. Appleyard, C.B. and J.L. Wallace, *Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 1): p. G119-25.
224. McCormack, G., et al., *Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease*. Inflamm Res, 2001. **50**(10): p. 491-5.
225. Karaboga, I., S. Demirtas, and T. Karaca, *Investigation of the relationship between the Th17/IL-23 pathway and innate-adaptive immune system in TNBS-induced colitis in rats*. Iran J Basic Med Sci, 2017. **20**(8): p. 870-879.
226. Zhou, J., et al., *BLT1 in dendritic cells promotes Th1/Th17 differentiation and its deficiency ameliorates TNBS-induced colitis*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(12): p. 1047-1056.
227. Barrett, J.C., et al., *Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 955-62.
228. Shalom-Barak, T., J. Quach, and M. Lotz, *Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27467-73.
229. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
230. Lopes de Oliveira, G.A., et al., *Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats is associated with inflammatory mediators inhibition and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways*. Chem Biol Interact, 2019. **297**: p. 25-33.
231. Vendramini-Costa, D.B., et al., *Goniothalamin prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line*. Toxicol Appl Pharmacol, 2016. **300**: p. 1-12.
232. Mijan, M.A. and B.O. Lim, *Diets, functional foods, and nutraceuticals as alternative therapies for inflammatory bowel disease: Present status and future trends*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(25): p. 2673-2685.
233. Kolios, G., *Animal models of inflammatory bowel disease: how useful are they really?* Curr Opin Gastroenterol, 2016. **32**(4): p. 251-7.
234. Salvador, P., et al., *CD16+ Macrophages Mediate Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease*. J Crohns Colitis, 2018. **12**(5): p. 589-599.
235. Hemperly, A., W.J. Sandborn, and N. Vande Casteele, *Clinical Pharmacology in Adult and Pediatric Inflammatory Bowel Disease*. Inflamm Bowel Dis, 2018. **24**(12): p. 2527-2542.
236. Campregher, C. and C. Gasche, *Aminosalicylates*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(4-5): p. 535-46.
237. Allgayer, H., et al., *Superoxide, hydroxyl and fatty acid radical scavenging by aminosalicylates. Direct evaluation with electron spin resonance spectroscopy*. Biochem Pharmacol, 1992. **43**(2): p. 259-62.

238. Kaiser, G.C., F. Yan, and D.B. Polk, *Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(3): p. 602-9.
239. Rousseaux, C., et al., *The 5-aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPARgamma*. *Carcinogenesis*, 2013. **34**(11): p. 2580-6.
240. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
241. De Cassan, C., G. Fiorino, and S. Danese, *Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: more effective and less side effects?* *Dig Dis*, 2012. **30**(4): p. 368-75.
242. De Iudicibus, S., et al., *Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(9): p. 1095-108.
243. Makitalo, L., et al., *Serum MMPs 7-9 and their inhibitors during glucocorticoid and anti-TNF-alpha therapy in pediatric inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2012. **47**(7): p. 785-94.
244. Bermejo, F., et al., *Recomendaciones del Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU) sobre el uso de tiopurinas en la enfermedad inflamatoria intestinal*. *Gastroenterología y Hepatología*, 2018. **41**(3): p. 205-221.
245. Mantzaris, G.J., *Thiopurines and Methotrexate Use in IBD Patients in a Biologic Era*. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2017. **15**(1): p. 84-104.
246. Naganuma, M., T. Fujii, and M. Watanabe, *The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease*. *J Gastroenterol*, 2011. **46**(2): p. 129-37.
247. Lee, S.J., J. Chinen, and A. Kavanaugh, *Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S314-23.
248. Billiet, T., et al., *Targeting TNF-alpha for the treatment of inflammatory bowel disease*. *Expert Opin Biol Ther*, 2014. **14**(1): p. 75-101.
249. Doherty, G., et al., *European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Treatment Withdrawal ['Exit Strategies'] in Inflammatory Bowel Disease*. *J Crohns Colitis*, 2018. **12**(1): p. 17-31.
250. Arijs, I., et al., *Mucosal gene expression of cell adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors in patients with inflammatory bowel disease before and after infliximab treatment*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 748-61.
251. Li, Z., et al., *Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(8): p. 1299-310.
252. Williams, J.G., et al., *Infliximab versus ciclosporin for steroid-resistant acute severe ulcerative colitis (CONSTRUCT): a mixed methods, open-label, pragmatic randomised trial*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016. **1**(1): p. 15-24.
253. Sands, B.E., et al., *Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(10): p. 912-20.
254. Sandborn, W.J., et al., *Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(2): p. 257-65.e1-3.
255. Burmester, G.R., et al., *Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease*. *Ann Rheum Dis*, 2013. **72**(4): p. 517-24.
256. Sandborn, W.J., et al., *Long-term safety and efficacy of certolizumab pegol in the treatment of Crohn's disease: 7-year results from the PRECISE 3 study*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(8): p. 903-16.

257. Sandborn, W.J., et al., *Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(1): p. 85-95; quiz e14-5.
258. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
259. Baran, P., et al., *The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6.sIL-6R.sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(18): p. 6762-6775.
260. Danese, S., et al., *Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II)*. *Gut*, 2019. **68**(1): p. 40-48.
261. Kang, S., T. Tanaka, and T. Kishimoto, *Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody*. *Int Immunol*, 2015. **27**(1): p. 21-9.
262. Langrish, C.L., et al., *IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity*. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 96-105.
263. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD*. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1333-6.
264. Sandborn, W.J., et al., *Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(16): p. 1519-28.
265. Feagan, B.G., et al., *Risankizumab in patients with moderate to severe Crohn's disease: an open-label extension study*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018. **3**(10): p. 671-680.
266. O'Shea, J.J. and R. Plenge, *JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease*. *Immunity*, 2012. **36**(4): p. 542-50.
267. Dai, C., M. Jiang, and M.J. Sun, *Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis*, in *N Engl J Med*. 2017: United States. p. 496.
268. Vermeire, S., et al., *Clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's disease treated with filgotinib (the FITZROY study): results from a phase 2, double-blind, randomised, placebo-controlled trial*. *Lancet*, 2017. **389**(10066): p. 266-275.
269. Monteleone, G., et al., *Impact of patient characteristics on the clinical efficacy of mongersen (GED-0301), an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in active Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016. **43**(6): p. 717-24.
270. Zundler, S., et al., *Anti-Adhesion Therapies in Inflammatory Bowel Disease-Molecular and Clinical Aspects*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 891.
271. Yajnik, V., et al., *Efficacy and Safety of Vedolizumab in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Patients Stratified by Age*. *Adv Ther*, 2017. **34**(2): p. 542-559.
272. Nielsen, O.H., et al., *Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Inflammatory Bowel Disease*. *Trends Mol Med*, 2017. **23**(4): p. 362-374.
273. Sandborn, W.J., et al., *Ozanimod Induction and Maintenance Treatment for Ulcerative Colitis*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(18): p. 1754-62.
274. Cicero, A.F.G. and A. Colletti, *An update on the safety of nutraceuticals and effects on lipid parameters*. *Expert Opin Drug Saf*, 2018. **17**(3): p. 303-313.
275. Abraham, B.P. and E.M.M. Quigley, *Probiotics in Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2017. **46**(4): p. 769-782.
276. Volpe, R. and G. Sotis, *Nutraceuticals: Definition and Epidemiological Rationale for Their Use in Clinical Practice*. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2015. **22**(3): p. 199-201.
277. Singla, R.K., et al., *Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures*. *J AOAC Int*, 2019.
278. Chang, S.K., C. Alasalvar, and F. Shahidi, *Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - A comprehensive review*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019. **59**(10): p. 1580-1604.
279. Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. *Nat Prod Rep*, 2009. **26**(8): p. 1001-43.

280. Han, X., T. Shen, and H. Lou, *Dietary Polyphenols and Their Biological Significance*. International Journal of Molecular Sciences, 2007. **8**(9).
281. Chung, K.T., et al., *Tannins and human health: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1998. **38**(6): p. 421-64.
282. Vendrame, S. and D. Klimis-Zacas, *Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling cascades*. Nutr Rev, 2015. **73**(6): p. 348-58.
283. Zhou, Y., et al., *Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer*. Nutrients, 2016. **8**(8).
284. Tikkanen, M.J. and H. Adlercreutz, *Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention?* Biochem Pharmacol, 2000. **60**(1): p. 1-5.
285. Afrin, S., et al., *Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment*. Molecules, 2016. **21**(2): p. 169.
286. Ndhala, A.R., M. Moyo, and J. Van Staden, *Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?* Molecules, 2010. **15**(10): p. 6905-30.
287. Carlsen, M.H., et al., *The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide*. Nutr J, 2010. **9**: p. 3.
288. Brand-Williams W. , C.M. E., and B. C., *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. LWT-Food Science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
289. Hwang, S.J., et al., *Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea*. Food Chem, 2014. **146**: p. 71-7.
290. Speisky, H., et al., *First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south Andes region of South America*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(36): p. 8851-9.
291. Guo, D.J., et al., *Antioxidative activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs*. Inflammopharmacology, 2008. **16**(5): p. 201-7.
292. Hatamnia, A.A., N. Abbaspour, and R. Darvishzadeh, *Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits*. Food Chem, 2014. **145**: p. 306-11.
293. Henriquez, C., et al., *Time-dependence of ferric reducing antioxidant power (FRAP) index in Chilean apples and berries*. Arch Latinoam Nutr, 2011. **61**(3): p. 323-32.
294. Céspedes, C.L., et al., *Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui*. Food Chemistry, 2008. **107**(2): p. 820-829.
295. Slatnar, A., et al., *The effect of bioactive compounds on in vitro and in vivo antioxidant activity of different berry juices*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47880.
296. Junqueira-Goncalves, M.P., et al., *Isolation and characterization of phenolic compounds and anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of antioxidant and antibacterial activity*. Molecules, 2015. **20**(4): p. 5698-713.
297. Wu, X., et al., *Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(26): p. 7846-56.
298. Li, C., et al., *Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(3): p. 523-31.
299. Fredes, C., et al., *Polyphenol content and antioxidant activity of Maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stuntz) during fruit development and maturation in central Chile*. Journal of Agricultural Research, 2012. **72**(4): p. 582-589.
300. Ahmadi, A. and A. Shadboorestan, *Oxidative Stress and Cancer; The Role of Hesperidin, a Citrus Natural Bioflavonoid, as a Cancer Chemoprotective Agent*. Nutr Cancer, 2015: p. 1-12.

301. Ziech, D., et al., *The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development*. Chem Biol Interact, 2010. **188**(2): p. 334-9.
302. Rommer, P.S., et al., *Lowered Levels of Carbonyl Proteins after Vitamin B Supplementation in Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease*. Neurodegener Dis, 2015.
303. Maiese, K., *New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 875961.
304. Vassalle, C., et al., *Elevated levels of oxidative stress as a prognostic predictor of major adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. J Atheroscler Thromb, 2012. **19**(8): p. 712-7.
305. Yahfoufi, N., et al., *The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols*. Nutrients, 2018. **10**(11).
306. Chalons, P., et al., *Study of Potential Anti-Inflammatory Effects of Red Wine Extract and Resveratrol through a Modulation of Interleukin-1-Beta in Macrophages*. Nutrients, 2018. **10**(12).
307. Zhao, W., et al., *Resveratrol Suppresses Gut-Derived NLRP3 Inflammasome Partly through Stabilizing Mast Cells in a Rat Model*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 6158671.
308. Forbes-Hernandez, T.Y., et al., *The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015: p. 0.
309. Cheng, A., et al., *Extractable and non-extractable polyphenols from blueberries modulate LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in RAW264.7 macrophages via the NF-kappaB signalling pathway*. J Sci Food Agric, 2016. **96**(10): p. 3393-400.
310. Neto, C.C., *Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 652-64.
311. Luis, A., F. Domingues, and L. Pereira, *Can Cranberries Contribute to Reduce the Incidence of Urinary Tract Infections? A Systematic Review with Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis of Clinical Trials*. J Urol, 2017. **198**(3): p. 614-621.
312. Wang, S.Y. and H. Jiao, *Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(11): p. 5677-84.
313. Nunes, C., et al., *Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways*. Toxicol Res (Camb), 2016. **5**(1): p. 53-65.
314. Hwang, Y.P., et al., *Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression*. Food Chem Toxicol, 2011. **49**(1): p. 93-9.
315. Davinelli, S., et al., *A Randomized Clinical Trial Evaluating the Efficacy of an Anthocyanin-Maqui Berry Extract (Delphinol(R)) on Oxidative Stress Biomarkers*. J Am Coll Nutr, 2015. **34 Suppl 1**: p. 28-33.
316. Wang, L.S., et al., *Dietary black raspberries modulate DNA methylation in dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis*. Carcinogenesis, 2013. **34**(12): p. 2842-50.
317. Seeram, N.P., et al., *Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(25): p. 9329-39.
318. Wu, Q.K., et al., *Berry phenolic extracts modulate the expression of p21(WAF1) and Bax but not Bcl-2 in HT-29 colon cancer cells*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(4): p. 1156-63.
319. Soares, J.C., et al., *Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity*. Food Chem, 2019. **281**: p. 178-188.

320. Ma, C., et al., *Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF-kappaB and JAK/STAT signaling pathways*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015. **47**(3): p. 207-13.
321. Liu, C.J. and J.Y. Lin, *Anti-inflammatory effects of phenolic extracts from strawberry and mulberry fruits on cytokine secretion profiles using mouse primary splenocytes and peritoneal macrophages*. Int Immunopharmacol, 2013. **16**(2): p. 165-70.
322. Rahimifard, M., et al., *Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation*. Ageing Res Rev, 2017. **36**: p. 11-19.
323. Ghattamaneni, N.K.R., S.K. Panchal, and L. Brown, *Nutraceuticals in rodent models as potential treatments for human Inflammatory Bowel Disease*. Pharmacol Res, 2018. **132**: p. 99-107.
324. Khan, I., S.E. Samson, and A.K. Grover, *Antioxidant Supplements and Gastrointestinal Diseases: A Critical Appraisal*. Med Princ Pract, 2017. **26**(3): p. 201-217.
325. Villegas, I., et al., *A new flavonoid derivative, dosmalfate, attenuates the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(13-14): p. 1731-41.
326. Scarano, A., et al., *Combined Dietary Anthocyanins, Flavonols, and Stilbenoids Alleviate Inflammatory Bowel Disease Symptoms in Mice*. Front Nutr, 2017. **4**: p. 75.
327. Biedermann, L., et al., *Bilberry ingestion improves disease activity in mild to moderate ulcerative colitis - an open pilot study*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(4): p. 271-9.
328. Samsami-Kor, M., et al., *Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study*. Arch Med Res, 2015. **46**(4): p. 280-5.
329. Kolacek, M., et al., *Effect of natural polyphenols (Pycnogenol) on oxidative stress markers in children suffering from Crohn's disease--a pilot study*. Free Radic Res, 2013. **47**(8): p. 624-34.
330. Dolara, P., et al., *Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats*. Mutat Res, 2005. **591**(1-2): p. 237-46.
331. Wang, D., et al., *Green tea polyphenols prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation*. Food Funct, 2019.
332. Liu, S., et al., *Targeting heme oxygenase-1 by quercetin ameliorates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation*. Food Funct, 2018. **9**(8): p. 4184-4193.
333. Li, Y., et al., *Pharmacological Effects and Mechanisms of Chinese Medicines Modulating NLRP3 Inflammasomes in Ischemic Cardio/Cerebral Vascular Disease*. Am J Chin Med, 2018. **46**(8): p. 1727-1741.
334. Deguchi, Y., et al., *Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(11): p. 2993-8.
335. Radulovic, K., et al., *A dietary flavone confers communicable protection against colitis through NLRP6 signaling independently of inflammasome activation*. Mucosal Immunol, 2018. **11**(3): p. 811-819.
336. Zhou, M., et al., *New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 8201672.
337. Holleran, G., et al., *Gut microbiota and inflammatory bowel disease: so far so gut!* Minerva Gastroenterol Dietol, 2017. **63**(4): p. 373-384.
338. Schreckinger, M.E., et al., *Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization*. J Med Food, 2010. **13**(2): p. 233-46.
339. Alonso, J.R., *Maqui (Aristotelia chilensis): a Chilean nutraceutical of medicinal relevance*. Revista de Farmacología de Chile, 2012. **5**(2): p. 95-100.

340. Muñoz S, M., E. Barrera M, and I. Meza P, *El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile*. 1981, Santiago de Chile: Museo Nacional de Historia Natural.
341. Céspedes, C., et al., *Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui*. Food Chemistry, 2008. **107**: p. 820-829.
342. Cespedes, C.L., et al., *The Chilean superfruit black-berry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui as mediator in inflammation-associated disorders*. Food Chem Toxicol, 2017. **108**(Pt B): p. 438-450.
343. Brauch, J.E., et al., *Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice*. Food Chem, 2016. **190**: p. 308-16.
344. Miranda-Rottmann, S., et al., *Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(26): p. 7542-7.
345. Genskowsky, E., et al., *Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) a Chilean blackberry*. J Sci Food Agric, 2016.
346. Brauch, J.E., et al., *Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSn and NMR-spectroscopy*. Journal of Food Composition and Analysis, 2017. **58**: p. 16-22.
347. Escribano-Bailon, M.T., et al., *Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz)*. Phytochem Anal, 2006. **17**(1): p. 8-14.
348. Reyes-Farias, M., et al., *Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages*. J Med Food, 2015. **18**(5): p. 601-8.
349. Cifuentes, F., et al., *8-Oxo-9-Dihydromakomakine Isolated from *Aristotelia chilensis* Induces Vasodilation in Rat Aorta: Role of the Extracellular Calcium Influx*. Molecules, 2018. **23**(11).
350. Claudia, D.P., et al., *Phenolic Compounds in Organic and Aqueous Extracts from *Acacia farnesiana* Pods Analyzed by ULPS-ESI-Q-oo/TOF-MS. In Vitro Antioxidant Activity and Anti-Inflammatory Response in CD-1 Mice*. Molecules, 2018. **23**(9).
351. Fuentealba, J., et al., *Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid-beta peptide are prevented by *Aristotelia chilensis* enriched extract*. J Alzheimers Dis, 2012. **31**(4): p. 879-89.
352. Burisch, J., et al., *The burden of inflammatory bowel disease in Europe*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(4): p. 322-37.
353. Zhu, H. and Y.R. Li, *Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence*. Exp Biol Med (Maywood), 2012. **237**(5): p. 474-80.
354. Schon, C., et al., *Bioavailability Study of Maqui Berry Extract in Healthy Subjects*. Nutrients, 2018. **10**(11).
355. Matic, P., M. Sabljic, and L. Jakobek, *Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content*. J AOAC Int, 2017.
356. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
357. Aldini, G., et al., *N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why*. Free Radic Res, 2018. **52**(7): p. 751-762.
358. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
359. Gommeaux, J., et al., *Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2215-28.

360. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
361. Billmeier, U., et al., *Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(42): p. 9300-9313.
362. Bryant, R.V., O. Brain, and S.P. Travis, *Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2015. **50**(1): p. 90-112.
363. Munoz, O., et al., *Chemical study and anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the leaves of *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz, Elaeocarpaceae*. *J Pharm Pharmacol*, 2011. **63**(6): p. 849-59.
364. Wijeratne, S.S., S.L. Cuppett, and V. Schlegel, *Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(22): p. 8768-74.
365. Yi, W., et al., *Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(18): p. 7320-9.
366. Qu, T., et al., *5-Aminosalicylic acid inhibits inflammatory responses by suppressing JNK and p38 activity in murine macrophages*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2017. **39**(1): p. 45-53.
367. Park, J.Y., et al., *Herbal formula SC-E1 suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway in RAW 264.7 macrophages*. *BMC Complement Altern Med*, 2017. **17**(1): p. 374.
368. Lucas-Gonzalez, R., et al., *Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berry (*Aristolelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion*. *Industrial Crops and Products*, 2016. **94**: p. 774-782.
369. Moret, I., et al., *[Oxidative stress in Crohn's disease]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2014. **37**(1): p. 28-34.
370. Schmidt, H.H., et al., *Antioxidants in Translational Medicine*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **23**(14): p. 1130-43.
371. Chen, C., et al., *Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death*. *Arch Pharm Res*, 2000. **23**(6): p. 605-12.
372. Hanasaki, Y., S. Ogawa, and S. Fukui, *The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids*. *Free Radic Biol Med*, 1994. **16**(6): p. 845-50.
373. Impellizzeri, D., et al., *Protective effect of polyphenols in an inflammatory process associated with experimental pulmonary fibrosis in mice*. *Br J Nutr*, 2015. **114**(6): p. 853-65.
374. Martin, A.R., et al., *Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **67**(7): p. 1399-410.
375. Fann, D.Y., et al., *Evidence that NF-kappaB and MAPK Signaling Promotes NLRP Inflammasome Activation in Neurons Following Ischemic Stroke*. *Mol Neurobiol*, 2018. **55**(2): p. 1082-1096.
376. Gao, Z., et al., *Targeting HO-1 by Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Contrast-Induced Renal Injury via Anti-Oxidative Stress and Anti-Inflammation Pathways*. *PLoS One*, 2016. **11**(2): p. e0149032.
377. Hito, S., J. Tanaka, and H. Shimoda, *MaquiBright standardized maqui berry extract significantly increases tear fluid production and ameliorates dry eye-related symptoms in a clinical pilot trial*. *Panminerva Med*, 2014. **56**(3 Suppl 1): p. 1-6.
378. Alvarado, J.L., et al., *Delphinidin-Rich Maqui Berry Extract (Delphinol(R)) Lowers Fasting and Postprandial Glycemia and Insulinemia in Prediabetic Individuals during Oral Glucose Tolerance Tests*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 9070537.

379. Watson, R.R. and F. Schonlau, *Nutraceutical and antioxidant effects of a delphinidin-rich maqui berry extract Delphinol(R): a review*. *Minerva Cardioangiologica*, 2015. **63**(2 Suppl 1): p. 1-12.