



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN POR  
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *H. polyrhizus*  
Y METABOLITOS ENDÓGENOS:  
RELEVANCIA EN LA ENFERMEDAD DE  
CROHN**

Tesis doctoral

Dulce Carolina Macias Ceja

Directores:

M<sup>a</sup> Dolores Barrachina Sancho

M<sup>a</sup> Dolores Ortiz Masia

Valencia, 2018



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA**  
**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

**Dra. M<sup>a</sup> Dolores Barrachina Sancho**, Catedrática de la Universidad de Valencia y la  
**Dra. M<sup>a</sup> Dolores Ortiz Masià**, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad de  
Valencia,

Certifican:

Que el trabajo titulado “Modulación de la inflamación por compuestos bioactivos de *H. polyrhizus* y metabolitos endógenos: Relevancia de la enfermedad de Crohn”, presentado por la Licenciada en Biología **Dulce Carolina Macias Ceja**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 28 septiembre de 2018.

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Dolores Barrachina Sancho

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Dolores Ortiz Masià



Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de las siguientes becas y proyectos:

- Beca del programa de formación del profesorado por la Universidad de Colima, Colima, México. Periodo febrero 2013-diciembre 2018.
- “Modulación de la autofagia epitelial por los macrófagos: relevancia en la reparación mucosa en la enfermedad inflamatoria intestinal”. IP: M<sup>a</sup> Dolores Barrachina Sancho y Sara Calatayud Romero. SAF2013-43441-P. Entidad financiera: Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2014-2016.
- “Farmacología experimental del tracto digestivo”. PROMETEO/2010/060. Programa de ayudas para el desarrollo de actuaciones de I+D por grupos de investigación de excelencia. Entidad financiera: Consellería de Educación, Generalitat Valenciana. Duración 5 años.
- “Modulación de la fibrosis intestinal por el sistema inmune innato en la enfermedad de Crohn: relevancia de la autofagia”. IP: M<sup>a</sup> Dolores Barrachina Sancho y Sara Calatayud Romero. (SAF2016-80072P). Entidad financiera: Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2016-2019 y el fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- “Farmacología experimental del tracto digestivo”. PROMETEOII/2014/035, y UGP-14-164. Programa de ayudas para el desarrollo de actuaciones de I+D por grupos de investigación de excelencia. Entidad financiera: Consellería de Educación, Generalitat Valenciana. Duración 5 años.



*“La fuerza no proviene de la  
capacidad física sino de la voluntad  
indomable”*

*Indira Gandhi*

***A mi familia y seres queridos***





# **AGRADECIMIENTOS**



Hace un tiempo que emprendí un largo viaje, dejando cosas atrás, pero iniciando otras con mucha ilusión, pero también con miedos por todos los cambios que se presentan cuando te vas fuera de casa y vayas que fue lejos de casa. Pero también debo decir que ha merecido la pena todos estos años, porque estoy logrando uno de mis sueños, concluir la tesis doctoral. Aún recuerdo cuando estaba en la carrera y siempre dije que haría un doctorado, pero nunca pensé que terminaría viviendo en España. Es por ello que agradezco a la Universidad de Valencia por abrirme las puertas para estudiar el máster y posteriormente el doctorado y a la Universidad de Colima, por iniciar mis estudios de licenciatura en biología y ahora el apoyo que me ha brindado para poder iniciar y concluir esta tesis doctoral.

Quiero primeramente agradecer a mis directoras de tesis. **Loles**, muchas gracias por brindarme tu confianza, por guiarme y enseñarme a ser más analítica con mi trabajo y por transmitirme tu entusiasmo por la investigación. El haberte conocido en aquel momento que no sabía dónde realizar la tesis, ya que solo llevaba un año en España y quería iniciar algo nuevo y tú me abriste las puertas para que pudiera seguir adelante. Escuchaste mis ideas y me enseñaste a llevarlas a cabo y no me dejaste caer en esos momentos críticos que se presentaron durante la tesis. Por todas las enseñanzas a nivel profesional y personal, para mí eres un ejemplo a seguir y de todo corazón muchas gracias por tu dedicación y empeño que me sigues brindando para poder finalizar esta etapa doctoral, que he disfrutado y aprendido mucho. **Dolo**, muchas gracias por estar a mi lado cuando llegue al laboratorio, me sentía perdida porque iniciaba algo nuevo, por guiarme en los momentos críticos que se me presentaron con las técnicas en el laboratorio, sin tu ayuda no hubiera sido posible. Por todo tu apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, por todos los consejos que me brindas y por permitirme pasar esas tardes agradables con Alfonsito. Gracias por escucharme y brindarme tu amistad y todas esas cenas que hemos compartido con las ajonjolinas. **Juan Vicente**, muchas gracias por recibir a esta mexicana con los brazos abiertos, por tu apoyo incondicional y tus consejos para seguir adelante. Por todas esas conversaciones de historia, como siempre he dicho, es un placer tener esas conversaciones sobre la cultura de México y escuchar tu punto de vista. De corazón gracias por hacerme sentir en casa y por impulsarme a seguir adelante por mis proyectos, por brindarme esas palabras de apoyo que siempre se necesitan cuando se cierran etapas e iniciamos otras. Y una promesa que te hice cuando llegue al laboratorio es poner esta frase “vivan los gachupines” sé que la entenderás y te la debía. **Sara**, gracias por tu apoyo y tus consejos sobre las técnicas que iba aprendiendo en el laboratorio y por brindarme tus comentarios sobre los resultados de esta tesis que ayudaron a su desarrollo. Pero nunca olvidare la hora de la comida y tu frase que me gusta mucho “hacer ejercicio no es bueno”, recurrentemente lo aplico. De verdad gracias por

enseñarme a encontrar esos pequeños detalles que hacen la diferencia. **Carlos**, fue una pena verte partir, pero quiero agradecerte todos los consejos que me brindaste durante el tiempo que compartimos y nunca olvidare nuestras platicas eternas sobre “western blot”. Por esas tardes en el laboratorio que nos reíamos por los acertijos que nos compartías, con esos pequeños detalles hiciste que nos despejáramos un momento del trabajo, espero de corazón que te vaya muy bien a ti y tu familia. **Ángeles**, por brindarme tus palabras de ánimo y por decirme siempre ya queda poco y regalarme una sonrisa siempre que nos encontramos en el pasillo. **Ma. Ángeles**, por compartir esos momentos de risas y los puntos negativos que nos dabas. **Nade**, por esas largas conversaciones en tu despacho sobre la vida en general. **Victor y Miguel Martí** por brindarme una palabra de apoyo siempre que nos veíamos. **Brian** por brindarme tu apoyo y palabras de motivación en la recta final de esta tesis. **Dora**, gracias por siempre brindarme una sonrisa y por tu disponibilidad. Por esas conversaciones de viajes, política y por brindarme siempre tips de cocina, prometo aprender hacer el arroz al horno, te lo debo.

Bueno quiero iniciar diciendo que el compartir cada día una bancada en el laboratorio, al final del día tus compañeros de trabajo, terminan siendo amigos e incluso hasta familia. Voy iniciar por el equipo Crohn y sucedáneos, quiero iniciar con **Jesús**, gracias por ese apoyo que me brindaste desde el primer día, por todas las enseñanzas en el laboratorio, por compartir bancada y esos momentos críticos que se presentaron durante la tesis y brindarme siempre una palabra de aliento y por ese entusiasmo y alegría que siempre trasmites. Por esas cenas y viajes compartidos. **Pedro**, bueno quien iba a decir de ser compañeros de máster a ser compañeros de bancada, fue un placer compartir tantos momentos de risas y de ratones “que le muerdan a cada uno los suyos” tu frase preferida y que nunca olvidare. Tampoco olvidare todos los momentos compartidos y por brindarme ánimos para seguir. **Laura**, por todos esos momentos compartidos en el laboratorio dentro y fuera, por tu disponibilidad para ayudar y por tu perseverancia por conseguir lo que quieres.

Pero bueno como olvidar con los que inicie compartiendo mi etapa en el laboratorio. **Nando**, mi amigo, mi hermano, mi consejero. Contigo reafirmo que la distancia no es impedimento para nada. Gracias de corazón por siempre brindarme tu hombro para no caer, esas sonrisas y palabras de aliento en esos momentos difíciles. Por pasar juntos esos largos veranos que hiciste que fueran amenos al poner la música que nos gustaba y cantar para relajarnos. Y por recordarme que siempre hay esperanza, hasta en los momentos más complicados y por trasmitirme tu espíritu luchador. **Alberto**, sabes que para mí eres la persona más buena que conozco, con tus detalles obsesivos con el alcohol por limpiar tu bancada, pero bueno no lo

tomemos en cuenta. Gracias por trasmitirme esa dedicación por las cosas, tu fuerza y entusiasmo por conseguir las cosas y estar siempre ahí, con las palabras correctas para animar siempre. **Cesar**, primero gracias por ser como eres, por estar siempre ahí. Aunque nos veamos poco por las mil ocupaciones que tenemos, es como si nunca te hubieras ido. Siempre me trasmites tu apoyo y bueno que decir que hasta nos íbamos a casar (broma) y espero seguir compartiendo muchas cosas y espero que al final de todo pueda pronunciar bien tu nombre. **Víctor**, aún recuerdo que llegamos casi al mismo tiempo al laboratorio y mira aquí estamos concluyendo otra etapa. Solo me queda darte las gracias por la disponibilidad que siempre me brindaste y por esas tardes que compartimos y por supuesto que no nos falte nuestras visitas al baloncesto.

Mis carinas. **Ana**, muchas gracias por estar siempre ahí cuando necesito que alguien me escuche y siempre brindarme un abrazo y una sonrisa. Esa positividad que trasmites me ha ayudado en los días que no fueron del todo bien. Pero sobre todo por regalarme ese cariño que sabes que es mutuo y hemos compartido en cenas y viajes. Por las risas interminables y porque sigamos brindando por la vida y sigamos adelante, mi rubia preferida. Bueno no dejare atrás a mi morena, **Isa**, gracias por siempre trasmitirme esa fuerza y esa lucha por seguir adelante, por estar ahí en mis dramas y llevarme a cenar, que me conoces bien y sabes que con eso todo se me olvida. Por preocuparte siempre, escucharme y apoyarme. Gracias amigas por estar siempre en las buenas y en las no tan buenas y que sigamos compartiendo por mucho tiempo.

Mis ajonjolinas. **Miriam** por todas esas tardes interminables compartidas en el laboratorio, por esas risas y largas conversaciones que tuvimos. Por brindarme siempre una palabra de ánimo para seguir adelante y apoyar mis locuras. **María**, aunque te fuiste muy pronto sabes que eres una persona que trasmites mucha alegría y que buenas tardes pasamos y seguimos pasando. Por siempre estar ahí para escucharme. Ambas saben que las eche mucho de menos cuando partieron del laboratorio, gracias por brindarme su amistad y sé que seguiremos juntas hasta el final y más allá.

Bueno mis pequeñas mosqueteras. **Ángela**, eres mi hermana pequeña, mi secretaria sexy que te puedo decir, gracias por estar siempre ahí, por brindarme tu alegría y ese ángel que tienes como bien dice tu nombre. Gracias por tu apoyo incondicional y compartir tantos momentos y nuestras largas conversaciones de la vida y las que nos faltan. **Olga**, caramelito eres una persona muy fuerte y exigente, que siempre me ha brindado una sonrisa y apoyo. Por todas esas largas tardes-noches en el laboratorio, por tantas cosas compartidas, viajes, cenas y como olvidar nuestros bailes mi Shakira. **Laia**, hay mi guapisim, te echo de menos. Pero la distancia no será impedimento para seguir juntas. Fuiste una de las personas que desde el momento en que te

quedaste en el laboratorio nos volvimos muy cercanas, todas las conversaciones sobre los peter pan y demás. A las tres gracias por ser como sois, compartir tantas cosas y por estar siempre ahí, las quiero.

Ahora mi Macedonia favorita, **Aleks** sé que no tenemos mucho tiempo de conocernos, pero madre mía como si nos conociéramos de toda la vida. Esa fuerza que trasmites y siempre brindándome apoyo y preocupándote por si todo va bien. Gracias por estar siempre ahí y tu risa contagiosa que nunca se acabe por favor. **Pablo**, nunca olvidare cuando llegaste al laboratorio y todas esas tarde-noches que compartimos en el laboratorio. Pero en lo personal me transmitiste mucha fuerza y dedicación por hacer las cosas, bueno con toda esa inteligencia nata que tienes. Y qué decir de nuestros jueves por benimacllet profundo compartiendo tantas risas e historias y mi compañero de comer "solomillo". Por todos esos mensajes de apoyo que me enviaste cuando inicie el proyecto y por estar siempre ahí escuchando y animando. **José**, hay mi Joesin, tan pequeño, pero tan maduro. Que días tan agradables me hiciste pasar cuando llegaste al laboratorio, con tu alegría y entusiasmo por seguir adelante. Por siempre estar ahí revelando contigo de la vida. No cambies, eres una persona muy noble y sé que llegaras a conseguir todos tus sueños. Y de verdad por ayudarme en el laboratorio en la parte final, cuando pensé que ya no podía más, estabas ahí para con tus palabras de aliento y tu disponibilidad para ayudarme a trabajar. **Davide Castelli** o bien "caballo libre", gracias por tu comprensión y apoyo en la recta final de esta tesis. Por acompañarme las tardes y los fines de semana en el laboratorio y compartir el café irlandés para escucharme. Por enseñarme que todo está bien, que solo es la perspectiva de cómo se ven las cosas. Eres un vikingo de la vida y gracias por tantas risas, fiestas y alimentarme una semana con pasta y aun así decirme que no era suficiente. Solo me queda decirte que tú también tienes un alma buena y sé que siempre estarás ahí para decirme que cuide a mi hijo Yased. **Sergio**, a pesar de que fue corto tu paso por el laboratorio, siempre has estado al pendiente de como estoy y brindándome tus palabras de aliento. Siempre al pendiente de cómo va todo y diciéndome que todo se puede. Me alegra haberte conocido y sé que lograras todo porque eres un chico muy dedicado por lo que se proponer hacer. **Tati**, en tampoco tiempo hemos compartido tantas cosas, hasta el punto de titularnos casi el mismo mes. Eres una guerrera en toda la extensión de la palabra y agradezco el conocerte y compartir tantos momentos y tener nuestras largas conversaciones sobre autofagia (somos una frikis). **Arantxa**, por todos esos momentos compartidos, nuestra afición por el baloncesto y porque siempre estás ahí con una sonrisa. **Jorge**, por todas esas tardes compartidas hablando de cine y por regalarme a "hope" aunque no la pude tener mucho tiempo, la disfrute mucho mientras estuvo en casa. **David, Pancho, Sandra**, sois grandes chicos, gracias por alegrar y darle vida al

laboratorio sin ustedes no fueran posibles tantas cosas. **Patri, Mariam y Ainhoa**, chicas gracias por brindar siempre una sonrisa a la hora de la comida y por esos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. Tampoco olvidarme de **Lara, Nicole, Fer, Raúl, Amelia, Rosa, Carmen Susana, Irene, Sandra, Noelia**, por hacer que el trabajo diario fuera más fácil.

También agradecer a **Lorena**, fuiste y siempre serás esa amiga incondicional que sin conocerme me abriste las puertas de tu corazón y de tu casa. Cuidaste de esta mexicana como si no hubiera un mañana, aún recuerdo nuestras risas y llantos en tu despacho por cosillas de la vida, tu familia **Pilar, Juan, Patri, Carlos y la pequeña Ester** que ahora los considero mi familia siempre me apoyaron a que España fuera mi casa y como olvidar esos domingos de paella. Gracias por hacer que extrañara menos y que todo fuera más fácil, hasta el punto de enseñarme valenciano. **Aura y Gaby** gracias por brindarme su amistad y su casa, nunca olvidare todo el apoyo que me brindan y hacerme sentir de su familia. **Marta**, el conocerte fue una alegría, México y Brasil compartiendo historias y viajando, gracias por todos los momentos compartidos y por todo tu apoyo. Como olvidarme de mis compis de piso que han formado parte de esta etapa de mi vida **María (Galicia) y Miriam** por todos esos momentos vividos en casa, tantas cenas y claro que si no falte nuestras platicas nocturnas. **María**, estar siempre al pendiente de todo y por escucharme. **Chiara**, mi italiana, mi compañera de manta y té viendo pelis eso fines de semana, sabes que te echo de menos, pero la distancia no será impedimento. **Luis**, mi compañero de té por las noches y todas esas charlas filosóficas de la vida, creo que eres el mejor dando consejos y cuidándome de todo, vaya fill que nuestro café de las luces no terminen. **John**, en este corto tiempo que vivimos juntos te has vuelto mi compi de cenas, escucharme mis historias y por supuesto acompañándome hasta tarde estudiando. **Aníbal**, aunque no somos compis de piso siempre estamos juntos, compartiendo nuestros desayunos y que decir de los domingos familiares con nuestra paella y que no falte las carreras a las cuales vamos todos motivados y tomando en cuenta que derribaremos el muro para poner nuestro cheslong. **Hilda y Alondra**, mis inolvidables hace ya un buen tiempo que nos conocemos y a pesar de la distancia seguimos estando juntas, apoyándome con sus mensajes y compartiendo nuestras vidas. **Marco**, muchas gracias por brindarme tu apoyo desde que inicie esta etapa, por estar al pendiente de mi tío y siempre alentarme a seguir adelante. **Inés**, tu entusiasmo que siempre me brindaste y apoyo incondicional. **Nicxy**, no tengo palabras, solo decirte que muchas gracias por estar al pendiente de mi tío y por brindarme tu apoyo incondicional. **Elpidio**, solo me queda darte las gracias por todo el aprendizaje y el apoyo que en su momento me brindaste. Por trasmitirme la inquietud por investigar y siempre me alentaste que luchara por lograr mis sueños. **Danae**, mi danet de danone, gracias por compartir tantos sueños, viajes y por escucharme siempre. Hace unos años

salimos de casa y seguimos buscando la manera para vernos y apoyarnos. Aún recuerdo nuestros inicios en el laboratorio y seguimos como el primer día, divirtiéndonos con lo que hacemos. **Marco, Giovanna y bebé Andrew**, sobra decir que sois mi familia, gracias por estar ahí apoyándome y por estar siempre ahí en los buenos y no tan buenos momentos que nos ha tocado compartir y superar.

También quiero agradecer a mis tíos **Guadalupe, Yolanda, Juan, Francisco y Manuel** por estar ahí siempre preocupándose por mí y brindándome su apoyo. Sé que al principio no querían que me fuera tan lejos, pero apoyaron mi sueño y solo me queda darles las gracias por animarme cada día. Mis primos **Mónica, Verónica, Emmanuel, Alejandro, Mario, Manuel, Olga y Jaime** por estar siempre ahí preocupándose por mí y compartir tantos momentos. Mis sobrinos **Verónica, Ximena, Iliana, Fernando, Grecia, Eduardo**, y mis sobrinos pequeños que espero conocer pronto **Montserrat y Louis**, solo agradecer todas las alegrías que me brindan cada vez que los veos y por estar siempre brindándome su cariño.

Especialmente esta tesis se la quiero dedicar a mi **Mamá**, desde hace mucho tiempo no está físicamente conmigo, pero siempre la llevo en mi corazón. Se que siempre estará cuidándome y guiándome como hasta ahora. Nunca olvidare, su gran consejo “tu mayor herencia será seguir estudiando y perseguir tus metas” gracias por haberme transmitido ese coraje por seguir adelante ante las adversidades, pero siempre con una sonrisa, su fuerza, tenacidad y perseverancia para conseguir las cosas. Por decirme que nada es imposible, siempre hay que intentarlo y así seguiré haciéndolo, si pudiera decirle algo ahora mismo, sería muchas gracias mamá desde lo más profundo de mi corazón por haberme guiado y enseñado todo en tan poco tiempo para enfrentarme a la vida.

Pero principalmente, esta tesis, no hubiera sido posible sin el pilar que me mantiene en pie, mi **tío Jesús**, sintetizare porque son tantas cosas que quiero agradecerle que a su vez no tengo palabras por todo el cariño, comprensión e impulso que me ha brindado a lo largo de mi vida. Realmente ha sido mi padre, se ha desvelado conmigo y nunca me ha limitado hacer lo que quiero. Por impulsarme a seguir adelante y enseñarme a levantar en los peores momentos y decirme “que la vida sigue que solo hemos vivido pequeñas lecciones que nos hacen más fuertes”. Sé que he sacrificado el tiempo que he podido compartir usted los últimos años, pero sabe que este logro es de los dos, nunca me cansare de decirle lo mucho que lo quiero y mil gracias por estar siempre a mi lado.

Finalmente, volver a decirles a todas las personas que he mencionado y a las que no he podido mencionar porque me extendería más de la cuenta, MUCHAS GRACIAS, sin su apoyo y sus



palabras no hubiera sido posible seguir adelante y concluir esta etapa doctoral. Que cada uno ha sido importante en mi vida y me llevo todos los momentos agradables que compartí con vosotros.



# **ABREVIATURAS**



3MA	3-metiladenina
AcetilCoA	Acetil coenzima A
Akt	Serina/treonina cinasa
AMPK	Proteína cinasa activada por 5'-adenosina
ANCA	Anticuerpo anticitoplasma de neutrófilos
AP-1	Proteína activadora 1
ASCA	Anticuerpo anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATG	Proteínas relacionadas con la autofagia
ATG12	Proteína 12 relacionada con autofagia
ATG16L1	Proteína 16-1 relacionada con autofagia
ATG5	Proteína 5 relacionada con autofagia
ATP	Adenosín trifosfato
BCL10	Proteína 10 del Linfoma-Leucemia de células B
BCL-2	Proteína 2 del Linfoma de células B
C/EBP $\beta$	Proteína delta de unión al potenciador CCAAT
CARD5	Dominio de reclutamiento y activación de caspasa 5
CARD9	Dominio de reclutamiento y activación de caspasa 9
CCL19	Quimiocina (C-C) ligando 19
CCR7	Receptor quimiocina C-C tipo 7
CDs	Células dendríticas
CEI	Células epiteliales intestinales
C-Ets-1	Protooncogén c-Ets-1
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
COX2	Ciclooxigenasa 2
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
CU	Colitis ulcerosa
DKK	Proteínas Dickkopf
DSS	Dodecilsulfato sódico
EAF	Epitelio asociado a folículo
EC	Enfermedad de Crohn
EH	Extracto etanólico <i>Hylocereus</i>
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMT	transición epitelial mesénquimal
ET-1, 2, 3	Endotelina-1, 2, 3
FAD	Flavin adenín dinucleotido
FIP200	Proteína de 200 kDa que interacciona con las cinasas de la familia FAK
FUT2	Fucosiltransferasa 2
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GI	Tracto gastrointestinal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GWAs	Asociación del genoma completo
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hypoxia-1 alfa
HSPA8	Proteína de choque térmico-8
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular-1

ICL	Isocitrato liasa
IFN- $\gamma$	Interferón-gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IGF-1-2	factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IGRM	Familia GTPasa relacionada con la inmunidad
IIBDBC	Consortio internacional de genética de la enfermedad inflamatoria intestinal
IKK	Complejo I-Kappa B cinasa
IL 12	Interleucina-12
IL 6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-23	Interleucina-23
IL4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRF-4	Factor 4 regulador del interferón
IRF-5	Factor 5 regulador del interferón
IRGM	Proteína M de la familia GTPasa relacionada con la inmunidad
IRGs	Guanosina trifosfato relacionadas con la inmunidad-IFN $\gamma$
I $\kappa$ -B $\alpha$	I kappa-B alfa
JAK-STAT	Janus/cinasa- Transductor de señal y activador de la transcripción
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
KO	Knock-out
LAMP-2a	Proteína de membrana 2 asociada a lisosoma
LC3-I/-II	Cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada al microtúbulo, forma I o II, denominada MAP1LC3.
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LPI	Lámina propia intestinal
LPS	Lipopolisacárido
M2b	Macrófagos "activación alternativa" tipo 2b
M2c	Macrófagos "activación alternativa" tipo 2c
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Matriz Metaloproteinasas
MPO	Mieloperoxidasa
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
Muc2	Mucina-2
M $\Phi$	Macrófagos
M $\Phi$ M1	Macrófagos de "activación clásica"
M $\Phi$ M2	Macrófagos de "activación alternativa"

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBR1	Proteína del gen 1 próximo al gen de BRCA1
NDP52	Proteína de punto nuclear de 52 kDa
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NIK	Activación de la cinasa inductora de NF-κB
NOD2	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2
NOS	Óxido nítrico sintasa
OPTN	Gen codificante para la optineurina
OX40	Ligando para el receptor CD134 de la familia TNF-α
p62/SQSTM1	Sequestosoma-1/proteína p62
PAMPs	Patrón molecular asociado a patógenos
PE	Fosfatidiletanolamina
PHD	Enzima prolil hidroxilasa
p-HPEA-A	Tirosol
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasas
PPARγ	Receptores -γ activados por proliferación de peroxisomas
Rab33	proteína Rab-33B relacionada con Ras
RE	Retículo endoplásmico
RE-Golgi	Retículo endoplasmático-aparato de Golgi
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
Sirt 1-7	Sirtuinas1-7
siSUCNR1	Silenciamiento génico del receptor de succinato
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
SUCNR1	Receptor de succinato 1
Sucnr1 <sup>-/-</sup>	Inactivación del gen que codifica para el receptor succinato 1
T-bet	Factor de transcripción T-box
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Células T "helper" o efectoras
TLRs	Receptores de tipo Toll
TNBS	2,4,6-ácido trinitrobenzenosulfónico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	Linfocitos T reguladores
ULK-1	Cinasa 1 tipo UNC51
XBP1	Proteína 1 de unión a X-box
α-KG	α-cetoglutarato
αSMA	α-actina de músculo liso





# ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1 Loci de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) representados por la vía y nombre del gen .....	8
Figura 2. El intrincado universo de componentes inmunes y no inmunes implicados en la inmunopatogenia de la EII.....	13
Figura 3. Esquema de la mucosa intestinal y del sistema inmune en el intestino delgado. ....	14
Figura 4. Diagrama esquemático del sistema inmune intestinal.....	21
Figura 5. Mecanismo de acción propuesto para el receptor de succinato .....	25
Figura 6. El sistema inmune intestinal normal y alterado.....	28
Figura 7. El papel de la autofagia en la inmunidad .....	29
Figura 8. Diferentes tipo de autofagia.....	31
Figura 9., La vía de la autofagia .....	32
Figura 10. Regulación de la autofagia .....	34
Figura 11. Autofagia en el desarrollo y la función de la célula inmune .....	35
Figura 12. El proceso paso a paso de la autofagia y los sitios de disfunción en la EII....	37
Figura 13. Los alelos de riesgo para la EII se encuentran en múltiples componentes de la vía de autofagia .....	38



# ÍNDICE



<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
I. 1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	3
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EII.....	3
1.1.3. ETIOLOGÍA DE LA EII.....	4
1.1.3.1. FACTORES AMBIENTALES .....	4
1.1.3.2. FACTORES GENÉTICOS.....	7
1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LA EII .....	9
1.1.4.1. COLITIS ULCEROSA (CU).....	9
1.1.4.2. ENFERMEDAD DE CROHN (EC) .....	10
1.1.4.2.1. PATRÓN INFLAMATORIO (B1) .....	10
1.1.4.2.2. PATRÓN FIBROTICO (B2) .....	10
1.1.4.2.3. PATRÓN FISTULIZANTE (B3) .....	11
1.1.5. ETIOPATOGENIA DE LA EII.....	12
1.1.6. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA INTESTINAL .....	13
1.1.6.1. BARRERA EPITELIAL .....	13
1.1.6.2. CELULAS DENDRITICAS .....	16
1.1.6.3. MACRÓFAGOS .....	18
1.1.6.4. METABOLITOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA INMUNE .....	21
1.1.7. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA INTESTINAL .....	25
1.1.7.1. CÉLULAS T.....	26
1.1.7.2. CÉLULAS B .....	27
1.1.8. ALTERACIÓN DE LA AUTOFAGIA .....	29
1.1.8.1. MECANISMO MOLECULAR .....	30
1.1.8.2. AUTOFAGIA E INFLAMACIÓN .....	34
1.1.8.3. PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN LA EII .....	37
I. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
I. 3. CONCLUSIONES.....	48
<b>II. CAPÍTULOS</b> .....	<b>49</b>
CAPÍTULO 1: THE FLESH ETHANOLIC EXTRACT OF <i>Hylocereus polyrhizus</i> EXERTS ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS AND PREVENTS MURINE COLITIS .....	50
CAPÍTULO 2: STIMULATION OF AUTOPHAGY PREVENTS INTESTINAL MUCOSAL INFLAMMATION AND MILORATES MURINE COLITIS .....	67
CAPÍTULO 3: SUCCINATE RECEPTOR MEDIATES INTESTINAL INFLAMMATION AND FIBROSIS .....	91
<b>III. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>119</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>149</b>





# **I. RESUMEN**



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un trastorno crónico del tracto gastrointestinal caracterizado por presentar una alteración en la función de la barrera epitelial y una inflamación de la mucosa (Meroni *et al.*, 2018). Su etiología es desconocida y se cree que se trata de una respuesta exacerbada del sistema inmune del huésped a agentes microbianos y ambientales en individuos genéticamente susceptibles (Kaistha *et al.*, 2014). Las principales formas idiopáticas de EII son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC); ambas comparten algunas características clínico-patológicas y síntomas, pero difieren en otras (Jesuratnam-Nielsen *et al.*, 2015).

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EII

En los últimos 50 años, la incidencia de EII ha aumentado en un 60% para la CU y en un 80% para la EC; hasta el momento la EII afecta aproximadamente a 3.6 millones de personas y presenta una alta prevalencia en países occidentales como son Europa Occidental, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido y área escandinava. Además, los estudios indican un aumento de la enfermedad en países industrializados que están en desarrollo como Asia (Arabia saudí, Japón, Hong Kong y Corea) (Dionne *et al.*, 2017). En Europa, la incidencia es 0.6-24.3/100,000 para CU y de 0.3-12.7/100,000 para EC. A pesar de los avances, la prevalencia de la EII en la población occidental sigue aumentando de forma persistente (CU es 4.9-505/100,000 y EC es 0.6-322/100,000 (Kedia *et al.*, 2017). Este incremento se ve favorecido por factores ambientales que afectan al microbioma intestinal y aumentan el riesgo en individuos genéticamente susceptibles a desarrollar la enfermedad inflamatoria intestinal (Chan *et al.*, 2018).

Por otra parte, la influencia del género es también una parte determinante; diversos estudios señalan que la EC en Europa y América del Norte es más frecuente en mujeres (20-30%), mientras la CU puede ser más frecuente en hombres. Por el contrario, en la población infantil la incidencia de la EC es más frecuente en niños y la CU en niñas

(Cosnes *et al.*, 2011; Molodecky *et al.*, 2012; Kaplan *et al.*, 2017). Diversos estudios indican que la EII tiene una incidencia del 10% en pacientes menores de 18 años, pero los datos revelan que el primer pico de aparición es entre los 15 y 30 años, además de presentarse un segundo pico de incidencia entre los 50 y 70 años de vida (Parmar *et al.*, 2012; Kaistha *et al.*, 2014; Tegtmeyer *et al.*, 2017).

La EII surgió en los países occidentales, lo que sugiere que esta evolución epidemiológica está relacionada en parte con el estilo de vida y la industrialización, aún así, existe una falta de investigación sobre la incidencia de la enfermedad entre razas y etnias. En un principio, solo se asociaba a personas blancas y judías, pero recientemente se observa un incremento en la población asiática y en poblaciones afroamericanas, lo que sugiere una incidencia similar entre las poblaciones. Sin embargo, se observa una menor incidencia en poblaciones de raza negra que, probablemente sea debida a las limitaciones al acceso de los estudios epidemiológicos (Ananthakrishnan AN, 2015).

### 1.1.3. ETIOLOGÍA DE LA EII

A pesar de la gran cantidad de estudios publicados sobre EII, su etiología permanece sin ser completamente elucidada y se acepta que tanto la colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn son multifactoriales. Factores ambientales y genéticos determinan una respuesta inmune exacerbada frente a la microbiota intestinal. Además, estudios recientes señalan que el estrés en el retículo endoplásmico (RE) y la respuesta a proteínas desplegadas son factores críticos asociados con la susceptibilidad a esta enfermedad (Soon *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2017).

#### 1.1.3.1. FACTORES AMBIENTALES

Se ha investigado sobre posibles factores ambientales que provocan el desarrollo de la EII, tales como modificaciones en la microbiota intestinal, tabaquismo, dieta, deficiencia de vitamina D, antibióticos, contaminación, estrés y sueño (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

Fumar es uno de los factores ambientales que presenta una fuerte asociación con el desarrollo de EII; aumentando el riesgo de EC y con ello la aparición de fístulas, debido al aumento de citocinas como son IL-8, IL-10 y IL-23. Sin embargo, la exposición pasiva al tabaco en la infancia protege frente a CU (Sandler *et al.*, 1992). Esto se explica por el efecto diferencial de la nicotina en el tracto intestinal, debido a que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en el intestino delgado, mientras disminuye la actividad NOS en el intestino grueso; la presencia de ROS provoca la formación de moco intestinal y secreción de proteasas, elastasa, colagenasa y catepsina G por macrófagos, mastocitos y por linfocitos T y B, con lo que se deterioran las conexiones intercelulares y se incrementa el daño intestinal (Sobczak *et al.*, 2014).

En los últimos años, la relación entre la dieta y la enfermedad se ha investigado y existen datos que demuestran una correlación entre los macro y micronutrientes dietéticos y la disbiosis microbiana intestinal (Couturier *et al.*, 2013, Lewis *et al.*, 2017). Recientes estudios señalan que el consumo de alimentos procesados y comida rápida, ricos en grasas mono y poliinsaturadas, proteínas de origen animal y azúcar refinado se relacionan con el desarrollo de la enfermedad (Halmos *et al.*, 2014; Kaplan *et al.*, 2017).

Otros datos sugieren que existen componentes en la dieta que pueden ejercer un efecto positivo como el omega 3, y la fibra ya que mantienen la integridad de la barrera epitelial mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta que ayudan a inhibir la producción de citocinas proinflamatorias y favorecer la presencia de bacterias beneficiosas (Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

Con respecto a los micronutrientes, la deficiencia de hierro, zinc, vitamina D y vitamina B12 se presenta en pacientes con un cuadro clínico activo. En particular el zinc y la vitamina D parecen actuar de igual forma sobre macrófagos, neutrófilos y linfocitos T, inhibiendo la vía NF- $\kappa$ B y la actividad mieloperoxidasa y como consecuencia la liberación de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y la expresión de ICAM-1) (Boonstra *et al.*, 2001, Martinesi *et al.*, 2008, Raman *et al.*, 2011). Además, la deficiencia de vitamina D se asocia epidemiológicamente con un mayor riesgo de cirugía de CU,

mientras que los niveles más altos de vitamina D pueden disminuir el riesgo de recaída en pacientes con EC en remisión (Weisshof *et al.*, 2015; Limketkai *et al.*, 2017).

Otro posible factor clave para la predisposición de la EII son los antibióticos, ya que el mal uso y abuso de éstos podría contribuir a modificar o perder la diversidad en la microbiota intestinal. En un meta-análisis que incluía 11 estudios observacionales con 7,208 pacientes diagnosticados de EII se vió que el tratamiento de los pacientes con metronidazol fue el que mayor asociación presentó con la enfermedad de Crohn (Burke *et al.*, 2017).

Diversas partículas en el ambiente se han asociado con daños en la salud, en este caso la exposición del intestino a altos niveles de óxidos nitrosos en el aire da como resultado un aumento en la permeabilidad intestinal y se intensifica la respuesta inmune innata. En un estudio realizado con ratones KO en *Il-10*<sup>-/-</sup>, la exposición a partículas contaminantes en el aire exacerbó la colitis; además algunos trabajos muestran una buena correlación entre los lugares donde se presentan altas emisiones de contaminantes atmosféricos y las hospitalizaciones por EII (Kish *et al.*, 2013)

Por otro lado, el estrés, la ansiedad y la depresión se cree que pueden complicar la evolución de la EII (Lerebours *et al.*, 2007). En un modelo de ratones a los que se les indujo un estado depresivo modulado por el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, se observó inflamación intestinal, asociada a un aumento de citocinas proinflamatorias que alteraron las poblaciones bacterianas en el intestino (Bailey *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2016).

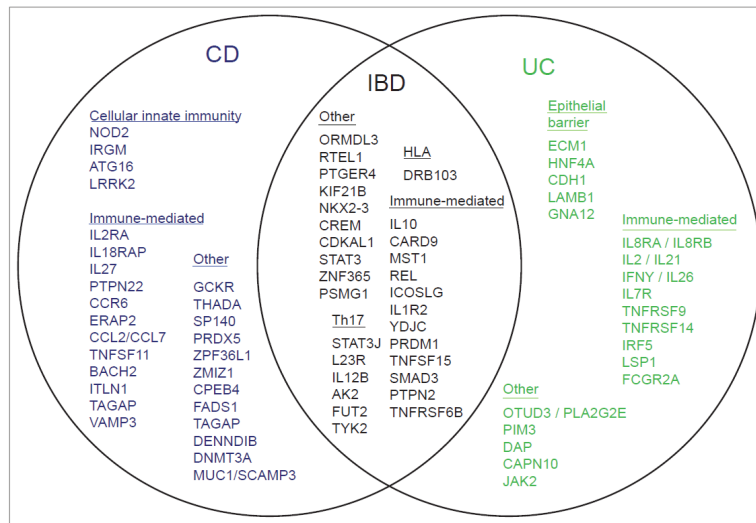
Finalmente, los pacientes que sufren un brote suelen tener alteraciones del sueño lo que puede modificar las funciones del sistema inmune y desencadenar un proceso inflamatorio (Ali *et al.*, 2013). Un estudio prospectivo demostró que pacientes con EII que durmieron menos de 6h presentan un mayor riesgo de desarrollar colitis ulcerosa. Reforzando esta observación, la administración intrarectal de melatonina redujo la inflamación intestinal en un modelo murino de colitis (Mazzon *et al.*, 2006; Esposito *et al.*, 2008; Ananthkrishnan *et al.*, 2014).

### 1.1.3.2. FACTORES GENÉTICOS

Recientes estudios realizados entre individuos de la misma familia y gemelos, así como la evidencia étnica/racial y geográfica han sido herramientas para determinar la compleja interacción de la genética y los factores ambientales en la patogénesis de la EII (Blumberg *et al.*, 2016). Un 15% de pacientes de EII tienen un familiar de primer grado (padres, hijos, hermanos) con un historial positivo; por otro lado, un estudio demostró que el 30% de las personas que tienen a ambos padres con EII han desarrollado la enfermedad (Loddo *et al.*, 2015). Estudios en gemelos monocigóticos revelan una mayor probabilidad de presentar la enfermedad, (entre 10-15% para la CU y 30-35% para EC), mientras que los gemelos dicigóticos no presentan ninguna probabilidad de desarrollar CU, pero existe la probabilidad entre un 2-4% que desarrollen la EC (Dave *et al.*, 2014; Ek *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

En las últimas décadas, los estudios de asociación del genoma completo (GWAs) han realizado descubrimientos de genes, cuyas alteraciones podrían suponer un mayor riesgo para desarrollar la EII (Anderson *et al.*, 2011). Por el momento se han identificado y validado 200 loci para CU y EC, y se ha visto que existe una superposición de los loci entre ambas idiopatías debido a que comparten vías biológicas.

El consorcio internacional de genética de la enfermedad inflamatoria intestinal mediante estudios de meta-análisis e imputación genética ha logrado detectar 231 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con la EII (Ek *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018). Estos estudios han ayudado a caracterizar la presencia de polimorfismos en genes como el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (NOD2), dominio de reclutamiento y activación de caspasa 5 (CARD5), proteína 16-1 relacionada con autofagia (ATG16L1), proteína 1 de unión a X-box (XBP1), proteína M de la familia GTPasa relacionada con la inmunidad (IRGM), dominio de reclutamiento y activación de caspasa 9 (CARD9) y fucosiltransferasa-2 (FUT2) están implicados en las alteraciones de la composición y diversidad de la flora intestinal, la función inmune innata y/o adaptativa, la autofagia, apoptosis y estrés del retículo endoplásmico, asociadas a la EII (Fig. 1) (EK *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).



**Figura 1** Loci de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) representados por la vía y nombre del gen, (obtenido de Ek *et al.*, 2014).

Uno de los primeros genes de riesgo identificados en la EII fue CARD9, que tiene como función integrar señales de la respuesta inmune en respuesta a la presencia de virus, bacterias y hongos; además, de este gen depende el estímulo para activar la vía NF-κB y aumentar la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1β y la producción de linfocitos (Khor *et al.*, 2011).

Otro de los principales genes implicados, y a partir del cual se abrió una nueva vía de investigación para la EII fue NOD2/CARD5 que está relacionado con la EC; se identificaron tres polimorfismos de este gen y un 20 - 30% de los pacientes con EII tienen entre una y dos mutaciones que se relacionan con la progresión sintomatológica de la enfermedad. Este gen está implicado en la homeostasis intestinal, la respuesta inmune y alteraciones en la autofagia. Desempeña un importante papel en la secreción de proteínas antimicrobianas y mucina que son dos componentes críticos de la mucosa intestinal que evitan que las bacterias colonicen las células epiteliales (Hisamatsu *et al.*, 2013; Sobczak *et al.*, 2014).

Además, genes como ATGL16L1 e IGRM y recientes factores como los miRNA (miR192, miR29 y miR146a) están implicados en la regulación de la autofagia; el primer gen codifica para una proteína dimérica (ATG5 y ATG12) que permite la conjugación de



LC3 al autofagosoma y su polimorfismo se relaciona con una alteración estructural de las células Paneth y la secreción de péptidos antimicrobianos que termina en una defectuosa respuesta inmunológica ante patógenos intestinales. Alteraciones en el IRGM están implicadas en la desregulación de la permeabilidad intestinal lo que permite la entrada incontrolada de virus y bacterias a la mucosa (Sobczak *et al.*, 2014; Kalla *et al.*, 2015). Además, polimorfismos en ATGL16L1 y Mucina-2 (Muc2) se han relacionado con un incremento de estrés en el retículo endoplásmico lo que provoca un aumento de citocinas y activación de un subconjunto de células T colaboradores o *helper* (Th) tal como Th17, Th1, Th2, así como la respuesta a proteínas desplegadas (Sobczak *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2015).

Finalmente, el gen de FUT2 contribuye a la susceptibilidad de la EC y tiene como función regular la expresión de antígenos H (precursores de los antígenos del grupo sanguíneo A y B) así como la estructura y composición de la microbiota (Zhang *et al.*, 2017).

#### 1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LA EII.

Las idiopatías de la EII, a pesar de solapar algunos síntomas y características, presentan diferencias clínicas como pueden ser su extensión, gravedad y patrón evolutivo.

##### 1.1.4.1. COLITIS ULCEROSA (CU)

La CU es un trastorno crónico, que se caracteriza por inflamación (infiltrado de neutrófilos), abscesos y ulceraciones en las criptas, principalmente del colon, específicamente en las capas de la mucosa y submucosa, aunque puede estar presente en el intestino grueso (Tegtmeyer *et al.*, 2017). La extensión del daño varía en diferentes proporciones; con mayor frecuencia se encuentran los casos que involucran en gran parte a la zona del rectosigmoide; por otro lado, está la pancolitis que afecta a todo el colon en un patrón interrumpido y también existen casos en los que solo se presenta en el lado izquierdo del colon (Monteleone *et al.*, 2014; Sobczak M. *et al.*, 2014).

#### 1.1.4.2. ENFERMEDAD DE CROHN (EC)

La EC afecta principalmente a la parte inferior del intestino delgado, particularmente el íleon terminal, aunque puede aparecer en cualquier segmento del tracto gastrointestinal (GI). Desde el punto de vista clínico, basándose en la clasificación de Montreal se han caracterizado tres tipos de patrones: inflamatorio (B1), fibrótico (estenosante, B2) y fistulizante (penetrante, B3) (Silverberg *et al.*, 2005; Girardelli *et al.*, 2018).

##### 1.1.4.2.1. PATRÓN INFLAMATORIO (B1)

El principal síntoma que presentan los pacientes con un patrón inflamatorio es el dolor abdominal. A nivel histológico existen lesiones en la mucosa caracterizadas por la presencia de úlceras superficiales, granulomas no necróticos, una submucosa engrosada e inflamación transmural provocada por una exacerbación de la respuesta inmune (Tegtmeyer *et al.*, 2017).

Este patrón se caracteriza por un proceso inflamatorio que puede ser agudo o crónico según su duración (Satsangi *et al.*, 2006). En la inflamación aguda se presenta una respuesta rápida a agentes perjudiciales que estimulan la liberación de factores quimiotácticos que reclutan células del sistema inmunológico cuya activación produce la liberación de ROS, citocinas y quimiocinas que inician y exacerban la respuesta en el proceso de regeneración de la lesión (Torres *et al.*, 2017). Por otro lado, la respuesta inflamatoria crónica es un proceso de eventos (cascada de coagulación, respuesta inflamatoria y fibrogénica) que se presenta en un tiempo prolongado y puede llevar progresivamente a la fibrosis (Latella, 2018).

##### 1.1.4.2.2. PATRÓN FIBROTICO (B2)

La fibrosis intestinal (B2) es un problema clínico que se detecta aproximadamente en el 40% de pacientes con EC y en el 5% de pacientes con CU. Es consecuencia de la inflamación intestinal transmural perpetuada por un tiempo

indefinido y dependiente del balance entre la producción y degradación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC). Se caracteriza por acumular una gran cantidad de colágeno en el tejido conectivo y una expansión permanente o transitoria de células mesenquimales primarias (fibroblastos, miofibroblastos, subepiteliales y células del músculo liso) (Latella *et al.*, 2015; Rieder *et al.*, 2017).

Otro paradigma establecido recientemente que contribuye al desarrollo de la fibrosis en pacientes con EC son las células epiteliales a través de un proceso llamado transición epitelial mesenquimal (EMT) y las células endoteliales mediante la transición endotelial a mesenquimal (EndoMT) (Latella *et al.*, 2017).

Los factores de crecimiento juegan un papel muy importante en la producción de colágeno y activación de células mesenquimales; un regulador central de la fibrosis es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ya que se encuentra incrementado en la mucosa de pacientes con EII (Jiang *et al.*, 2018).

Otros factores relacionados son las activinas, factor de crecimiento del tejido conjuntivo, factores similares a la insulina (IGF-1-2), epidérmico y endotelinas (ET-1, -2, -3) (Lawrance, 2014, Latella *et al.*, 2014). Hasta el momento no se han reportado sinergias entre estos factores, por lo que no existe ningún enfoque terapéutico que abarque a varios de ellos. Recientes estudios se han centrado en la búsqueda de moléculas que puedan inhibir la acción de estos factores; en esta línea, la terapia anti-sentido ha logrado modular la expresión de Smad7, una molécula que regula la acción del TGF- $\beta$ 1 (Rogler *et al.*, 2017, Torres *et al.*, 2017).

#### 1.1.4.2.3. PATRÓN FISTULIZANTE (B3)

El patrón fistulizante (B3) afecta a un gran número de pacientes con la EC y se asocia con una mala calidad de vida (Panés *et al.*, 2017; Kelley *et al.*, 2017). Los factores que determinan el desarrollo del patrón fistulizante son muy variados y no están perfectamente determinados; en pacientes con fístula se ha visto implicada de manera prominente a nivel genético la vía de JAK-STAT, a diferencia de pacientes con EC que no

generan fístula (Kaur *et al.*, 2016). Además, algunos estudios en pacientes respaldan la implicación de EMT en la generación de fístulas (Scharl *et al.*, 2016, Scharl *et al.*, 2011).

Las células que sufren EMT son células transicionales que expresan marcadores como citoqueratina 8 y 20, junto a otros marcadores como vimentina y actina; presentan una regulación negativa en la expresión de moléculas de adhesión (E-cadherina) y positiva en factores de transcripción como SNAIL1 y SLUG y sus inductores principales son el TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Frei *et al.*, 2013). En el proceso de transición, estas células adquieren la capacidad de migrar y penetrar tejidos adyacentes; este proceso también está relacionado con el crecimiento tumoral y la metástasis (Scharl *et al.*, 2013, Siegmund *et al.*, 2016, Nieto *et al.*, 2016).

Algunos estudios en muestras humanas de fístula indican altos niveles de TGF- $\beta$  y un incremento del TNF- $\alpha$  y de su receptor en las células de transición (Scharl *et al.*, 2013, Scharl *et al.*, 2011). Otras moléculas relacionadas con la regulación positiva de las células EMT son, la IL-13 junto a su receptor, proteína C-ets-1 y proteína Dickkopf 1 (DKK1) (Scharl *et al.*, 2013, Frei *et al.*, 2013a y b).

Las metaloproteinasas (MMPs), tienen la capacidad de degradar componentes de la MEC. Estudios realizados en pacientes con EII y modelos experimentales han encontrado en el tracto fistulizante una mayor actividad de las MMPs, particularmente la MMP3 que muestra mayor expresión en células mononucleares y fibroblastos. Estos estudios demuestran que inhibidores de MMPs proporcionan protección para el desarrollo de la inflamación intestinal (Castaneda *et al.*, 2005, Kirkegaard *et al.*, 2004).

#### 1.1.5. ETIOPATOGENIA DE LA EII.

La EII es considerada una enfermedad de etiología multifactorial cuya patogénesis es compleja y en la que los mecanismos implicados en la aparición de los diversos fenotipos clínicos no se han logrado esclarecer (Fig.2). En los últimos años se ha visto que alteraciones en la respuesta inmune innata y adaptativa, así como en la autofagia intestinal pueden desempeñar un papel importante en dicha patogénesis (Neurath, 2014, de Souza *et al.*, 2016).

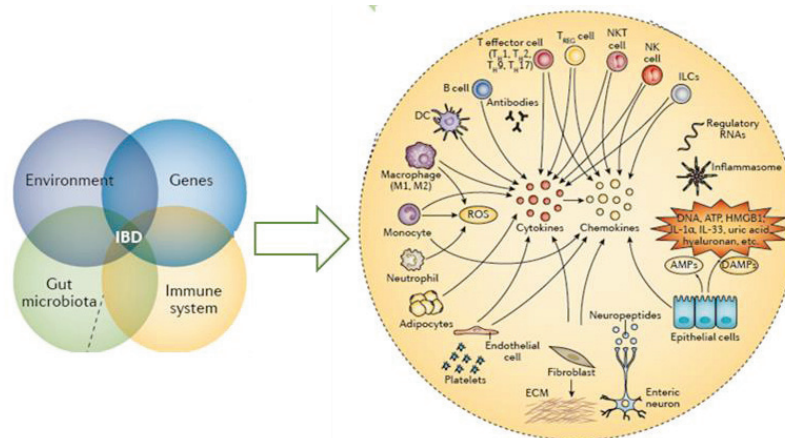


Figura 2. El intrincado universo de componentes inmunes y no inmunes implicados en la inmunopatogenia de la EII, (obtenido de Souza *et al.*, 2016).

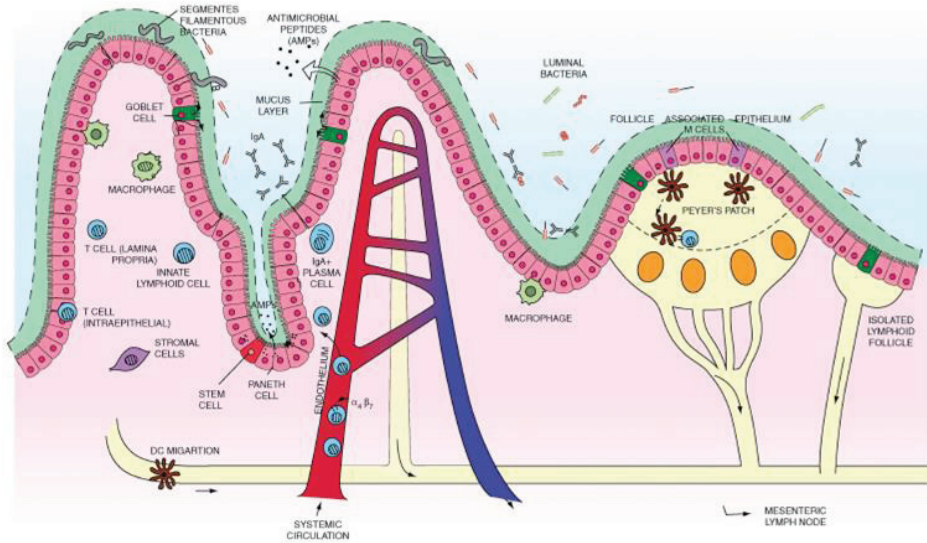
#### 1.1.6. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA INTESTINAL

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa frente a patógenos en el intestino y su función está mediada por diferentes tipos celulares: células epiteliales, endoteliales y mesenquimales, así como células inmunes, neutrófilos, monocitos, células dendríticas y macrófagos (Geremía *et al.*, 2014; de Souza *et al.* 2016). Este sistema está formado por una serie de barreras físicas y químicas que evitan el contacto de los microorganismos con células inmunológicas de la lámina propia del intestino. Fuertes evidencias sugieren que en pacientes con EII existe una disrupción de las funciones de la barrera epitelial que se asocia a un aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, lo que permite el contacto de antígenos presentes en la luz intestinal con las células de la lámina propia y las consiguientes alteraciones de la respuesta inmune innata-adaptativa (Bernardo *et al.*, 2018).

##### 1.1.6.1. BARRERA EPITELIAL

El tracto gastrointestinal (GI) lo compone una capa continua de células epiteliales (CEI) que derivan de células madre del epitelio intestinal LGR5+. Estas células se diferencian en subtipos especializados: enterocitos (células de absorción intestinal),

células calciformes, células enteroendocrinas, células M y células Paneth, todas ellas implicadas en controlar la interacción entre la microbiota intestinal y las células del sistema inmunológico (Fig.3) (Cader *et al.*, 2013). Como primera línea de defensa de la mucosa intestinal frente a la invasión de patógenos extraños y antígenos está la capa de moco que recubre el epitelio intestinal.



**Figura 3. Esquema de la mucosa intestinal y del sistema inmune en el intestino delgado, (obtenido de Cader *et al.*, 2013).**

El moco es secretado por células calciformes y se forma mediante un proceso de polimerización de las mucinas, un tipo de glucoproteínas altamente hidrofílicas que pueden unirse al glicocáliz de la superficie de las células epiteliales (Kelsall, 2008). El moco es rico en anticuerpos tipo inmunoglobulina A (IgA), proteínas con actividad antibacteriana ( $\alpha$ - y  $\beta$  defensinas), enzimas proteolíticas y glucolíticas. La capa de moco está formada por una parte externa constituida por bacterias comensales, mucinas y péptidos antimicrobianos y otra interna completamente estéril (Maloy *et al.*, 2011).

El moco juega un papel crucial en la homeostasis intestinal ya que los bajos niveles de células calciformes y la alteración de la capa de moco permite la entrada de bacterias y su adhesión a las células epiteliales, lo que se considera un indicador de la EII. Además, diversos estudios han demostrado en ratones deficientes de MUC2 un

incremento de las citocinas proinflamatorias, el desarrollo de colitis y un aumento del riesgo de cáncer colorrectal (Wallace *et al.*, 2014; Choy *et al.*, 2017).

La segunda línea de defensa la constituyen las células epiteliales que están selladas mediante uniones estrechas y tienen como función el mantenimiento de la barrera, limitando la translocación de antígenos y regulando el tráfico de macromoléculas entre el entorno luminal y el huésped (Fasano *et al.*, 2005). Las uniones estrechas se componen por una red de proteínas denominadas ocludina y zonulina que controlan la absorción y la permeabilidad intestinal (Tripathi *et al.*, 2009).

Diversos estudios han observado en pacientes con EII una alteración de la red de proteínas que conforman las uniones estrechas; además el incremento de moléculas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-13, aumenta la permeabilidad, lo que desencadena un daño epitelial y la aparición de ulceraciones (Kelsall *et al.*, 2008, Coskun, 2014). En ratones knockout para la N-cadherina, molécula de adhesión que une a las células epiteliales, se desarrolla espontáneamente una colitis y se observa un aumento de células apoptóticas y huecos en el epitelio (Gross *et al.*, 2018).

A pesar de esta barrera, las bacterias y los antígenos luminales logran acceder a la lámina propia mediante fisuras no deseadas a través del epitelio asociado a folículo (EAF). Esta parte del epitelio cuenta con una larga capa de agregados linfoides (placas Peyer), en comparación con otras partes, está desprovista de células calciformes y presenta una menor cantidad de enzimas en la parte apical de los enterocitos (Mowat *et al.*, 1997). Además, forma una monocapa que separa al tejido linfoide asociado al intestino (GALT) del lumen intestinal.

El GALT se divide en dos compartimentos: a) inductor de la respuesta inmune intestinal que está constituido por folículos linfoides aislados o asociados, placas Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos; b) efector de la respuesta inmune y está integrado por poblaciones de linfocitos intraepiteliales (LIE) o de la lámina propia intestinal (LPI) (Dave *et al.*, 2014).

El EAF contiene a las células M, enterocitos que tienen como función facilitar el transporte epitelial a través de pinocitar o endocitar macromoléculas de la luz intestinal hasta la lámina propia. Además, tienen microvellosidades irregulares, no presentan ningún componente para secretar IgA y tienen menor actividad de la fosfatasa alcalina y de enzimas digestivas (Ayabe *et al.*, 2000, Vaishnava *et al.*, 2008). Otra característica importante del EAF es que, por debajo, en la región del domo subepitelial, existen una gran cantidad de células dendríticas, que capturan los microorganismos o antígenos reclutados por las células M y presentan los péptidos antigénicos a células T interfoliculares o a células T vírgenes (naive) dentro de los ganglios linfáticos mesentéricos (Newberry *et al.*, 2005).

Las células de Paneth son células epiteliales que se encuentran en la base de la cripta intestinal, contribuyen a la inmunidad innata del huésped, ya que censan la microbiota luminal. Además son responsables de sintetizar péptidos antimicrobianos que tienen como función evitar el contacto de bacterias con el epitelio y con ello asegurar una respuesta inmune efectiva. En pacientes con EC se ha visto que la expresión de estos péptidos es defectuosa (Zanello *et al.*, 2014). Estas células expresan NOD2, y sus polimorfismos representan la asociación genética más fuerte con la EC. Algunos pacientes de EII presentan una mutación de NOD2 asociada a una reducción de la expresión de  $\alpha$ -defensinas, lo que permite la colonización del intestino por bacterias patógenas y la alteración de la producción de citocinas por parte del sistema inmune (Kelsall *et al.*, 2008, Siegmund *et al.*, 2011, Geremia *et al.*, 2014).

En modelos murinos de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) se ha observado una alteración de la permeabilidad, la entrada de antígenos a la lámina propia y la activación de los mecanismos de inmunidad innata; en otros modelos, la administración prolongada de DSS activó los mecanismos de respuesta inmune adaptativa y originó una inflamación crónica (Ruiz *et al.*, 2017).

#### 1.1.6.2. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas son células fagocíticas, heterogéneas, de tipo mielocitoide y residentes de tejidos; se originan a partir de monocitos sanguíneos o un



progenitor común en la médula ósea (Niess *et al.*, 2005). Su principal función es controlar el microambiente, captar antígenos y reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante los receptores tipo Toll (TLRs). Con ello se inicia la respuesta inmunitaria, es decir, se induce tolerancia o se incita a una respuesta proinflamatoria para defensa del huésped; además, pueden controlar la interacción entre la inmunidad innata (Fig.4) y adaptativa (Rossi *et al.*, 2005). Esta dualidad de efectos se debe a que las células dendríticas presentan propiedades específicas que les permiten interactuar entre las células T, células B y el estroma (Rescigno *et al.*, 2009). Por otra parte, la evidencia sugiere que las células dendríticas intestinales migran continuamente en un estado inmaduro o tolerogénico y van captando antígenos directamente de la luz intestinal o bien transportándolos desde la luz intestinal a través de las células M (Niess *et al.*, 2005).

En circunstancias normales, las células dendríticas intestinales que presentan antígeno expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras y citocinas debido al contacto con células T que estimulan su diferenciación en células T reguladoras (Tregs) que producen citocinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . Por el contrario, en un microambiente proinflamatorio las CD se activan provocando su migración a áreas de GALT, donde inducen la respuesta de células T efectoras, cambian el patrón de expresión de receptores en su superficie e incrementan la secreción de factores proinflamatorios (Menning *et al.*, 2010). Estas células secretan diferentes citocinas y quimiocinas inflamatorias que “upregulan” o estimulan receptores involucrados en la activación de células T como CD80 y CD86; este proceso de activación puede inducir expresión del receptor de quimiocina CCR7 que facilita la migración dentro de los nódulos linfáticos e inicia la maduración (Middel *et al.*, 2006, Kmieć *et al.*, 2017).

Los estudios en modelos murinos de colitis apoyan firmemente la acumulación de CD activas, cuyo origen pueden ser precursores recién reclutados o células dendríticas *in situ* residentes en tejidos. Se ha observado una mejora de la colitis en aquellos ratones en los que se suprimieron las CD durante la administración de DSS; sin embargo, cuando se suprimieron antes de la administración, los ratones mostraron una colitis exacerbada, lo que sugiere una doble función de las CD (Inoue *et al.*, 2007).

Diversos estudios realizados en las mucosas de pacientes con CU y EC señalan que, las células dendríticas presentan un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en comparación con las CD de la mucosa control; además, pacientes con EC presentan niveles más altos de expresión de CD40 y una mayor producción de IL-12 e IL-6 que los controles. Estas células expresan el receptor de quimiocinas CCR7, que se une a CCL19 y CCL21, y contribuye a la atracción y retención de CD en la mucosa y promueve la inflamación. Además estas células tienen la capacidad de inducir el receptor homing  $\alpha 4\beta 7$  de la mucosa y el receptor CCR9 en las células T, lo que sugiere que puede dirigir a una célula T para que vuelva a su sitio original de activación (Mora *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2005).

#### 1.1.6.3. MACRÓFAGOS

Los macrófagos (M $\Phi$ ) son células relevantes en la respuesta inmune innata (Fig.4); se encuentran en un estado de activación continuo y se localizan en la lámina propia de la mucosa del tracto gastrointestinal y en el músculo liso del intestino (Smith *et al.*, 2005). Los macrófagos intestinales tienen una amplia gama de funciones, como el mantenimiento de la homeostasis intestinal, contribuyen a la tolerancia inmune y ejercen acciones inflamatorias. Estas células son derivadas de monocitos de sangre periférica y se reclutan en el intestino mediante quimiocinas, quimioatrayentes y productos de degradación bacteriana (Bain *et al.*, 2014).

Los M $\Phi$  residentes del colon expresan marcadores como son F4/80<sup>hi</sup>, MHCII, CD64, CD68<sup>+</sup>, CX3CR1<sup>hi</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD103 y Siglec F (CD170); además el marcador CX3CR1<sup>+</sup> solo se expresa en este tejido y es modulado por la IL-10 (Mowat *et al.*, 2011, Smith *et al.*, 2011, Zigmund *et al.*, 2014).

También existen otros marcadores como CD13, CD14 y CD70 que solo se expresan en M $\Phi$  intestinales (Grainger *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se ha encontrado una pequeña población de M $\Phi$  de la mucosa intestinal que expresan CD11c, que es un marcador específico de CD y un regulador positivo de la respuesta vía TLR4 (Liu *et al.*, 2018).

Por otro lado, los macrófagos se han clasificado en función del patrón de citocinas que secretan y pueden llegar a polarizar en macrófagos de “activación clásica” (M1) o bien macrófagos de “activación alternativa” (M2) (Wynn *et al.*, 2013). Su clasificación se traduce a un estado funcional e intercambiable según el microambiente en que se encuentre el macrófago, debido a la elevada plasticidad de estas células (Stout *et al.*, 2004, Mosser *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2014).

En la polarización de los macrófagos están implicados factores de transcripción como STAT1, STAT6, CARD5, IRF-4, IRF-5 y PPAR $\gamma$ . La activación del fenotipo M1 puede producirse mediante LPS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF y el fenotipo M2 con IL-4, IL-13 y M-CSF. Desde el punto de vista funcional y fenotípico ambas poblaciones se comportan de manera diferente, los M $\Phi$  M1, tienen mayor capacidad para la presentación de antígenos y son considerados proinflamatorios por producir citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23. Por otra parte, los M $\Phi$  M2 tienen mayor capacidad de fagocitosis mediada por receptores Fc $\gamma$ III (CD16) y mayor actividad inmunoreguladora ya que producen grandes cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$ . Este último es un quimioatrayente que incrementa el reclutamiento de otros macrófagos y neutrófilos a los sitios de inflamación. Una vez activados, expresan receptores TLR, NOD y de manosa C tipo 1 (CD206) para la detección de partículas opsonizadas y patógenos, lo que conduce a la fagocitosis (Stout *et al.*, 2004, Soehnlein *et al.*, 2010, Lawrence *et al.*, 2011). A su vez, el fenotipo M2 se subdivide de acuerdo al estímulo inductor: M2a activado por citocinas Th2 IL-4/IL-13, M2b, inducido por complejos inmunes y ligandos TLR y M2c estimulados en presencia de IL-10. Los M2, en general, no expresan citocinas proinflamatorias y son importantes en los mecanismos de regeneración mucosa (Martinez *et al.*, 2008, Mantovani *et al.*, 2013, Roszer *et al.*, 2015).

En la mucosa intestinal de pacientes con EC se ha observado la expresión de marcadores de M $\Phi$  y CD, así como la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-23, IL-6 o TNF- $\alpha$ ; este último factor también se ha encontrado aumentado en la CU (Kamada *et al.*, 2008).

Un reciente estudio *in vitro* demostró que los macrófagos M1 también pueden contribuir a la alteración de la barrera epitelial intestinal a través del incremento del

TNF, lo que afecta la estructura y la función de las uniones estrechas (Lissner *et al.*, 2015). En la EII, los macrófagos CD68<sup>+</sup> se infiltran en la mucosa y submucosa, así como en la capa muscular y el tejido adiposo submuscular. Estas células infiltradas muestran una expresión de receptores TLR2, TLR4 y TLR5, y su número es significativamente mayor cerca del epitelio y en capas de la lámina propia que en muestras control (Kühl *et al.*, 2015, Lissner *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha visto que en la mucosa del colon de pacientes con EC el número de macrófagos proinflamatorios CD14<sup>+</sup> -los cuales producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, IL-23 y TNF (pero no IL-12) en respuesta a bacterias comensales- es mayor que el detectado en la mucosa de individuos normales y pacientes con CU. Esta alteración en IL-23 se debió a la mayor cantidad de IFN- $\gamma$  en la mucosa intestinal (Kamada *et al.*, 2008, Kaser *et al.*, 2010).

Sin embargo, algunos estudios demuestran la prevalencia de marcadores de M $\Phi$  M2 en la mucosa de pacientes con EC o CU en comparación con el tejido intestinal normal (Kmieć *et al.*, 2017). Esta evidencia no solo se observa en pacientes, sino también en modelos experimentales de colitis, en los que se ha observado una mayor expresión de los macrófagos CD206<sup>+</sup> en mucosa afecta que en mucosa sana (Cosin-Roger *et al.*, 2013). La relevancia funcional de la expresión de estos marcadores por parte del macrófago es objeto de estudio en el momento actual.

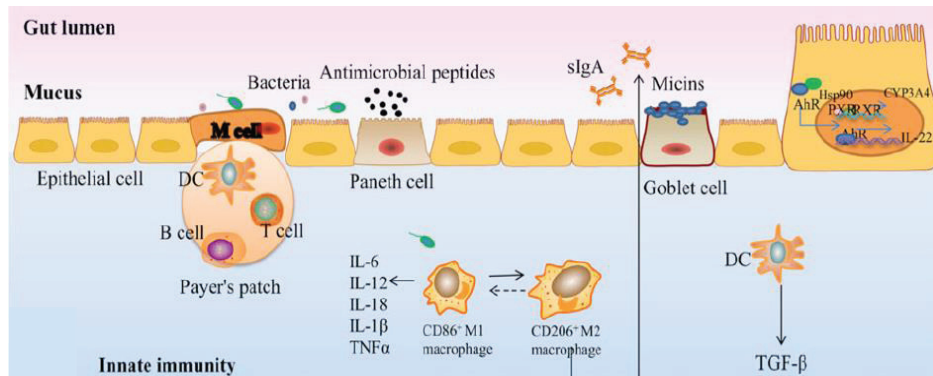


Figura 4. Diagrama esquemático del sistema inmune intestinal, (obtenido de Guo *et al.*, 2017).

#### 1.1.6.4. METABOLITOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA INMUNE

Tal como se ha comentado, en la activación del sistema inmune innato participan células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (Janeway *et al.*, 2002). Una vez que estas células reconocen el material extraño, se activan y tienen la capacidad de responder rápidamente produciendo una gran cantidad de mediadores como citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos para eliminar la infección.

La inducción rápida de la respuesta inmune representa una demanda altamente energética (O'Neill *et al.*, 2016). Recientemente se ha acuñado el término de "inmunometabolismo" para referirse al vínculo que existe entre el sistema inmune y el metabolismo; por ello consideramos de interés estudiar la reprogramación metabólica en la inflamación (Potter *et al.*, 2016).

La estimulación de células dendríticas y macrófagos puede darse por procesos metabólicos como el aumento concomitante de la glicólisis y la vía de la pentosa-fosfato acompañado de la disminución de la fosforilación oxidativa (Krawczyk *et al.*, 2010, Tannahill *et al.*, 2013).

El cambio en la glicólisis genera ATP para mantener el potencial de membrana mitocondrial y la homeostasis energética, lo que asegura la viabilidad y proliferación de células con capacidad biosintética como los macrófagos cuando se activan para producir citocinas (Everts *et al.*, 2012). Por otro lado, es importante señalar que existen

metabolitos como el citrato, NAD<sup>+</sup> y el succinato que tienen la capacidad de señalar e influir en la inmunidad (Rubin *et al.*, 2008, McGettrick *et al.*, 2013). El citrato se produce como parte del ciclo de Krebs (ciclo del ácido tricarboxílico) en la mitocondria y es importante para la biosíntesis de los ácidos grasos. Desde la mitocondria es transportado al citosol donde es escindido por la enzima ATP-citrato liasa que lo convierte en acetilCoA y oxalacetato, precursores de NO, ROS y ácido araquidónico (Tannahill *et al.*, 2013).

Actualmente no existen estudios que demuestren un papel directo del citrato en la inflamación, se ha descrito una elevación del citrato y una disminución del isocitrato en los macrófagos activados por lipopolisacárido (LPS), lo que apoya el papel proinflamatorio de este metabolito (Infantino *et al.*, 2011).

Otro metabolito conocido es NAD<sup>+</sup>, que regula la inflamación actuando a través de sirtuinas, las cuales se encuentran en mamíferos y pertenecen a la familia de desacetilasas dependientes de este metabolito que influyen en la estructura de la cromatina y la función de la proteína al eliminar los grupos acetilo (He *et al.*, 2012). La relación de las sirtuinas (sirt 1-7) con NAD<sup>+</sup>, ayuda a que actúen como sensores del estado energético de la célula: el metabolismo oxidativo determina la proporción de NAD<sup>+</sup> a NADH, mientras que la glicólisis promueve un cambio hacia NADH.

Se ha demostrado que Sirt1 reprime la inflamación y la glicólisis pero a su vez aumenta la lipólisis, la biogénesis mitocondrial, la autofagia y los antioxidantes (Liu *et al.*, 2013). Un ejemplo importante es la Sirt1 que desacetila e inactiva la subunidad p65 de NF-κB, un factor importante en procesos proinflamatorios. Diversos estudios señalan que después de la estimulación con LPS se presentaría una disminución de NAD<sup>+</sup>, esto perjudicaría la función de Sirt1 y mejoraría la señalización dependiente de NF-κB. Además, en macrófagos, Sirt1 perjudica la transcripción de otro factor proinflamatorio, actuando sobre la proteína activadora-1 (AP-1) activada y se dirige a sus subunidades c-Jun y c-Fos y de este modo disminuye la transcripción del gen que codifica para AP-1 y para la ciclooxigenasa 2 (COX2) (Zhang *et al.*, 2010).

Por otro lado, HIF-1α es un factor importante para aumentar la glicólisis y la respuesta inflamatoria, la Sirt1 actúa de manera similar desacetilando a la proteína HIF-

1 y evitando su interacción con p300 que es un co-activador transcripcional y se requiere para su activación (Lim *et al.*, 2010). Las investigaciones sugieren que las sirtuinas son enzimas reguladoras que ejercen múltiples mecanismos para disminuir la inflamación y sus funciones se pueden ver alteradas por las células tratadas con LPS provocando la disminución de NAD<sup>+</sup> y otros estímulos proinflamatorios (Mills and O'Neill, 2014).

El tercer metabolito importante en la respuesta inmune es el succinato, en forma de anión succinato interviene en el ciclo de Krebs, reduciendo al flavín adenin dinucleotido (FAD) y permitiendo así la generación de energía mediante la fosforilación oxidativa (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, otro papel importante que han discutido y reportado diferentes investigaciones es la acumulación de succinato para promover la señalización inflamatoria; diferentes estudios han contribuido en comprender los mecanismos por los cuales puede llegar a acumularse en las diversas células inmunitarias y su capacidad de señalar bien a través de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  o a través de su receptor, SUCNR1 (Kelly and O'Neill, 2015).

La acumulación del succinato puede deberse al aumento del metabolismo de la glutamina a través de la anaplerosis del  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) en el ciclo de Krebs. Además, se ha visto que el LPS aumenta el ácido g-aminobutírico (GABA) y sus transportadores, y que puede generar succinato a través de la "derivación GABA" (Mills and O'Neill, 2014). Otro posible mecanismo que puede contribuir a la acumulación es la derivación de glioxilato que convierte el isocitrato en succinato a través de la enzima isocitrato liasa (ICL). Aunque la mayoría de las enzimas mitocondriales pueden ver inhibida su actividad por la hipoxia, la de la isocitrato liasa aumenta y con esto se evita el colapso del potencial de membrana al permitir que el succinato se retroalimente del complejo II de la cadena transportadora de electrones.

Un último mecanismo es la disminución potencial de la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima responsable de la conversión de succinato a fumarato. Esta enzima requiere FAD y NAD<sup>+</sup> como cofactores, pero en circunstancias en las que se presentan en sus formas reducidas, i.e. en hipoxia, la función de la SDH se deteriora y se acumula succinato. Como se ha reportado anteriormente el LPS disminuye los niveles

de NAD<sup>+</sup> y puede llegar a afectar al FAD, lo que inhibe la función SDH (McKinney *et al.*, 2000, Cimen *et al.*, 2010, Ariza *et al.*, 2012).

Diversos estudios han descrito que la acumulación de succinato, como consecuencia de la inhibición de la SDH, conduce a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , mediante procesos directos o indirectos, como la inhibición del dominio de la enzima prolil hidroxilasa (PHD) en macrófagos o la inducción de ROS, que producen la oxidación de Fe<sup>2+</sup> (Kietzmann *et al.*, 2005, Guzy *et al.*, 2008). Por otra parte, la inducción sostenida de la citocina proinflamatoria, IL-1 $\beta$  mediante HIF-1 $\alpha$ , indica que el succinato puede regular directamente la inflamación por los macrófagos en situación de hipoxia e incluso en normoxia (Tannahill *et al.*, 2013). Sin embargo, las CD deficientes en HIF-1 muestran una capacidad alterada para activar las células T, lo que sugiere que este factor de transcripción es importante para la activación y polarización de las mismas (Wobben *et al.*, 2013). Con todo lo reportado, está claro que HIF-1 activa la inflamación al influir tanto en el sistema inmune innato como adaptativo y el succinato puede ser crucial en ambos casos a través de su efecto estabilizador de HIF-1 $\alpha$  (Hollander *et al.*, 2001, Dang *et al.*, 2011, Wobben *et al.*, 2013).

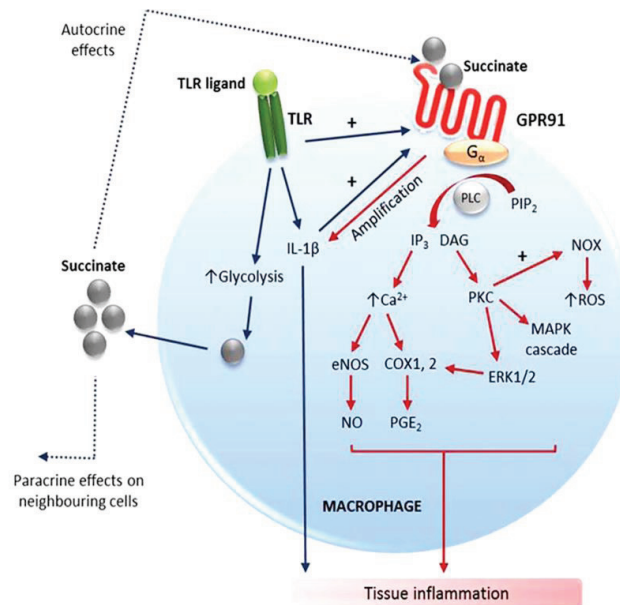
Previos estudios en modelos murinos determinaron la expresión de SUCNR1 en las CD y los macrófagos inmaduros (Rubic *et al.*, 2008). La activación del receptor por parte del succinato favorece la migración a los ganglios linfáticos y con ello un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias inducido por TLRs, lo que potencia la activación específica de antígenos para las células T helper provocando la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Se ha postulado que el succinato extracelular actúa como una alarma mediante la activación local de CD inmaduras que expresan SUCNR1 para iniciar o exacerbar la respuesta inmune (Littlewood *et al.*, 2016).

La “desorfanización” y la generación de ratones knock-out del receptor SUCNR1 ha permitido relacionar al succinato y su receptor con la biología de células dendríticas (Rubic *et al.*, 2008), hematopoyesis (Hakak *et al.*, 2009), activación de células estrelladas en un daño hepático (Correa *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2016), lipólisis en tejido adiposo (Regard *et al.*, 2008) y angiogénesis retinal (Sapieha *et al.*, 2008). Además, el papel del SUCNR1 se ha demostrado en la progresión de trastornos metabólicos como la diabetes



(Peti-Peterdi et al., 2008; Toma et al., 2008), hipertensión (He *et al.*, 2004; Sadagopan *et al.*, 2007) y aterotrombosis (Macaulay *et al.*, 2007).

Recientes investigaciones reportan un aumento en los niveles del succinato en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide; además, demuestran que el succinato, a través de la activación del receptor induce la secreción de IL-1 $\beta$  en un modelo *in vitro* (Littlewood *et al.*, 2016). Estas investigaciones sugieren que el receptor de succinato es una posible diana terapéutica para enfermedades inflamatorias debido al papel que presenta en la amplificación autocrina y paracrina de la inflamación por macrófagos (Fig. 5).



**Figura 5. Mecanismo de acción propuesto para el receptor de succinato, (obtenido de Recio *et al.*, 2018).**

### 1.1.7. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA INTESTINAL

La secreción de citocinas en respuesta a microorganismos es importante para dirigir la respuesta inmune innata hacia la respuesta adaptativa (Geremia *et al.*, 2014). Esta última presenta una elevada especificidad, ya que es resultado de una maduración de células T y B, además de generar memoria inmunitaria (Fig. 6) (Ahluwalia *et al.*, 2018).

### 1.1.7.1. CÉLULAS T

La presentación del antígeno a las células T por parte de las CD se realiza en los órganos linfoides secundarios (las placas Peyer, ganglios linfáticos mesentericos y los folículos linfoides aislados) y a continuación, las células T viajan al intestino para inducir una respuesta tolerogénica o inflamatoria (Choy *et al.*, 2017).

Un subgrupo de células T CD4<sup>+</sup> pueden activarse y diferenciarse en distintos tipos de células Th1, Th2 o Th17 y células T reguladoras (por ejemplo, FoxP3<sup>+</sup>) (Geremia *et al.*, 2014). La regulación de estos subgrupos pretende mantener la homeostasis inmune intestinal. Las células T auxiliares son importantes para la defensa contra patógenos y la entrada de microbiota luminal, pero la expansión y la hiperactividad de estas células T CD4<sup>+</sup> puede conducir a la inflamación intestinal (Fig. 6) (Abraham *et al.*, 2009).

Los estudios de la EII en ratones y humanos implican la desregulación de las células T, como por ejemplo las variaciones polimórficas en las células Th17 relacionados con la patogénesis de la enfermedad; además, en CU hay un aumento de la actividad de células Th2 y en la EC existe un aumento en la mucosa intestinal de células Th1/Th17 (Bernardo *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2016).

Las células Th1 intestinales responden a bacterias y virus intracelulares, se desarrollan en respuesta a IL-12 secretada por las CD y además expresan el factor de transcripción T-bet y secretan IFN- $\gamma$ . Las células Th2 son protectoras contra los parásitos y median las reacciones alérgicas; finalmente las células Th17 responden a patógenos extracelulares y se desarrollan en respuesta a TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 (Gerner *et al.*, 2013).

En la EII, las células Th17 son inducidas por IL23 y constituyen un importante mediador de la inflamación de la mucosa. Estas células expresan el factor de transcripción ROR $\gamma$ t, y su función está mediada por diferentes citocinas que incluyen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y GM-CSF (Leppkes *et al.*, 2009).

Los estudios experimentales han demostrado que la expresión de IL-17 puede inducir inflamación y daño en la mucosa o protección intestinal. En un modelo murino de colitis con DSS, la deficiencia de IL-17F resultó en una colitis reducida, mientras que

los ratones knock-out para la IL-17A desarrollaron una enfermedad más grave, demostrando así actividades opuestas de IL-17F e IL-17A (Tabarkiewicz *et al.*, 2015). La complejidad de la biología de la IL-17 también se ha destacado en estudios clínicos que muestran que su inhibición puede exacerbar la EC (Hueber *et al.*, 2012).

Las células Treg están implicadas de manera crucial en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal mediante la supresión de respuestas inmunes anormales contra los microorganismos habituales del intestino (Diaz *et al.*, 2015). Las células Treg expresan el factor de transcripción Foxp3 que es importante para su desarrollo y función (Hovhannisyan *et al.*, 2011; Nie *et al.*, 2015). Estas células pueden ejercer su mecanismo regulador a través de citocinas secretadas tales como IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-35 y la interacción célula-célula mediada por proteínas de superficie (CTLA-4, GITR y OX40) (Josefowicz *et al.*, 2012, Mayne *et al.*, 2013). Sin embargo, alteraciones en el mecanismo regulador en la EII pueden deberse a la resistencia que presentan las células T efectoras para realizar la apoptosis, o bien a la plasticidad de las células Treg que en respuesta a la inflamación pueden convertirse en células Th1 y Th17 (Yu *et al.*, 2007, Fantini *et al.*, 2007, Geremia *et al.*, 2014).

#### 1.1.7.2. CÉLULAS B

El papel de las células B en la respuesta inmune adaptativa es la producción de anticuerpos IgA que contribuyen a la protección inmune y evitan la inflamación. Diversos estudios en modelos de colitis señalan que estas células pueden tener una actividad antiinflamatoria o proinflamatoria dependiendo de las señales que se presenten en la mucosa (Brandtzaeg *et al.*, 1999, Macpherson *et al.*, 2004). En la EII, las células B producen IgG, IgM e IgA. En la EC se presenta un aumento de la IgG, lo que desencadena una falta de tolerancia en el intestino y los subtipos de IgG-1, IgG-2 e IgG-3 están elevados tanto en suero como en mucosa intestinal (Silva *et al.*, 2018). Además, la presencia de anticuerpos antimicrobianos como el anticuerpo anti-flagelina, dirigido contra el citoplasma del neutrófilo (ANCA) y anticuerpo contra *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) sirven como marcadores de la enfermedad. El anticuerpo ANCA se encuentra presente en pacientes con CU y el anticuerpo ASCA en pacientes con EC.

I. RESUMEN

Finalmente es importante señalar que las células B también pueden expresar citocinas inmunomoduladoras tales como IL-10 o TGF- $\beta$  (Gerner *et al.*, 2013).

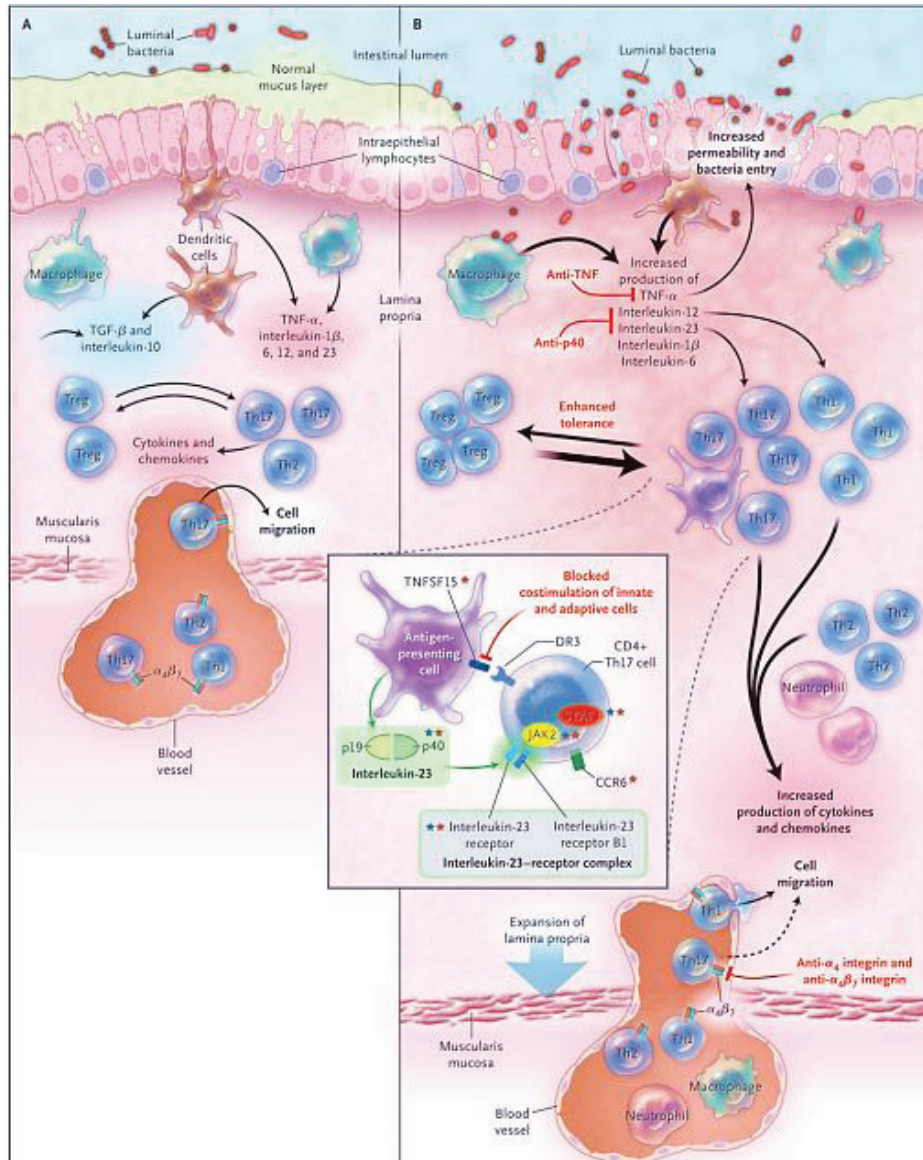


Figura 6. El sistema inmune intestinal normal y alterado, (Obtenido de Abraham *et al.*, 2009).

### 1.1.8. ALTERACIÓN DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso intracelular altamente preservado en eucariotas que se encarga de mantener la homeostasis celular y tisular mediante el catabolismo y reciclaje de componentes celulares y la regulación metabólica (Yang *et al.*, 2010, Baxt and Xavier *et al.*, 2015, Pavel *et al.*, 2017). La autofagia influye en procesos como, desarrollo, diferenciación, supervivencia, senescencia y la inmunidad innata y adaptativa, por lo que su disfuncionalidad puede desencadenar enfermedades inflamatorias crónicas (Fig.7), entre ellas la EII (Levine *et al.*, 2008).

Las primeras investigaciones reportadas entre autofagia y la EII fueron a través del GWA<sub>s</sub>, donde se observó que la presencia de polimorfismos en genes implicados en este proceso se asociaba a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Rioux *et al.*, 2007, Randall-Demllo *et al.*, 2013).

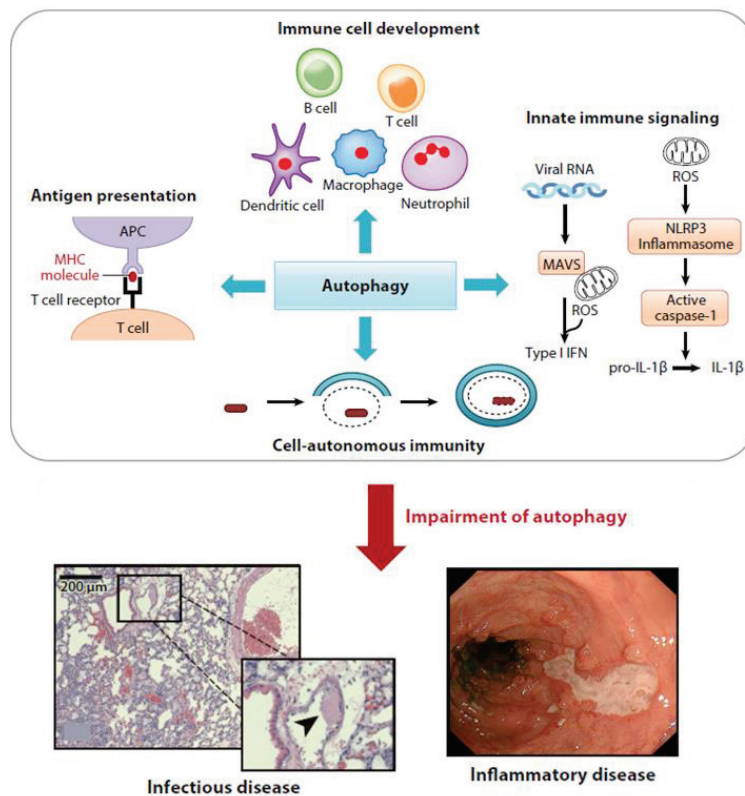


Figura 7. El papel de la autofagia en la inmunidad, (obtenido de Matsuzawa *et al.*, 2018).

#### 1.1.8.1. MECANISMO MOLECULAR

La autofagia es un mecanismo de respuesta al estrés celular o inanición y su papel fundamental es controlar la homeostasis a través de las células que forman la barrera epitelial y las células inmunes en el intestino, que deben defenderse frente a los gérmenes patógenos y tolerar a los microorganismos comensales; la autofagia comporta la degradación en el citoplasma de proteínas mal plegadas u organelos aberrantes, así como de patógenos que, una vez secuestrados por las vesículas de doble membrana, se internalizan para su degradación lisosomal (Van der Sluis *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2008, Mizushima *et al.*, 2011, El-khinder *et al.*, 2016).

La autofagia se divide en tres tipos (Fig. 8):

1) Microautofagia, consiste en la endocitosis de materiales citosólicos mediante la invaginación de las membranas lisosomales/vacuolares para la envoltura de componentes citoplasmáticos.

2) Mediada por chaperonas (CMA), permite la degradación de proteínas mal plegadas y para su descomposición requieren de la orientación de proteínas que presenten una secuencia consenso (KFERQ), las cuales son reconocidas por un conjunto de chaperonas citosólicas (HSPA8) y son transportadas por un receptor llamado LAMP-2A para su degradación lisosomal.

3) Macroautofagia o mejor conocida como autofagia, es un proceso catabólico, donde los componentes intracelulares o bacterias patógenas están rodeados por vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas que engloban el material a degradar.

Es importante señalar que, a diferencia de los autofagosomas, los lisosomas solo presentan una membrana que se forma para la digestión de componentes por las lisozimas (Kundu *et al.*, 2008, He *et al.*, 2008, Huber *et al.*, 2016, Xilouri *et al.*, 2016 Deretic *et al.*, 2018).

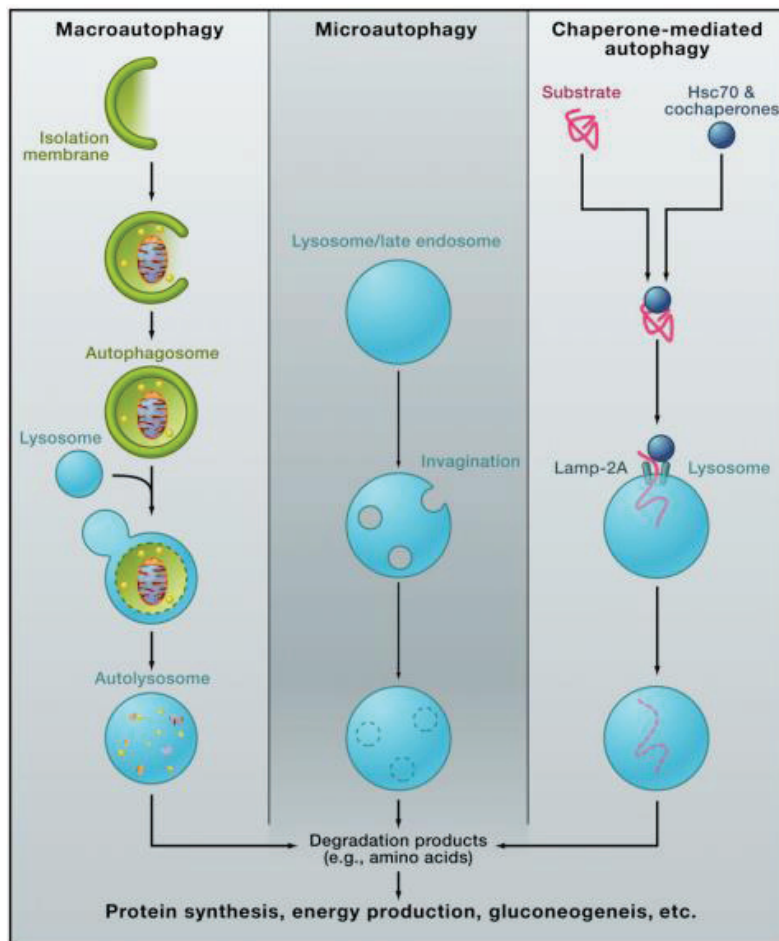


Figura 8. Diferentes tipo de autofagia, (obtenido de Mizushima & komatsu 2011).

La autofagia consta de las siguientes fases: iniciación, nucleación, elongación y fusión; estas etapas requieren la acción de proteínas relacionadas con la autofagia (ATG), ya que son cruciales en la formación y degradación del autophagosoma (Fig.9) (Mizushima & komatsu 2011).

En general, la autofagia (Fig. 9) inicia la formación de fagóforos, constituidos por una sola capa membranal que puede provenir del retículo endoplasmático (RE) (Ylä-Anttila *et al.*, 2009, Ke *et al.*, 2017) y que tienen la capacidad de retener material citosólico. Posteriormente, en el sitio de ensamblaje del fagóforo, donde se localizan proteínas ATG, se lleva a cabo la formación de vesículas de doble membrana denominadas autophagosomas. Su formación está regulada por dos sistemas de

conjugación de proteínas ubiquitinadas: un sistema es LC3 (cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada al microtúbulo)/ATG8 que se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) que conduce a su forma lipidada LC3-II. Esto se lleva a cabo mediante el precursor de LC3 que es procesado por la proteasa ATG4B a la forma madura de LC3-I que es conjugada con PE a través de la enzima ATG7 y ATG13.

El segundo sistema es ATG12 que se conjuga con ATG5 para formar el complejo con ATG16L1 y la interacción de GTPasa Rab33, complejo que tiene la función de especificar el sitio de lipidación de LC3 para la elongación de la membrana del autofagosoma (Fujita *et al.*, 2008), a partir de las mitocondrias, el compartimento intermedio entre RE-aparato de Golgi (RE-Golgi), endosomas y membrana plasmática (Orsi *et al.*, 2012, Ge *et al.*, 2013, Puri *et al.*, 2013).

Posteriormente, tras completarse la formación del autofagosoma, el complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 se disocia de la membrana externa y pasa al citosol donde se recicla; de igual manera el LC3-II de la parte externa es separado por la acción del ATG4B; sin embargo, el LC3-II unido a la membrana interna del autofagosoma permanecerá allí hasta llegar al lisosoma donde se llevará a cabo su degradación y su digestión (Ke *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2016).

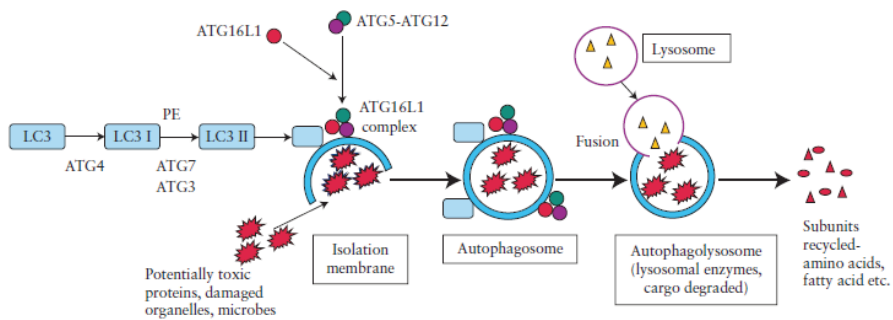


Figura 9., La vía de la autofagia, (obtenido de Hooper *et al.*, 2017).

Otras moléculas importantes conocidas como receptores de carga autofágica son la proteína p62/SQSTM1, NBR1, OPTN y NDP52 que presentan un motivo de unión a la proteína LC3 y un motivo que reconoce sustratos poliubiquitinados. Estos también se degradan en autofagosomas y sirven como etiqueta para la formación de agregados de



proteínas para su degradación. También pueden ejercer la función de adaptadores en la unión de proteínas ubiquitinadas y son importantes en ensayos para monitorizar los niveles de autofagia (Birgisdottir *et al.*, 2013, Ryter *et al.*, 2014, Klionsky *et al.*, 2016, Matsuzawa *et al.*, 2017).

Las vías de señalización que participan en la iniciación y regulación de la autofagia (Fig. 10) son la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), Akt y Ras/Mek/Erk de clase I que se activa por la cantidad de nutrientes, la estimulación de factores de crecimiento, la fosforilación de la vía Akt y la formación del mTOR complejo 1 (mTORC1). La actividad de este último complejo tiene la capacidad en condiciones basales de inhibir la autofagia mediante la fosforilación de Unc-51 y a su vez inhibir al ATG1 (ULK-1) e inactivar al complejo ULK1-ATG13-FIP200 que es importante para el inicio de la formación del autofagosoma; sin embargo, el mTORC1 es la diana del antibiótico rapamicina que es capaz de bloquear la actividad de esta proteína y estimular la inducción de la autofagia (Kroemer *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010)

La proteína cinasa activadora por AMP (AMPK) inhibe a mTORC1 y activa la autofagia a través de la fosforilación de ULK1. Además, la actividad AMPK activa la vía inductiva por la señalización PI3K-Beclin1 de clase III que consiste en un complejo Vps34-Vps15-Beclin1(Atg6); la interacción de este complejo con ATG14 es importante para el reclutamiento de proteínas de autofagia, incluyendo el complejo ATG16L1 y LC3/ATG8 para la biogénesis membranal del autofagosoma (Fujita *et al.*, 2008, Rusell *et al.*, 2013, Ke *et al.*, 2016).

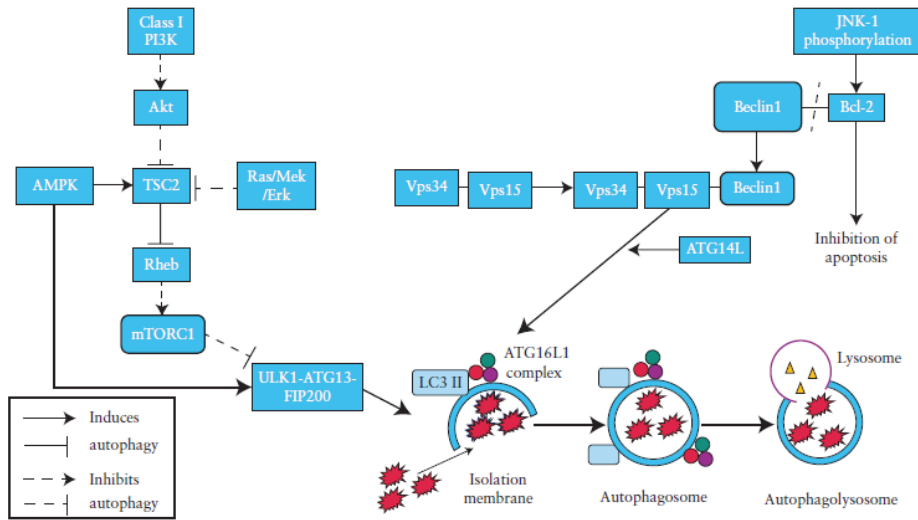
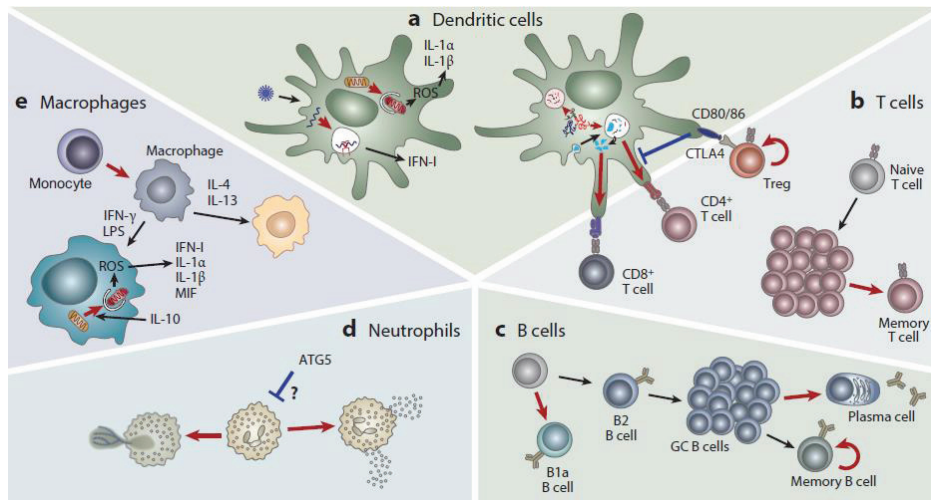


Figura 10. Regulación de la autofagia, (Hooper *et al.*, 2017).

Finalmente, algunos defectos de la autofagia influyen en diferentes procesos que pueden tener efectos en la progresión de ciertas enfermedades, tales como, cáncer, infecciones, enfermedades metabólicas, inflamatorias e inmunológicas (Wu *et al.*, 2010, Canonico *et al.*, 2016, Deretic *et al.*, 2018).

### 1.1.8.2. AUTOFAGIA E INFLAMACIÓN

Diversas investigaciones señalan que existe una asociación compleja entre la autofagia y la inflamación debido a que la autofagia influye en la supervivencia de células inflamatorias (Fig. 11) tales como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos (Qian *et al.*, 2017).



**Figura 11. Autofagia en el desarrollo y la función de la célula inmune, (obtenido de Matsuzawa *et al.*, 2018)**

La función de la autofagia en la viabilidad celular y el metabolismo explica su importancia en la diferenciación de células inmunitarias. En los macrófagos, este proceso regula el destino del material fagocitado, así como su diferenciación y activación. Esto ocurre a través de la unión de M-CSF (CSF-1) con su receptor lo que induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> y la activación de ULK-1. Otro factor de diferenciación es el GM-CSF que fosforila BCL2 por cinasas c-Jun N-terminal (JNK) que disocian la interacción entre BCL-2 y Beclina-1 para la activación de la autofagia (Jacquel *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012, Obba *et al.*, 2015).

Por otro lado, cuando se produce un sesgo metabólico en los macrófagos por la deficiencia de ATG7 que conduce a la glicólisis, se produce una inhibición de la autofagia y un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como, como interferón tipo I (IFN-I), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Saitoh *et al.*, 2008, Castillo *et al.*, 2012, Stranks *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2016). Recientes experimentos en macrófagos tratados con LPS o IL-10, muestran que la activación de la autofagia contrarresta el estado inflamatorio del macrófago provocado por el aumento de la glicólisis; a su vez la IL-10 puede inhibir la señalización de mTOR e inducir la mitofagia para lograr el balance en la producción de ROS y el inflamasoma (Ip *et al.*, 2017). La acción de la mitofagia sobre los macrófagos es

llevarlos a un estado de letargo; debido a esto en MΦ M1 es importante la glicólisis y en MΦ M2 la fosforilación oxidativa (Esteban-Martínez *et al.*, 2017, Ip *et al.*, 2017).

Además, la autofagia presenta una importante función de coordinación entre la inmunidad innata y adaptativa para la presentación de antígenos por las CD. Se considera que la autofagia influye en que los antígenos citosólicos puedan acceder a los endosomas para ser reconocidos por las moléculas de MHC-II (Nimmerjahn *et al.*, 2003, Dorfel *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2011). En las CD, durante una infección por virus, se ha visto el papel clave de la proteína ATG12 en la presentación de antígenos, así como el ATG5 y ATG7 en la proliferación celular CD4+ y la producción de IFN-γ (Shmid D. and Münz C., 2007, Uhl *et al.*, 2009, Mintern J.D. and Harris J., 2015).

Otro papel de la autofagia en las CD es la regulación de la producción de citocinas; en condiciones de inhibición de la autofagia, se acumulan ROS, los cuales median la diferenciación de células T productoras de IL-17 que tiene como consecuencia final un aumento de citocinas IL-1α e IL-1β (Lee *et al.*, 2007).

El mecanismo por el cual la autofagia mantiene la supervivencia de las células T depende de la etapa de diferenciación en la que se encuentren las células; sin embargo, la autofagia disminuye durante la proliferación (Pulleston *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). La activación de las células T depende del proceso de autofagia mediado por chaperonas (CMA), donde las proteínas citosólicas se llevan directamente al lisosoma (Valdor *et al.*, 2014).

La autofagia presenta un papel crítico en la diferenciación y supervivencia de las células plasmáticas secretoras de anticuerpo y para la generación de células B (B1a y B2) en su estado estacionario (Miller *et al.*, 2008, Conway *et al.*, 2013, Pengo *et al.*, 2013,). Las investigaciones señalan que, durante un proceso de infección por virus, las células B de la línea germinal van hacia la proliferación y diferenciación por la alta tasa de recambio de LC3-II que es señal de una autofagia activada; de esta forma la autofagia y homeostasis mitocondrial son independientes de ATG16L1, lo que sugiere una nueva forma de autofagia que contribuye en la regulación de células B (Martínez-Martin *et al.*, 2017).

## 1.1.8.3. PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN LA EII

El proceso disfuncional de la autofagia con relación a la EII puede deberse a las variantes de los genes Atg, lo que afecta a la respuesta inmune innata-adaptativa a nivel intestinal (Fig.12). Esto incluye anomalías en el aclaramiento bacteriano, fúngico y viral, además de la producción de AMP por las células Paneth, alteración de las células goblet, presentación de antígenos y la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, producción de citocinas, disminución de la producción de moco y una mala absorción de las microvellosidades intestinales (Sharl M. and Rogler C., 2012, Baxt L.A. and Xavier R.J., 2015).

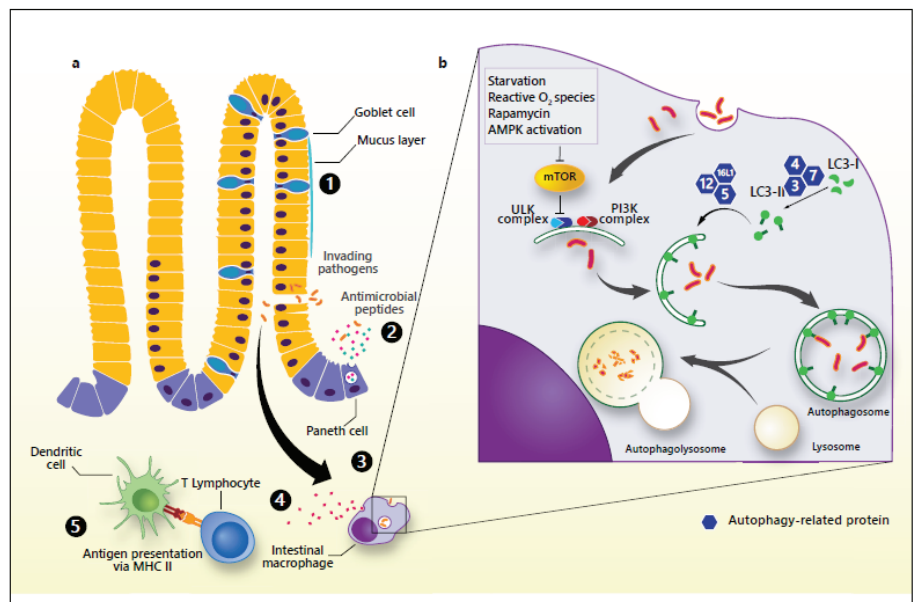
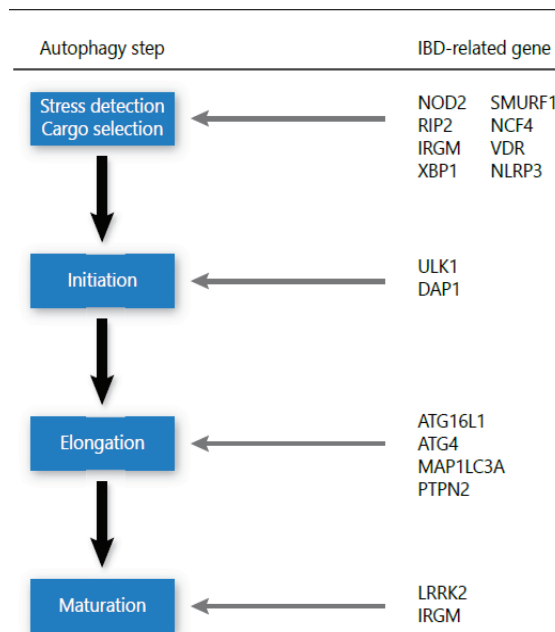


Figura 12. El proceso paso a paso de la autofagia y los sitios de disfunción en la EII, (obtenido de Elkhinder *et al.*, 2016).

Las mutaciones en los genes relacionados con la activación de la autofagia es uno de los principales factores para el desarrollo de la EII (Fig. 13); las alteraciones de estos genes ejercen un efecto sobre las proteínas y moléculas que regulan la autofagia con relación al estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inmunológica (Shih *et al.*, 2008, Ishiara *et al.*, 2009, Stappenbeck *et al.*, 2011; Huett *et al.*, 2010).

Uno de los polimorfismos relacionados con la CU y EC está presente en el locus Xbp1 que es un componente clave de la respuesta a estrés del retículo endoplasmático relacionado genéticamente con la autofagia. La deleción de este gen en células epiteliales del intestino aumenta la susceptibilidad a la colitis por las señales inflamatorias de la mucosa, por el incremento de productos bacterianos y por el TNF- $\alpha$  (Kaser A. and Blumberg R.S., 2010).

Los polimorfismos genéticos de ATG16L1 e IRGM están relacionados con la alteración de la autofagia e inmunopatogenia de la EII (Hampe *et al.*, 2007, Cummings *et al.*, 2007). El gen IRGM se expresa en diferentes tejidos como son el colon, intestino delgado, leucocitos de sangre periférica y monocitos; codifica para la guanosinatrifosfato (IRGs) y está relacionado con la inducción de IFN y eliminación de patógenos (McCarrol *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2006).



**Figura 13.** Los alelos de riesgo para la EII se encuentran en múltiples componentes de la vía de autofagia, (obtenido de Elkhinder *et al.*, 2016).

Por otro lado, el gen Atg16L1 codifica para una proteína que forma parte del complejo Atg12-Atg5 que es importante para la formación del autofagosoma (Salem *et*

*al.*, 2015). Se expresa en células epiteliales intestinales, CD y células T humanas, además de regular la producción de IL-1B inducida por endotoxinas (Saitoh *et al.*, 2008). Algunas investigaciones señalan que, ratones deficientes en este gen y tratados con DSS muestran mayor susceptibilidad a desarrollar colitis (Cadwell *et al.*, 2008). Estos resultados demuestran el papel principal de la autofagia en la regulación de la respuesta inflamatoria, así como la función del autofagosoma para procesar las bacterias intracelulares (Kaser A. and Blumberg R.S., 2010, Levine *et al.*, 2011).

Las proteínas NOD son un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones con funciones importantes en la inmunidad innata; actúan como sensores citoplasmáticos de componentes microbianos, lo que permite la regulación de procesos inflamatorios y la apoptosis (Saleh M., 2011). La estimulación de NOD2 lleva a la activación de la vía NF-κB y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) que conducen a la producción de mediadores proinflamatorios (Negroni *et al.*, 2018). Los receptores NOD1 y NOD2 se encargan de reclutar a la proteína ATG16L1 que será transportada hacia la membrana plasmática para la entrada de bacterias; con ello respaldan la idea de que la patología es consecuencia de un defecto en la respuesta inmune innata y en el procesamiento bacteriano, así como de la persistencia de la inflamación en la mucosa (Cooney *et al.*, 2010, Travassos *et al.*, 2010).

En los últimos años, diferentes estudios han contribuido al esclarecimiento de la etiopatogenia de la EII, y se han realizado avances en el tratamiento farmacológico de esta enfermedad. Sin embargo, continúa existiendo un porcentaje considerable de pacientes con EII que no responden a la terapia convencional (Gilroy L. and Allen P.B., 2014, de Ridder *et al.*, 2015), lo que hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (Sun X. and Zhu M.J., 2017). La presente tesis doctoral tiene como objetivo, evaluar el efecto de diferentes compuestos bioactivos en la colitis murina y analizar el papel de ciertos metabolitos endógenos en la etiopatogenia de la inflamación y fibrosis intestinal.

## I.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante un largo periodo de tiempo, diversas investigaciones se han enfocado en obtener nuevos fármacos para el tratamiento de la EII (Hooper *et al.*, 2017) ya que los actuales presentan limitaciones en muchos pacientes, y no consiguen prolongar los periodos de remisión clínica y ralentizar el curso destructivo y progresivo de la enfermedad (Chen *et al.*, 2017). Esto obliga necesariamente a obtener un mejor conocimiento de la etiopatogenia de la EII con el fin de poder implementar nuevas herramientas farmacológicas.

La EII engloba dos entidades clínicas, la CU y la EC. Aunque difieren en algunas características clínico-patológicas, ambas comparten la presencia de una inflamación crónica en el tubo digestivo y la alteración de la función barrera epitelial. Debido a ello existe un gran interés en la búsqueda y caracterización de principios activos con efectos antiinflamatorios o capaces de reforzar la función barrera. De igual forma, la investigación sobre el potencial inflamatorio de diferentes metabolitos secundarios suscita en el momento actual un gran interés (Suh *et al.*, 2014, Vezza *et al.*, 2016, Rosillo *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2013, Tan *et al.*, 2015, Salaritabar *et al.*, 2017).

Estudios previos sobre la familia de las cactáceas, señalan que sus pigmentos pueden ser de gran utilidad para la industria alimentaria y farmacéutica. Dentro de esta familia, extractos obtenidos a partir de especies del género *Hylocereus*, como la fruta del dragón, parecen presentar propiedades antioxidantes (Hor *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2014) así como inducir efectos beneficiosos en enfermedades hepáticas, renales y en el síndrome metabólico (Ramli *et al.*, 2014). Nuestro trabajo muestra la capacidad del extracto etanólico de *Hylocereus polyrhizus* (EH) de inducir una acción antiinflamatoria y prevenir la colitis en un modelo murino.

En la presente tesis utilizamos el modelo murino (ratones Balb/c) de colitis inducido por una sola administración de TNBS, este compuesto se disuelve en etanol y tras su administración intrarectal provoca una alteración en la mucosa que permite la interacción del TNBS con las proteínas tisulares del colon (Eri *et al.*, 2008). Un día después de su administración, los animales sufren una evidente pérdida de peso



corporal, una inflamación crónica y extensas ulceraciones colónicas, características similares a las que se manifiestan en la EII, particularmente en la enfermedad de Crohn humana (Garrido *et al.*, 2015, Antoniou *et al.*, 2016). Sin embargo, posterior a los dos días de la lesión, los ratones inician su recuperación.

La administración intraperitoneal de EH (a dosis inferiores a las reportadas como tóxicas) (Hor *et al.*, 2012), previno significativamente la pérdida de peso corporal inducida por el TNBS. A nivel macroscópico se observó una reducida inflamación y ulceración colónica y a nivel histológico una estructura más preservada de las criptas y una escasa infiltración celular en comparación con lo detectado en los ratones que fueron tratados con el vehículo.

Diversos estudios han señalado el papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la EII en humanos y en los modelos murinos de colitis (Pavlick *et al.*, 2002; Seril *et al.*, 2003, Impellizzeri *et al.*, 2014). Nuestros datos muestran que los ratones tratados con TNBS presentan una mayor infiltración celular y una mayor actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en el colon, probablemente debida a la mayor infiltración de neutrófilos (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2005). Estas células se asocian con la producción y liberación de citocinas proinflamatorias que inician y perpetúan la inflamación de la mucosa (Danese 2012); en este sentido nosotros detectamos en el tejido colónico de ratones tratados con TNBS, un incremento en la expresión del mRNA de iNOS, COX2, Arginasa I y citocinas tales como, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

La administración de EH evitó significativamente el aumento de la actividad MPO, redujo la infiltración celular y disminuyó la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por el TNBS. La revisión en conjunto de los resultados sugiere una actividad antiinflamatoria por parte del extracto etanólico de *H. polyrhizus* (EH). Reforzando esta observación nuestros datos demuestran que la administración de EH previno la traslocación nuclear del NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción central en la producción de mediadores proinflamatorios asociados con la colitis experimental (Spehlmann *et al.*, 2009, Tan *et al.*, 2015).

La actividad de NF- $\kappa$ B (Allegra *et al.*, 2011) es modulada por los niveles de estabilidad de I $\kappa$ B $\alpha$  y nosotros observamos que el EH previno la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$

citoplasmático asociada al TNBS. Esto podría explicar la menor translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo detectada, así como la reducida transcripción de los genes promotores de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), expresión de enzimas (iNOS, COX-2), receptores celulares de superficie y moléculas de adhesión (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2005, Allegra *et al.*, 2014). Existen evidencias de la activación del NF- $\kappa$ B en pacientes con EII, lo que podría proponer a este factor como diana terapéutica (Ren *et al.*, 2014). Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el fruto de *H. polyrhizus* induce acciones antiinflamatorias a través de la modulación de NF- $\kappa$ B. El análisis de LC-MS/MS para determinar los posibles compuestos antiinflamatorios presentes en el EH del fruto *H. polyrhizus*, demostró la presencia de compuestos como flavonoides, polifenoles y ésteres de ácidos grasos, luteolina, ácido elágico y p-HPEA-A, (Rosillo *et al.*, 2011, Zhuo *et al.*, 2014, Mitzushina *et al.*, 2014).

Previos estudios han señalado que la actividad antiinflamatoria del ácido elágico está mediada por la inhibición de la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B (Umesalma *et al.*, 2010). Además, es importante señalar que el ácido elágico y luteolina se han detectado unidos a glucósidos y esta unión ejerce propiedades prebióticas (Wichienchot *et al.*, 2010), lo que sugiere que el ácido elágico podría estar involucrado en los efectos protectores de la colitis observados por el EH.

Aparte de estos compuestos, el EH también presenta betaxantinas, específicamente la hilocerenina tricarboxilada, pero no hay evidencias de una acción antiinflamatoria de este metabolito (Herbach *et al.*, 2006). En contraposición, el extracto metanólico de *H. polyrhizus* presenta metabolitos precursores de la síntesis de betalainas (betaninas y betaxantinas) que sí que tienen propiedades antiinflamatorias (Vidal *et al.*, 2014, Tan *et al.*, 2015). Es por ello que nuestro siguiente objetivo fue caracterizar los posibles efectos de la betanina, un pigmento natural considerado un metabolito secundario de las cactáceas, sobre la colitis murina.

Además de una importante inflamación colónica, los ratones tratados con TNBS presentan una alteración del flujo autofágico asociado con la fosforilación del mTOR en la mucosa intestinal, en línea con lo observado en pacientes con EII y en un modelo de colitis inducido por DSS (Ortiz-Masia *et al.*, 2014). Es por ello que nos planteamos

analizar si la betanina podía modular la autofagia y como consecuencia ejercer una protección sobre la colitis. Para ello, añadimos al estudio dos conocidos estimulantes de la de la autofagia, el inmunosupresor rapamicina que es un inhibidor de mTOR (Ravikumar *et al.*, 2004) y el disacárido trehalosa que es inductor autofágico independiente de mTOR (Sarkar *et al.*, 2007).

Nuestros resultados mostraron que los tres agentes redujeron la colitis inducida por TNBS y revirtieron la inhibición del flujo autofágico asociada. Además, los efectos de la betanina fueron dependientes de mTOR y revertidos con el uso de 3MA (3-metiladenina), un bloqueante del flujo autofágico. Esto, unido al hecho de que los tres agentes únicamente tienen en común la capacidad de estimular la autofagia, demuestra el papel protector de este proceso en la colitis murina. Estudios previos han reportado beneficios de la activación de la autofagia en enfermedades neurodegenerativas (Sarkar 2013,), lesión de la médula espinal (Wang *et al.*, 2014) y daño hepático (Zhu *et al.*, 2015).

Se han descrito diferentes mecanismos que podrían explicar los efectos protectores de la autofagia sobre la colitis. Entre ellos se sugiere que la autofagia puede prevenir la inflamación a través de la degradación selectiva de complejos inflamatorios (Nakahira *et al.*, 2011; Lapaquette *et al.*, 2015; Netea-Maier *et al.*, 2016). Además, una autofagia defectuosa se ha asociado con una reducida secreción de moco (Tsuboi *et al.*, 2015) o la activación del inflammasoma en células mieloides (Lee *et al.*, 2016) y una mayor susceptibilidad a la colitis. Nuestros resultados muestran, en la mucosa de los ratones tratados con TNBS, una alteración en la autofagia y altos niveles de BCL10 citosólico, proteína que forma un complejo proinflamatorio involucrado en la sinergia y activación constitutiva de NF- $\kappa$ B y p50 a través de la vía canónica por la interacción IKK (fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ ) y la vía no canónica (fosforilación de NIK) (Bonizzi y Karin, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Wu y Ashwell, 2008).

Estudios previos han demostrado que la degradación de BCL10 por autofagia es un proceso que requiere de la expresión del complejo IKK o bien de p62 (Paul *et al.*, 2012), Nosotros observamos, en la mucosa de ratones tratados con TNBS, un incremento de la proteína BCL10 en paralelo a un aumento significativo en la relación pI $\kappa$ -B $\alpha$ /I $\kappa$ -B $\alpha$ . Es de interés destacar que la administración de betanina, rapamicina o

trehalosa a ratones tratados con TNBS redujo los niveles de proteína tanto de BCL10 como de p62. Además, la inhibición de la formación de autofagosomas con 3MA evitó la disminución de las proteínas BCL10 y p62 inducida por la betanina, lo que sugiere firmemente la degradación de BCL10, por la estimulación de la autofagia y una posterior reducción en la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, no se puede descartar una degradación directa de los complejos NF- $\kappa$ B p65-I $\kappa$ B por la autofagia (Chang *et al.*, 2013).

En resumen, nuestros resultados muestran que la activación farmacológica de la autofagia de la mucosa favorece la degradación del complejo BCL10 y reduce la inflamación inducida por TNBS.

En los últimos años se ha puesto de relevancia la actividad proinflamatoria de diferentes metabolitos secundarios. Entre ellos, se le ha atribuido al succinato, metabolito generado en el ciclo de krebs, un papel en la inflamación crónica y en las alteraciones metabólicas propias de la obesidad y otras comorbilidades tales como, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Serena *et al.*, 2018) (Tan *et al.*, 2017). Esta acción del succinato se observa en circunstancias en donde este metabolito se acumula y tras salir al exterior celular, señala a través de un receptor denominado receptor de succinato, "suncr1", que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G.

Nuestros datos muestran elevados niveles séricos e intestinales de succinato en pacientes con EC lo que sugiere que este metabolito se acumula en las células del intestino dañado (van Diepen *et al.*, 2017, Ariza *et al.*, 2012), (Tannahill *et al.*, 2013, Littlewood-Evans *et al.*, 2016) (Rubic *et al.*, 2008), y tras ser liberado al medio extracelular, llegaría al torrente sanguíneo. En esta línea, otros trabajos realizados en pacientes con EII reportan elevados niveles de succinato en suero (Shiomi *et al.*, 2017) y heces fecales (Osaka *et al.*, 2017). Estudios previos han mostrado la regulación positiva del receptor SUCNR1 por parte del succinato (Li *et al.*, 2015, Littlewood-Evans *et al.*, 2016, Le *et al.*, 2018) y nuestros datos revelan una mayor expresión del receptor SUCNR1 en la mucosa intestinal de pacientes con EC, principalmente localizada en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos.

Es de interés destacar que los pacientes con EC incluidos en nuestro estudio se caracterizan por presentar un complicado patrón fibrótico intestinal. Nosotros hemos visto, en fibroblastos intestinales de pacientes con EC, una mayor expresión de *Sucnr1* que en los obtenidos de pacientes control, lo que sugiere que los elevados niveles de succinato tisular aumentan la expresión del receptor. Esta observación es reforzada porque la administración exógena de succinato a los fibroblastos aislados aumentó la expresión de mRNA y proteína de SUCNR1. Además, este metabolito incrementó la expresión de mediadores proinflamatorios y profibróticos en línea con lo observado en células estrelladas hepáticas (Li *et al.*, 2015,). Estos efectos implicaron la activación de SUCNR1 ya que fueron reducidos en células transfectadas transitoriamente con siSUCNR1. En conjunto los resultados apuntan hacia un papel relevante del SUCNR1 en la fibrosis intestinal asociada a la EC, lo que se ve reforzado por la correlación positiva y significativa entre la expresión de SUCNR1 y  $\alpha$ SMA detectada en el intestino humano.

En la enfermedad de Crohn, una inflamación prolongada en un tiempo indefinido puede llevar a desencadenar el desarrollo de fibrosis, por lo que analizamos en ratones *Sucnr1*<sup>-/-</sup> el papel de este receptor en la inflamación y la fibrosis intestinal. Observamos que la colitis inducida por la administración intrarrectal de TNBS reproduce la expresión aumentada de *Sucnr1* detectada en las muestras de pacientes de EC. En este mismo modelo murino tratado con el agente hapténizante, se observó que el *Sucnr1* participa en el daño intestinal, la pérdida de peso corporal del ratón, así como en la reducción en la longitud del colon, la infiltración de macrófagos y el incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias (Lissner *et al.*, 2015; Cosin-Roger *et al.*, 2016).

Estudios realizados en macrófagos aislados muestran que *Sucnr1* exacerba la expresión de citocinas proinflamatorias tanto en condiciones constitutivas como estimuladas, en línea con previos estudios (Littlewood-Evans *et al.*, 2016). Además, la presencia de *Sucnr1* en estas células disminuye la expresión de marcadores de macrófagos M2 y citocinas antiinflamatorias lo que sugiere que *Sucnr1* modula la polarización de los macrófagos. Reforzando esta observación nuestros datos muestran una expresión disminuida de marcadores M1 junto con niveles aumentados de marcadores M2 en el intestino de ratones *Sucnr1*<sup>-/-</sup> tratados con vehículo y TNBS.

En la enfermedad de Crohn, la fibrosis intestinal depende del balance entre la producción/degradación de proteínas de la MEC y se caracteriza por presentar una gran acumulación de colágeno y la expansión permanente o transitoria de células mesenquimales primarias (Rieder *et al.*, 2013, Rogler *et al.*, 2017, Latella *et al.*, 2015). Existen diferentes modelos de fibrosis intestinal murina (Rieder *et al.*, 2012) aunque ninguno reproduce todas las características de la EC. En el presente estudio hemos utilizado el modelo de fibrosis intestinal por trasplante heterotópico, el cual se asocia con inflamación transmural y deposición de MEC, características de la EC (Meier *et al.*, 2016, Goffin *et al.*, 2016). Nuestros datos, en injertos de animales WT, reflejan una importante acumulación de colágeno en la zona de submucosa y subserosa, además de un incremento en la expresión de marcadores profibróticos, en paralelo a una mayor expresión del SUCNR1. Todos estos parámetros están significativamente atenuados en el injerto de ratones *Sucnr1*<sup>-/-</sup> lo que sugiere un papel fundamental de este receptor en el desarrollo de la fibrosis intestinal.

Es importante señalar que la ausencia del receptor no afectó a la capacidad de infiltración del macrófago huésped hacia los tejidos intestinales ya que se observó un aumento similar de la expresión de F4/80 en tejido de ratones WT y *Sucnr1*<sup>-/-</sup>. Otro dato relevante que va en la línea con los resultados anteriormente mencionados es que, en los injertos de los ratones WT se detectó una mayor expresión de marcadores de macrófagos M1 que en los injertos de ratones *Sucnr1*<sup>-/-</sup> y a su vez estos últimos mostraron un incremento en expresión del CD206 que es un marcador de fenotipo regulador.

Sin embargo, ambos grupos presentaron una similar expresión de CD16, que es un marcador profibrótico que se expresa en macrófagos (Salvador *et al.*, 2018) y de TGF- $\beta$  (Wynn *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que las diferencias detectadas en la fibrosis entre injertos WT y *Sucnr1* dependen de una reactividad celular reducida a la fibrogénesis por la falta del receptor *Sucnr1* en el tejido intestinal. En este sentido la ausencia de receptor *sucnr1* en fibroblastos aislados tanto murinos como humanos determina una menor activación celular en respuesta al succinato exógeno y al TGF. Parece por tanto que el receptor *Sucnr1* exacerba la respuesta de los fibroblastos a los

estímulos profibróticos, de forma similar a lo descrito en células inmunes con estímulos proinflamatorios (Rubic *et al.*, 2008, Littlewood-Evans *et al.*, 2016).

En resumen, podemos afirmar que la presencia del sucnr1 exacerba la activación de macrófagos y fibroblastos, células implicadas en las complicaciones de la EC, y proponemos este receptor como una diana farmacológica potencial para el tratamiento de la EC.

### I.3 CONCLUSIONES

1. En un modelo murino de colitis inducido por TNBS y caracterizado por un severo daño intestinal asociado con inflamación en la mucosa e inhibición del flujo autofágico:
  - la administración sistémica del extracto etanólico de *Hylocereus polyrhizus* (EH) ejerce una acción antiinflamatoria y previene la colitis.
  - la estimulación farmacológica de la autofagia, a través de la administración sistémica de betanina, rapamicina o trehalosa, favorece la degradación de complejos proinflamatorios y ejerce un efecto protector sobre la colitis.
  
2. Los pacientes con enfermedad de Crohn presentan niveles elevados de succinato séricos e intestinales y una mayor expresión de SUCNR1, tanto en resecciones quirúrgicas como en fibroblastos intestinales.
  
3. La activación del receptor SUCNR1 exacerba la actividad proinflamatoria de los macrófagos, tanto en condiciones basales como inducidas, y la activación de los fibroblastos.
  
4. El receptor SUCNR1 media la inflamación y la fibrosis intestinal murina y podría estar involucrado en las complicaciones asociadas a la EC.
  
5. Considerando la falta de respuesta de muchos pacientes con EC al tratamiento farmacológico disponible, el uso de fármacos con capacidad de estimular la autofagia o de antagonizar el receptor SUCNR1 podría resultar de interés terapéutico.



# I. CAPÍTULOS



CAPÍTULO 1: -

**“The flesh ethanolic extract of *Hylocereus polyrhizus* exerts anti-inflammatory effects and prevents murine colitis”**

Dulce C. Macias-Ceja<sup>a</sup>, Jesus Cosín-Roger<sup>b</sup>, Dolores Ortiz-Masiá<sup>a</sup>  
c, Pedro Salvador<sup>b</sup>, Carlos Hernández<sup>a</sup>, Sara Calatayud<sup>b</sup>, Juan V.  
Esplugues<sup>a,b</sup>, Maria D. Barrachina<sup>b</sup>

Clinical Nutrition. (2016).35:1333-1339.

DOI: 10.1016/j.clnu.2016.02.013. Epub 2016 Feb 23.



## 1. INTRODUCTION

IBD is a chronic disorder of the gastrointestinal tract associated with alteration in the epithelial barrier function and mucosal inflammation [1]. The main idiopathic forms of IBD are ulcerative colitis and Crohn's disease, and both exhibit apoptosis of epithelial cells, abnormal alteration of pro-inflammatory molecules and increased activation of adhesion molecules, cellular infiltrates and mucosal damage [2]. The pharmacological treatment of IBD has been significantly improved with the addition of biological therapy to conventional therapy. However, there is still a large part of the population that does not respond to current therapies because of their effectiveness, possible side effects and high cost [3]. In last years, a wide range of phytochemicals have demonstrated antiinflammatory effects and the interest in natural compounds and pigments for the treatment of inflammatory diseases has significantly increased [4].

Red-flashed pitahaya or “dragon fruit” belongs to the caryophyllales order of the genus *Hylocereus* and the family of cactaceae. It is grown in tropical and subtropical regions such as Latin America, Malaysia, Thailand, Vietnam or Taiwan [5]. Different compounds have been identified in the pitahaya flesh, peel and seed and several studies analyzed the chemical composition, level of cytotoxicity and antioxidant activity of *Hylocereus polyrhizus in vitro* [6,7]. In addition, the safety evaluation of the methanolic extract of this fruit has been reported *in vivo* [8] and this extract has been related to a reduction risk of cancer, cardiac disease, decreased levels of blood glucose and blood pressure reduction [9,10]. Of interest, a compound present in the dragon fruit pigments has shown antioxidant and anti-inflammatory effects in rat liver damage [11]. In the actual study we evaluate the effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* in an experimental murine model of IBD.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. The flesh ethanolic extract of *H. polyrhizus*

Fruits were bought from local “Boqueria Market” (Barcelona, Spain), and carefully washed with tap water. The flesh was cut into small pieces and mingled in a blender with ethanol 50% (w/v) at room temperature. Afterwards, it was decanted and

filtered through a nylon cloth. The filtered extract was lyophilized to obtain the ethanolic extract (EH) concentrate which was stored at -20 °C.

## 2.2. *Animals*

Balb/c mice (Jackson Labs.) were accommodated in stainless steel cages in a room held at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . with a photoperiod of 12-h light and 12-h dark. All protocols were approved by the bioethic committees in the University of Valencia.

## 2.3. *Inducement of experimental colitis*

Colitis was induced by a single administration of 100 ml of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic (TNBS, 175 mg/kg, i.r., Sigma) dissolved in ethanol 40%. Mice (7-8 weeks old) were anesthetized and a 16G catheter was then carefully inserted 3 cm through the anus into the colon; 100 mL of NaCl 0.9% dissolved in ethanol 40% was administered to control animals [12]. Six and thirty hours after TNBS administration mice received an i.p. injection of EH (1 g/kg dissolved in DMEM) [8]. Mice were weighted daily (results are expressed as percentage vs. weight at day 0) and were sacrificed by cervical dislocation on day 2 and 4 after TNBS administration.

## 2.4. *Experimental groups*

Animals were randomly assigned to four different experimental groups (n = 11, each group): 1. Vehicle + Vehicle group (Ethanol i.r. + DMEM i.p.) 2. Vehicle + EH group (Ethanol i.r. + EH), 3. TNBS + Vehicle group (TNBS, i.r. + DMEM i.p.) and 4. TNBS + EH group (TNBS, i.r. + EH i.p.).

## 2.5. *Evaluation of colon and histological examination*

Colon length was measured and colon samples were sectioned (5  $\mu\text{m}$ ), embedded in paraffin, fixed in 4% paraformaldehyde acid and stained with haematoxylin for histological analysis. Damage was measured on a scale 0-10 taking into account the presence of erosion, surface extension of lesion, degree of inflammation, ulceration or necrosis, as previously described [13].

### 2.6. Myeloperoxidase activity

The determination of MPO activity as a marker of neutrophil infiltration was performed as previously published [14]. Colon samples were frozen and stored at 80 °C. Each piece of tissue was crushed in a solution containing 0.5% hexa-decyl-trimethylammonium bromide (HETAB) re-suspended in PBS 50 mM pH 6 at a 1:20 (w/v) dilution using a gentle MACS Dissociator. The homogenate was centrifuged at 20,000 g, 30 min, 4 °C. The supernatant obtained was diluted in 50 volumes of 50 mM PBS pH 6. Then it was added consecutively 50 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), HETAB (0.5%), and hydrogen peroxide (0.052%). When the mixture was completed, it was incubated 5 min in the dark at 37 °C. The measured of the plate was carried at 450 nm with a microplate reader (Infinite M2000, TECAN), the results were expressed in MPO U/mg of tissue.

### 2.7. RNA extraction and qPCR

RNA extraction was performed by using Tripure isolation reagent (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) following manufacturer instructions. Briefly, tissues were gently homogenized by means of a MACS Dissociator (Miltenyi Biotec). cDNA was obtained (Prime Script RT reagent Kit, Takara Biotechnology, Dalian, China) and RT-PCR was performed (Prime Script Reagent Kit Perfect Real Time, Takara, Biotechnology) in a thermo cycler LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Specific oligonucleotides are shown in Table 1. Relative gene expression level of different target was calculated by 2- $\Delta\Delta C_t$ . b-actin was used as the housekeeping gene [15].

Tabla 1

Primer sequences of the genes analysed by qRT-PCR

Mouse gene	Sense	Antisense	Length (bp)
Inos	CGCTTGGGTCTTGTTCACTC	GGTCATCTTGATTGTTGGGCTG	222
Arg1	GTGGGGAAAGCCAATGAAGAG	TCAGGAGAAAGGACACAGGTTG	232
COX2	CCCGGACTGGATTCTATGGTG	TTCGCAGGAAGGGGATGTTG	153
TNF- $\alpha$	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG	61
IL-1 $\beta$	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG	136

IL6	GAGTCCTTCAGAGAGATACAGAAAC	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC	150
IL-10	GGACAACATACTGCTAACCGAC	CCTGGGGCATCACTTCTACC	110
$\beta$ -actin	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC	95

### 2.8. Western blot analysis for IKB $\alpha$ , NF- $\kappa$ Bp65

The terminal colon tissue samples were homogenized and nuclear and cytoplasmic proteins were extracted as previously described [12]. Proteins (40 mg) were separated in 10% (w/v) acrylamide gel by SDS-PAGE. I $\kappa$ B- $\alpha$  and NF- $\kappa$ Bp65 were detected by western blot using a primary antibody against I $\kappa$ B- $\alpha$  (1:1000 rabbit antibody; Santa Cruz Biotechnology) and NF- $\kappa$ Bp65 (1:250 mouse antibody; Invitrogen, Novex by Life Technologies) at 4 °C overnight, followed by HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:2500; Thermo Scientific, Rockford, IL, U.S.A.) or anti-rabbit IgG (1:5000 Thermo Scientific) and revealed by femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Protein bands were detected by a LAS-3000 (Fujifilm, Barcelona, Spain) and protein levels were quantified by means of densitometry using Image Gauge Version 4.0 software (Fujifilm). Data were normalized to  $\beta$ -actin for cytoplasmic proteins or to nucleolin in the case of nuclear proteins [16].

### 2.9. LC-MS/MS analysis

The analysis of LC-MS/MS (Agilent1290, Agilent Technologies) for EH was performed using an EC-C18 column (50 x 2.1 mm x 1.7 mm particle size, WatersCorp) [17]. The injection volume was set at 5 mL, the flow rate at 0.4 mL/min, the column temperature was 30 °C and elution conditions consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). The initial condition was 5% solvent B for 1 min, gradually increasing to 100% over 13 min, maintained at 100% B for 1 min and then decreased to 5% over 6 min. The total runtime was 20 min.

Mass Spectrometry conditions: Q-TOF-MS analysis was performed using on a TripleTOF 5600 mass spectrometer system with a DuoSpray™ Source (electrospray ionization) (AB Sciex). Vaporizer temperature was 450 C and voltage was maintained at 4.5 kV. Wrapper gas was at a pressure of 50 psi. Samples were ionized in negative and positive mode. Ion monitoring mode was full scan in the range m/z 100e1000.



Automated calibration was performed using an external calibrant delivery system (CDS) which infused calibration solution prior to sample introduction.

The MS was performed using an IDA acquisition method with two experiments: the survey scan type (TOF-MS) and the dependent scan type (production) using 30 V of collision energy. Data was evaluated using the qualitatively evaluated using the XIC manager in the PeakView™ software where it was filtered based on mass error, retention time, isotope ratio %, difference and library hit purity score.

#### 2.10. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0® software. All data was expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were compared by using the analysis of one way-ANOVA with a Newman-Keuls post hoc correction for multiple comparisons. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1. The ethanolic extract of *H. polyrhizus* protects against colitis induced by TNBS

The administration of TNBS to mice induced a loss of body weight that peaked 2 days after treatment. Subsequently, mice began to recover and four days after treatment, body weight reached values that were non-significantly different to those of control animals. The administration of EH of *H. polyrhizus* significantly ( $P < 0.05$ ) prevented the loss of body weight ( $91.9 \pm 1.7\%$ ) compared with the injection of vehicle ( $86.4 \pm 2.1\%$ ), when analyzed two days after TNBS (Fig. 1A). The colon length was not significantly modified by TNBS, at any time analyzed (Fig. 1B).

The cecum, colon and rectum in macroscopic analysis (Fig. 1C) demonstrated hemorrhagic ulceration in TNBS-treated mice which was significantly prevented in mice that had received the EH. The histological analysis of the colon two days after treatment revealed a significant increase in damage score caused by TNBS compared with vehicle administration. The injection of EH significantly prevented mucosal damage induced by TNBS (Fig. 2).

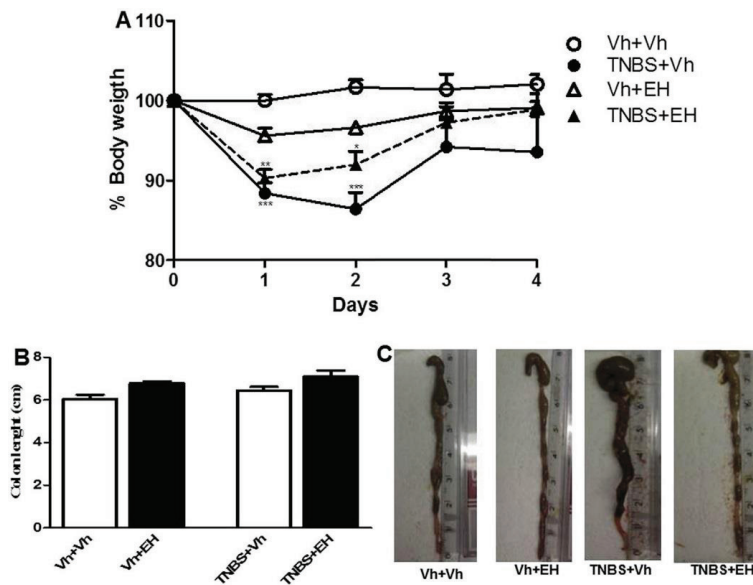


Figure. 1. Effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* on acute colitis induced by TNBS in mice. Administration of EH (1 g/kg i.p.) six and thirty hours after TNBS: A) prevented the body weight loss, two days after TNBS. Points in the graph represent mean  $\pm$  s.e.m., \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs the respective vehicle-treated group. B) did not significantly modify the colon length. Bars in graph represent mean  $\pm$  s.e.m.; C) reduced the severity of colon inflammation and hemorrhagic ulceration induced by TNBS. Representative photographs showing rectum, colon and cecum of mice receiving different treatments. The EH administration to vehicle-treated mice did not significantly modify any of the parameters analyzed.

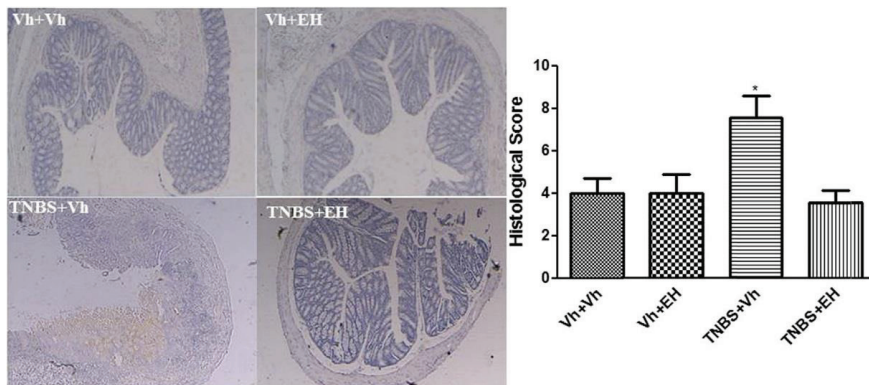


Figure. 2. Effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* on histological damage induced by TNBS in mice. Administration of EH (1 g/kg i.p.) six and thirty hours after TNBS significantly prevented histological damage induced by TNBS, two days after treatment. Representative photographs showing mucosal histology. Graph shows the histological score in the colonic mucosa of mice. Bars in graph represent mean  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ , vs all experimental groups in the graph.

### 3.2. The ethanolic extract of *H. polyrhizus* decreases MPO activity in colonic tissue of TNBS-treated mice

Colitis was characterized by an increase in MPO activity, an established marker of neutrophil infiltration. As shown in Fig. 3, two days after TNBS we detected a significant rise in MPO activity in the colon tissue, compared with vehicle. The administration of EH significantly prevented the increase in MPO in TNBS-treated mice while it did not significantly modify MPO activity in vehicle-treated mice.

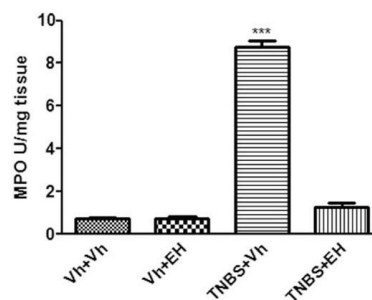


Figure. 3. Effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* on MPO activity in colonic mucosa of mice treated with TNBS. Administration of EH (1 g/kg i.p.) six and thirty hours after TNBS significantly prevented the increase in MPO activity induced two days after TNBS. Bars in graph represent mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\* $P < 0.001$ , vs all experimental groups in the graph.

### 3.3. The ethanolic extract of *H. polyrhizus* inhibits the gene expression of pro-inflammatory cytokines in colonic tissue of TNBS-treated mice

Analysis of the mRNA expression of iNOS, Arg1, COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-6 in colonic tissue revealed a significant increase of the expression of these genes, two and four days after TNBS-treatment compared with levels detected in vehicle-treated mice (Fig. 4). In all cases, the administration of EH significantly prevented the increase of expression detected in these genes, 2 and 4 days after TNBS. The mRNA expression of the anti-inflammatory molecule, Il10, was not significantly increased two days after TNBS but it was induced four days after treatment. The administration of EH did not significantly modify Il10 expression in TNBS-treated mice but induced a significant increase in vehicle-treated animals (Fig. 4).

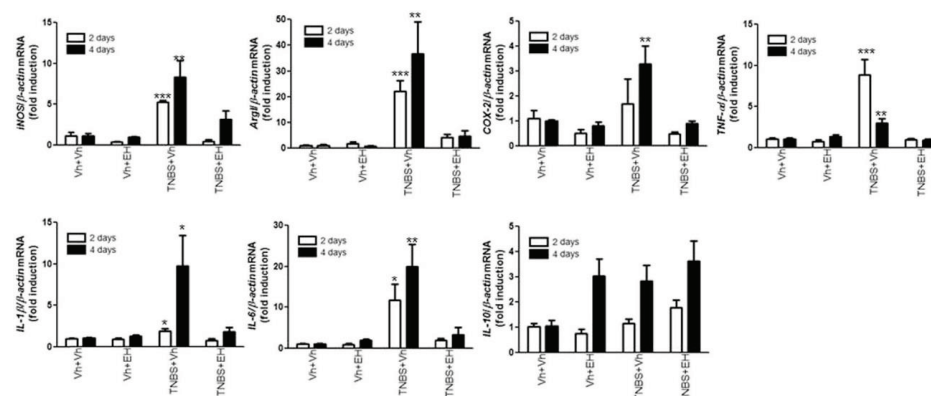


Figure 4. Effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* on the mRNA expression of pro-inflammatory mediators in colonic mucosa of mice treated with TNBS. Administration of EH (1 g/kg i.p.) six and thirty hours after TNBS reduced the mRNA expression of iNOS, Arg1, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in colonic tissue. Bars represent mean  $\pm$  s.e.m., \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001, vs all experimental groups in the graph.

### 3.4. The ethanolic extract of *H. polyrhizus* decreases nuclear NF- $\kappa$ B protein levels and I $\kappa$ B- $\alpha$ degradation in colonic tissue of TNBS treated mice

In order to understand the cellular mechanisms activated by the EH we proceeded to analyze I $\kappa$ B- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B protein levels by Western blot. TNBS administration slightly reduced I $\kappa$ B- $\alpha$  levels compared with vehicle-treated mice. I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation was detected in parallel with increased levels of NF- $\kappa$ B protein in the nucleus. Administration of EH significantly prevented I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation induced by TNBS and reduced nuclear NF- $\kappa$ B (Fig. 5).

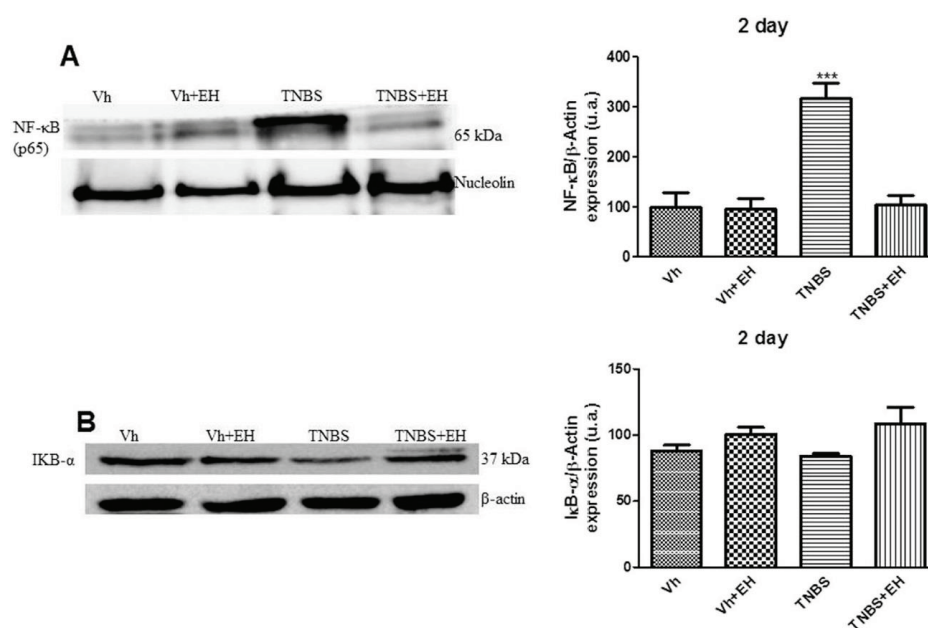


Figure. 5. Effects of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* on NF-kBp65 protein levels and IκB-α degradation in colonic mucosa of mice treated with TNBS. Administration of EH (1 g/kg i.p.) six and thirty hours after TNBS reduced nuclear NF-kBp65 protein levels and IκB-α degradation. Representative western blots showing nuclear NF-kB p65 and cytoplasmic IκB-α protein levels in the colon of mice receiving different treatments.

### 3.5. Composition of the ethanolic extract of *H. polyrhizus* by LC-MS/MS analysis

Finally, we characterized by LC-MS/MS the composition of EH of *H. polyrhizus*. We observed eight different compounds, three of which were detected by positive screening (Table 2) and five of them by negative detection (Table 3). These organic compounds correspond to structures of flavonoids and phenolic compounds attached to carbohydrates.

Table 2

The compounds identified in positive mode in *H. polyrhizus* fruit ethanolic extract.

Retention time (min)	Compound	Molecular formula	[M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup>
0.77	Ellagic acid arabinoside	C19H14O12	435.05
3.70	Chrysoeriol 7-O-(600-malonyl-apiosyl-glucoside)	C30H32O18	681.16
4.90	Luteolin 7-O-beta-D-diglucuronide	C27H26O16	639.11

Table 3

The compounds identified in negative mode in *H. polyrhizus* fruit ethanolic extract.

Retention time (min)	Compound	Molecular formula	[MH]
5.08	Tridecarboxylated hylocerenin	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub>	561.20
6.5	O-Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163.04
7.45	p-HPEA-AC	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	179.07
7.45	4-Vinylsyringol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	179.07
7.7	Oleoside 11-methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	403.12

## DISCUSSION

Earlier studies on the red dragon fruit cactacea (*Hylocereus* sp.) have analyzed the chemical composition of several extracts and showed the antioxidant effects [7,8], as well as their therapeutic benefit in metabolic syndrome diseases [18]. In the present study we demonstrated for the first time that the ethanolic extract of *H. polyrhizus* prevents murine colitis through an anti-inflammatory action.

The experimental model of colitis induced by a single administration of TNBS to Balb/c mice was associated with loss of body weight, distortion of mucosal architecture and cellular infiltration which are characteristics similar to those observed in human Crohn's disease [19]. These changes peaked two days after injury and afterwards mice started to recover. The intraperitoneal administration of EH, at doses lower than those reported to lack toxicity [8] significantly avoided the loss of body weight induced by TNBS and reduced the macroscopic and histological colonic damage. Mice treated with TNBS presented hemorrhagic colon and the histological analysis revealed erosions, ulceration and cellular permeability in the mucosa. Of interest, animals that had received the EH lack of macroscopic signs of inflammation and damage and the histological analysis revealed a preserved architecture with some abnormal crypts and poor cellular infiltration.

In the TNBS model of colitis, myeloperoxidase activity (MPO) contributes to dysfunction and inflammation of the mucosa. Our results reveal an increase in MPO activity in the colon of mice treated with TNBS which is thought to be caused by the neutrophilic infiltration [20]. These infiltrated cells are also associated with the production and liberation of pro-inflammatory cytokines which initiate and maintain

mucosal inflammation [21]. Our results reveal in colonic tissue of TNBS-treated mice an increase in mRNA expression of iNOS, COX2, Arginase I and several cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. Of interest, the administration of EH significantly prevented both the increase in MPO activity and the induction of pro-inflammatory cytokines observed in TNBS-treated mice which would be in line with the poor cellular infiltration observed in these animals. Taken together results in the present study strongly suggest an antiinflammatory activity of the ethanolic extract of *H. polyrhizus*.

The transcription factor, NF- $\kappa$ B has been associated with the inflammatory activity of TNBS [22] and its activity is controlled by the steady state levels of IKappaB- $\alpha$ . Our results reveal in the colon of TNBS-treated mice, a slight degradation of cytoplasmic IKappaB $\alpha$  and a significant up-regulation of NF- $\kappa$ B in the nucleus and both effects are significantly altered by the administration of EH to TNBS treated mice. Considering that members of the NF- $\kappa$ B family have been shown to control the transcriptional activity of proinflammatory gene promoters' such as those of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 and iNOS, surface cell receptors and adhesion molecules [23], results point to an antiinflammatory effect of the EH mediated by its ability to inhibit the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. Activation of NF- $\kappa$ B has been reported in IBD patients and regulation of its expression has been proposed as a good therapeutic target [24]. Data in the present study strongly suggest that the fruit of *H. polyrhizus*, due to its antiinflammatory properties could be used as a complement in the treatment of IBD patients. Further clinical studies are required to address this point.

Finally, we performed a LC-MS/MS analysis to determine the potential antiinflammatory compounds present in the ethanolic extract of the fruit of *H. polyrhizus*. Data reveal the presence of several compounds such as, flavonoids, polyphenols, and fatty acid esters. Among them we found ellagic acid, luteolin and p-HPEA-AC which have been reported to exert anti-inflammatory effects [14,25e27]. Furthermore, it has been reported that the antiinflammatory activity of the ellagic acid is mediated by the inhibition of NF- $\kappa$ B transcriptional activation [28] which suggest that the antiinflammatory activity of EH observed in the present study is mediated by this compound. However, it is important to point out that we found both ellagic acid and luteolin bound to glucosides. Although no literature analyzing the relevance of this

binding with ellagic acid has been found, it has been described a reduction in the antiinflammatory activity of luteolin when it is bound to glucosides [26]. Further studies are required to characterize the final responsible for the antiinflammatory effects of the EH of *H. polyrhizus*. Of interest, it has been described that the ellagic acid bound to a glucoside exerts prebiotic properties [29], which could be also involved in the protective effects shown by the EH against colitis.

In addition to polyphenols and fatty acids, the methanolic extract of *H. polyrhizus* has been shown to contain metabolites that are precursors of the synthesis of betalains (betanines and betaxanthins) which exhibit antiinflammatory properties [10,11]. Our results show that the ethanolic extract of *H. polyrhizus* contains tridecarboxylated hylocerenin which is a monodecarboxylated betaxanthin, but some concerns exist about the antiinflammatory activity of the decarboxylated betaxanthin [30]. Currently we are carrying on studies in order to analyze the effect of the methanolic extract of *H. polyrhizus* in a murine model of colitis.

#### 4. CONCLUSIONS

The present study demonstrates that the ethanolic extract of *H. polyrhizus* exerts an anti-inflammatory activity and prevents colitis induced by TNBS in mice, what suggests that the EH maybe a therapeutic alternative for inflammatory diseases such as IBD.

#### SOURCES OF FUNDING

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad [SAF2013-43441-P], CIBERehd and Generalitat Valenciana [PROMETEOII/2014/035]. Dulce C. Macias-Ceja is the recipient of a fellowship from University of Colima, Colima, Mexico. Jesús Cosín is supported by FPU fellowship from Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte. Pedro Salvador is supported by FPI fellowship from Ministerio de Economía y Competitividad. Carlos Hernandez acknowledges support from the “Ramon y Cajal” programme of Spain.



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dora Martí for her excellent technical assistance during this study and Brian Normanly for his English language editing.

## REFERENCES

- [1] Ortiz-Masia D, Cosín-Roger J, Calatayud S, Hernandez C, Alos R, Hinojosa J, et al. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 2014;4:928e38.
- [2] Jesuratnam-Nielsen K, Løgager V, Rezanavaz-Gheshlagh B, Munkholm P, Thomsen H. Plain magnetic resonance imaging as an alternative in evaluating inflammation and bowel damage in inflammatory bowel disease e a prospective comparison with conventional magnetic resonance follow-through. *Scand J Gastroenterol* 2015;50:519e27.
- [3] Gilroy L, Allen PB. Is there a role vedolizumab in the treatment of ulcerative colitis and crohn's disease? *Clin Exp Gastroenterol* 2014;7:163e72.
- [4] Dembitsky VM, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S, Trakhtenberg S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. *Food Res Int* 2011;44:1671e701.
- [5] Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Betacyanins in fruit from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chem* 2002;77:101e6.
- [6] Gandía-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F. Biological activities of plant pigments betalains. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.740103>.
- [7] Luo H, Cai Y, Peng Z, Liu T, Yang S. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chem Cent J* 2014;8:1e7.
- [8] Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Yam MF, Hashim MA, Chung PL, et al. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012;63: 106e14.

- [9] Lugo-Radillo A, Delgado-Enciso I, Peña-Beltrán E. Betanidin significantly reduces blood glucose levels in Balb/c mice fed with an atherogenic diet. *Nat Prod Bioprospect* 2012;2:154e5.
- [10] Vidal PJ, Lopez-Nicolas JM, Gandía-Herrero F, García-Carmona F. Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem* 2014;154:246e54.
- [11] Tan D, Wang Y, Bai B, Yang X, Han J. Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. *Food Chem Toxicol* 2015;78:141e6.
- [12] Zhang D, Wang L, Yan L, Miao X, Ch Gong, Xiao M, et al. Vacuolar protein sorting 4B regulates apoptosis of intestinal epithelial cell via p38 MAPK in crohn's disease. *Exp Mol Pathol* 2015;98:55e64.
- [13] Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor a production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997;41:487e93.
- [14] Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, Alarcon de la Lastra C. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of crohn's disease. *Biochem Pharmacol* 2011;82:737e45.
- [15] Ortiz-Masia D, Díez I, Calatayud S, Hernandez C, Cosín-Roger J, Hinojosa J, et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One* 2012;7:1e11.
- [16] Impellizzeri D, Bruschetta G, Di Paola R, Ahmad A, Campolo M, Cuzzocrea S, et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (Bje) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 2015;34(6):1146e54.
- [17] Suh DH, Lee S, Heo DY, Kim YS, Cho SK, Lee S, et al. Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus*) and (*Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014;62:8764e71.
- [18] Ramli NS, Brown L, Ismail P, Rahmat A. Effects of red pitaya juice supplementation on cardiovascular and hepatic changes in high-carbohydrate, highfat diet-induced metabolic syndrome rats. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:1e10.

- [19] Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Utrilla MP, RodriguezCabezas ME, Zarzuelo A, et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacol Res* 2015;97:48e63.
- [20] Sanchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcon de la Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1733e44.
- [21] Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut* 2012;61:918e32.
- [22] Allegra M, D'Acquisto F, Tesoriere L, Livrea MA, Perretti M. Cross-talk between minimally primed HL-60 cells and resting HUVEC reveals a crucial role for adhesion over extracellularly released oxidants. *Biochem Pharmacol* 2011;81: 396e401.
- [23] Allegra M, Ianaro A, Tersigni M, Panza E, Tesoriere L, Livrea MA. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carrageenin-induced rat pleurisy. *J Nutr* 2014;144:185e92.
- [24] Ren T, Qiu Y, Wu W, Feng X, Ye S, Wang Z, et al. Activation of adenosine A3 receptor alleviates TNF- $\alpha$ -induced inflammation through inhibition of the NF $\kappa$ B signaling pathway in human colonic epithelial cells. *Mediat Inflamm* 2014;2014:1e11.
- [25] Zhou E, Fu Y, Wei Z, Yang Z. Inhibition of allergic airway inflammation through the blockage of NF- $\kappa$ B activation by ellagic acid in an ovalbumin-induced mouse asthma model. *Food Funct* 2014;5:2106e12.
- [26] ChM Park, Song YS. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- $\kappa$ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascade in raw 264.7 cells. *Nutr Res Pract* 2013;7:423e9.
- [27] Mizushina Y, Ogawa Y, Onodera T, Kuriyama I, Sakamoto Y, Nishikori S, et al. Inhibition of mammalian DNA polymerases and the suppression of inflammatory and allergic responses by tyrosol from used activated charcoal waste generated during sake production. *J Agric Food Chem* 2014;62:7779e86.
- [28] Umesalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;107:650e5.

- [29] Wichienchot S, Jatupornpipat M, Rastal RA. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem* 2010;120:850e7.
- [30] Herbach KM, Stintzing FC, Carle R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions. *J Agric Food Chem* 2006;54:390e8.

CAPÍTULO 2:

**“Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis”**

**Dulce C Macias-Ceja**, Jesús Cosín-Roger, Dolores Ortiz-Masiá, Pedro Salvador, Carlos Hernández, Juan V Esplugues, Sara Calatayud and María D Barrachina.

British Journal of Pharmacology. (2017).174: 2501–2511  
DOI:10.1111/bph.13860



## 1. INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a relapsing chronic disorder of the gastrointestinal tract characterized by disruption of epithelial barrier function and chronic inflammation of the mucosa (Maloy and Powrie, 2011). Current pharmacological treatment, rather than providing a cure, is limited to increasing the duration of clinical remission periods and slowing down the destructive and progressive course of the disease. This has emphasized the need for a better understanding of the etiology and pathogenesis of IBD. Recent genome-wide association studies have revealed that polymorphisms in genes regulating autophagy constitute risk factors for IBD. (Fritz *et al.*, 2011; Khor *et al.*, 2011; Lees *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2017).

Autophagy is an intracellular degradation pathway that regulates the turnover of cellular proteins and organelles and plays an essential role in cellular homeostasis. It is also induced in stress situations such as starvation, hypoxia and reticular stress that results in accumulation of damaged cytosolic components (Klionsky *et al.*, 2016). This process starts with the formation of the phagophore which engulfs a portion of the cytoplasm that contains the cargo to be degraded and closes off to form the autophagosome which is fused with the lysosomes and cargo, and it is degraded by the lysosomal hydrolases.

In the intestine, autophagy has been reported to mediate critical functions in innate and adaptive immunity, such as antigen presentation by dendritic cells, cytokine secretion by macrophages and antimicrobial peptide secretion by Paneth cells (Baxt and Xavier, 2015). In the last few years, evidence has emerged for crosstalk between autophagy and inflammation (Crisan *et al.*, 2011; Nakahira *et al.*, 2011; Lapaquette *et al.*, 2015; Netea-Maier *et al.*, 2016). Autophagy modulates the inflammatory response through several mechanisms, including the selective degradation of both pro-inflammatory complexes, such as the NF- $\kappa$ B essential modulator complex (NEMO) or BCL10 (Shibata *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013) or inflammasome stimuli, such as mitochondrial ROS or mitochondrial DNA (Saitoh *et al.*, 2008; Nakahira *et al.*, 2011).

On the other hand, autophagy is induced during inflammation by the activation of toll-like receptors and NOD-like receptors, by damage associated molecular patterns and by several proinflammatory cytokines with the main aim of controlling infection as part of the host response to microbial invasion. However, high levels of these cytokines or ROS, generated in response to damage, can actually disrupt the signalling needed to control autophagy (Dodson *et al.*, 2013).

We have recently demonstrated that autophagic flux is impaired in the damaged mucosa of IBD patients, compared with non-damaged mucosa which suggests that, in addition to genetic components, inflammation is regulating this process (Ortiz-Masia *et al.*, 2014). We aim to analyse here the role that stimulation of mucosal autophagy plays in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis and the mechanisms involved in the regulation of this process. We have used rapamycin, an mTOR-dependent stimulator of autophagy (Ravikumar *et al.*, 2004) and trehalose, an mTOR-independent activator of autophagy (Sarkar *et al.*, 2007). In addition, we have also analysed the effects of betanin, a natural pigment that belongs to the betalain group of highly bioavailable antioxidants which has recently been shown to attenuate oxidative stress (Tan *et al.*, 2015) and to modulate autophagy in human breast cancer lines (Nowacki *et al.*, 2015). Our results show that, in mice, activation of mucosal autophagy ameliorates colitis through the inhibition of inflammation.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

All animal care and experimental protocols were approved by the institutional animal care and use committees of the University of Valencia and in compliance with the European Animal Research Laws (European Communities Council Directives 2010/63/EU, 90/219/EEC, Regulation (EC) No. 1946/2003) and Generalitat Valenciana (artículo 31, real Decreto 53/2013). Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath and Lilley, 2015). Male and females Balb/cJ mice (9–12 weeks old, 20–25 g weight, Jackson Labs.) were housed in stainless steel cages in a room kept at  $22 \pm 1$  °C with a 12 h light, 12 h dark cycle and had free



access to food and water. Care conditions were adapted to facilitate access of the animals to food and water ad libitum during the experiments

### 2.2. Induction of colitis and pharmacological treatment

Colitis was induced in Balb/cJ mice with intrarectal administration of 100  $\mu$ L of TNBS (3.5 mg·20 g<sup>-1</sup> Sigma Aldrich, Madrid, Spain) dissolved in 40% aqueous ethanol. TNBS-induced colitis represents a standardized model that closely resembles the histopathological lesions that develop in Crohn's disease in humans (Antoniou et al., 2016). Mice were anaesthetised (isoflurane 2%) and a 16G catheter introduced 3 cm from the anus, as previously described (Cosin-Roger et al., 2016). Vehicle-treated mice received NaCl (0.9% in 40% ethanol). Body weight was monitored daily and mice were killed by cervical dislocation, 2 or 4 days after TNBS administration. The length of the colon was measured, and colon tissue was frozen for protein and RNA extraction. One group of mice received trehalose (3% in drinking water 3 weeks before TNBS administration until the end of the experiment; Li et al., 2015; Acros Organics, Madrid, Spain). Other groups received rapamycin (1.25 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.; Puighermanal et al., 2009 kindly provided by Pfizer (Wayne, PA, USA)) or betanin (1 g·kg<sup>-1</sup>, i.p.; this dose was chosen from a previous dose–response curve, Sigma Aldrich, Madrid, Spain) once daily from the day of TNBS administration until the end of the experiment. Another group of mice, in addition to betanin, received an inhibitor of autophagosome formation, 3-methyladenine (3MA, 10 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p., daily, Sigma Aldrich, Madrid, Spain), from 2 days before TNBS until the end of the experiment. In all cases, animals were randomly distributed to the different treatment groups.

### 2.3. Histological studies

Histological analysis was performed on colon samples fixed and embedded in paraffin, sectioned (5  $\mu$ m) and stained with haematoxylin. Histological damage was measured on a scale 0 to 10 taking into account the degree of inflammation, the presence of erosion, ulceration or necrosis and the depth and surface extension of lesions, as previously described (Ameho et al., 1997).

#### 2.4. Immunohistochemistry

The colon tissue was fixed, embedded in paraffin, and sectioned (5  $\mu$ m) as previously described (Hernandez et al., 2009). After deparaffinization and rehydration, paraffin sections were rinsed in TBS-T (composition; 20 mM Tris HCl pH 7.2, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20) and incubated at 95°C for 20 min in citrate buffer (pH 6) for antigen demasking. Then, sections were treated for 15 min with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O miliQ to quench endogenous peroxidase and washed in TBS-T. After blocking with 5% normal goat serum, sections were incubated with rabbit p62 (SQSTM1) primary antibody (1:1000; PM045; MBL, International Corporation, Madrid, Spain) overnight at 4°C in a humidified chamber. Stained sections were then washed in TBS-T, incubated with HRP conjugated goat- $\alpha$ -rabbit secondary antibody (1:200; 31 460; Thermo Scientific, Rockford, IL) for 1 h at room temperature and were rinsed in TBS-T. Positive cells were visualized by treatment with diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co, Madrid, Spain). Samples were counterstained with haematoxylin, and the specificity of the immunostaining was confirmed by the absence of signal when primary antibodies were omitted. Images were obtained using a light microscope (1X81 Olympus) and cellR software v2.8.

#### 2.5. Protein extraction and Western blots

Equal amounts of protein from colonic tissues were loaded onto SDS-PAGE gels (Zhang *et al.*, 2015). After electrophoresis and transference, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T or BSA (for phosphorylated antibodies) and incubated overnight at 4°C with different primary antibodies (Table 1).

Table 1. Primary antibodies used in Western Blot

Antibody	Dilution
p-mTOR (Ser 2448) (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
p62 (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
LC3 (Sigma-Aldrich)	1:2000
BCI-10 (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
I $\kappa$ B $\alpha$ (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
p- I $\kappa$ B $\alpha$ (Cell Signaling)	1:1000
NF- $\kappa$ B (Invitrogen, Novex by Life Technologies)	1:250
$\beta$ -actin (Sigma-Aldrich)	1:5000
Nucleolin (Sigma-Aldrich)	1:1500

Subsequently, membranes were incubated with a secondary antibody anti-mouse IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, 1: 2500) or anti-rabbit IgG (Thermo Scientific, 1: 5000). Protein bands were detected by LAS-300 (Fujifilm, Barcelona, Spain) after treatment with SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) and quantified by means of densitometry with the software Image Gauge Version 4.0 (Fujifilm). Results were normalized to  $\beta$ -actin for total and cytoplasm proteins or nucleolin for nuclear proteins to control for unwanted sources of variation (Impellizzeri *et al.*, 2015).

#### 2.6. RNA extraction and qPCR analysis

RNA extraction was performed using Tripure Isolation reagent (Roche, Barcelona, Spain). Briefly, tissues were homogenized by Ultraturrax and RNA was separated with Chloroform, precipitated with isopropanol, washed with ethanol 70% and re-suspended in water. RNA of the cells was isolated with the extraction kit (Illustra RNAspin Mini, GE HealthCare Life Science, Barcelona, Spain). After quantification with Nanodrop, 1  $\mu$ g of RNA was used in order to perform the RT-PCR with the Prime Script RT reagent Kit (Takara Biotechnology, Dalian, China). Quantitative PCR was performed with the Prime Script Reagent Kit Perfect Real Time (Takara Biotechnology, Saint-Germain-en-Laye, France) in a thermo cycler Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). To control for unwanted sources of variation, results were

expressed as fold increase calculated according as: change in expression (fold) =  $2^{\Delta(\Delta CT)}$  where  $\Delta CT = CT$  (target)  $CT$  (housekeeping), and  $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT$  (treated)  $\Delta CT$  (control).  $\beta$ -actin was used as the housekeeping gene (Ortiz-Masia *et al.*, 2012). Specific primers were designed according to the sequences present in Table 2.

Table 2: Specific oligonucleotides used in quantitative PCR.

Gene	Sense	Antisense
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	CCCTCAGACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>COX-2</i>	CCCGGACTGGATTCTATGGTG	TTCGCAGGAAGGGGATGTTG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	CTGGATGCTCTCATCAGGACA
<i>IL-6</i>	GAGTCCTTCAGAGAGATACAGAAAC	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
<i>IL-10</i>	GGACAACATACTGCTAACCGAC	CCTGGGGCATCACTTCTACC
<i>CCR7</i>	CTCTCCACCGCCTTTCCTG	ACCTTCCCCTACCTTTTATTCCC
<i>CD11C</i>	TCTTCTGCTGTTGGGGTTTG	CAGTTGCCTGTGTGATAGCC
<i>iNOS</i>	CGCTTGGGTCTGTTCACCTC	GGTCATCTTGATTGTTGGGCTG
<i>CD86</i>	GCACGGACTTGAACAACCAG	CCTTTGTAATGGGCACGGC
<i><math>\beta</math>-actin</i>	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC

### 2.7. Data and statistical analysis

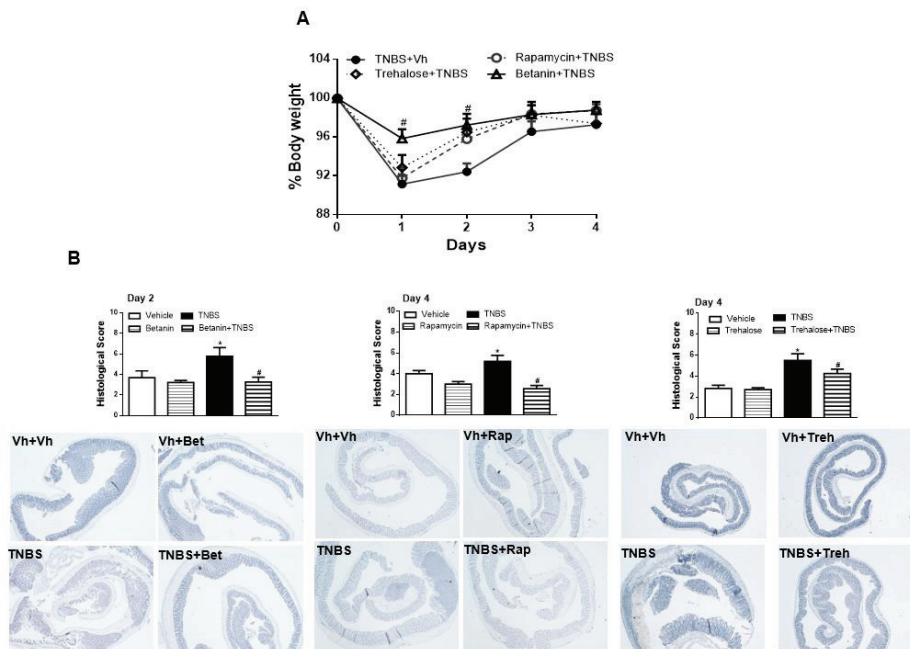
The data and statistical analysis, which were evaluated by a person blinded to the experimental conditions, comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and group means were compared by one way-ANOVA (in all cases, F achieved  $P < 0.05$  and there was no significant variance inhomogeneity) with a Newman–Keuls post hoc correction for multiple comparisons or a t-test when appropriate (Graph-Pad Software 6.0). A P value.

## 3. RESULTS

### 3.1. Autophagy is impaired in colon tissue of TNBS-treated mice

We used an experimental mouse model of IBD, based on the intrarectal administration of TNBS. Administration of this sensitizing agent to mice induced a loss

of body weight, an increase in the histological damage score and a decrease in colon length that peaked 2 days after treatment. Subsequently, mice began to recover and, at 4 days after TNBS, the body weight had returned to normal, i.e., that shown before TNBS administration (Figure 1A). The recovery of mucosal integrity was slower and 4 days after TNBS, the histological damage score was still higher than that observed in vehicle-treated animals (Figure 1B). Analysis of protein levels of autophagic markers in the colon tissue of TNBS-treated mice revealed lower levels of LC3II (the microtubule-associated protein 1A/1B–light chain 3 that is recruited to autophagosomal membranes) and increased levels of p62 (an autophagosome cargo protein that targets other proteins that bind to it for selective autophagy), compared with those observed in the colon tissue of vehicle-treated mice, 2 or 4 days after TNBS (Figure 1C–E). These changes were observed in parallel with high levels of phosphorylated mTOR (p-mTOR), the main negative regulator of autophagy, 2 days after TNBS (Figure 1C) thus showing impaired autophagy in colon tissue of TNBS-treated mice. This observation was reinforced by immunohistochemical studies performed in colon tissue that revealed increased immunostaining for p62 in the mucosa of TNBS-treated mice compared with vehicle. As shown in Figure 1F, p62 expression was mainly located in epithelial cells at the apical side of the gland and infiltrated cells in the lamina propria.



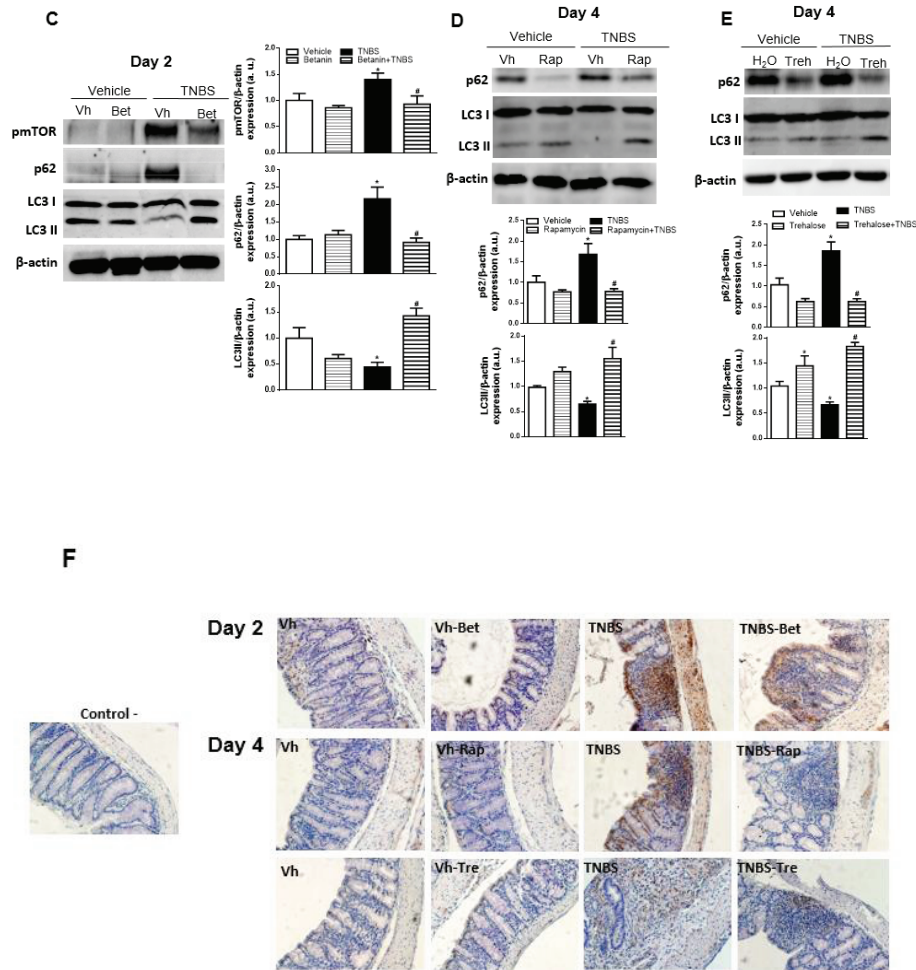


Figure 1. Betanin, rapamycin and trehalose stimulates mucosal autophagy and ameliorates TNBS-induced colitis. Mice were treated intrarectally with TNBS (3.5 mg·20 g<sup>-1</sup>) or vehicle and were killed 2 or 4 days after treatment. Groups of mice received a single administration of betanin (1 g·kg<sup>-1</sup>, i.p.) or rapamycin (1.25 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.), from the day of TNBS administration until the end of the experiment. Another group received trehalose (3% in drinking water), for 3 weeks before TNBS administration until the end of the experiment. Graphs show (A) body weight as a percentage of starting weight (to control for unwanted sources of variation), measured daily after TNBS administration (n = 10); (B) representative images and graphs showing histological score, analysed 2 and 4 days after treatment (n = 5); Effects of betanin (C), rapamycin (D) or trehalose (E) on p-mTOR, p62, LC3 and β-actin protein levels in the mucosa of vehicle or TNBS-treated mice, as shown by representative Western blots and graphs (n = 5). (F) Representative images showing p62 immunostaining in the mucosa of mice receiving different treatments. Data shown are means ± SEM. \*P < 0.05, significantly different from vehicle-treated group; # P < 0.05, significantly different from the TNBS-treated group.

### *3.2. Trehalose, rapamycin and betanin increase autophagy in murine colon tissue and ameliorate colitis*

Administration of trehalose, rapamycin or betanin to TNBS-treated mice significantly prevented the loss of body weight detected on day 2 and significantly reduced the histological damage score, 2 and 4 days after TNBS administration (Figure 1A, B). In all cases, the colon of TNBS-treated mice that had been treated with these drugs exhibited a significant diminution in p62 protein levels, as analysed by both Western blot (Figure 1C–E) and immunohistochemistry (Figure 1F). Furthermore, a significant increase in LC3II expression was observed, 2 and 4 days after TNBS compared with levels detected in vehicle-TNBS-treated mice, which suggest that trehalose, rapamycin and betanin prevented the impaired autophagy induced by TNBS in the colon. In vehicle-treated mice, these treatments did not significantly modify the body weight and histological score but treatment with rapamycin or trehalose induced a slight decrease of p62 protein levels and increased LC3II protein levels, suggesting a stimulatory effect on basal autophagy (Figure 1D, E).

### *3.3. Stimulators of autophagy decrease the expression of pro-inflammatory cytokines and M1 markers in colon tissue of TNBS-treated mice*

Real time PCR demonstrated that local mRNA levels of M1 macrophage-associated markers (CD11c, CD86, CCR7) and pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , COX-2, IL-1 $\beta$ , inducible NOS and IL-6) were significantly higher in the colon tissue of TNBS-treated mice than those observed in the colon tissue of vehicle-treated mice, 2 and 4 days after treatment (Figure 2). Some of these genes (CCR7, CD11c, CD86, COX-2 and IL6) peaked 2 days after TNBS and treatment with betanin significantly reduced their expression. Four days after TNBS, the expression of all these genes was significantly attenuated in mice that had received trehalose, rapamycin or betanin while the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was significantly increased. These treatments did not significantly modify levels of these genes in vehicle treated mice. Figure 2.

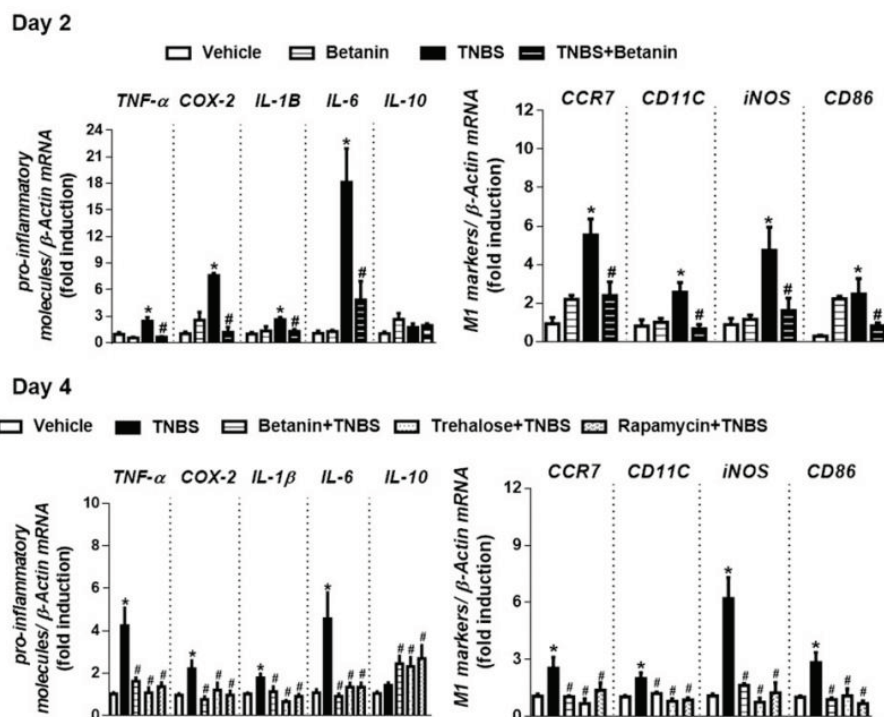


Figure 2. Betanin, rapamycin and trehalose decrease the expression of pro-inflammatory cytokines and M1 markers in colon tissue of TNBS-treated mice. Mice were treated with TNBS ( $3.5 \text{ mg} \cdot 20 \text{ g}^{-1}$ ) or vehicle and were killed 2 or 4 days after treatment. Groups of mice received a single administration of betanin ( $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  i.p.) or rapamycin ( $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  i.p.) from the day of TNBS administration until the end of the experiment; another group received trehalose (3% in drinking water) for 3 weeks before TNBS administration until the end of the experiment. Graphs show relative mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines, M1 markers and IL-10 in the colonic tissue compared with the housekeeping gene  $\beta$ -actin. Data shown are fold induction compared with vehicle-treated mice. Bars in graphs represent mean  $\pm$  SEM of five animals per experimental group. \* $P < 0.05$ , significantly different from vehicle-treated group; #  $P < 0.05$ , significantly different from the TNBS-treated group.

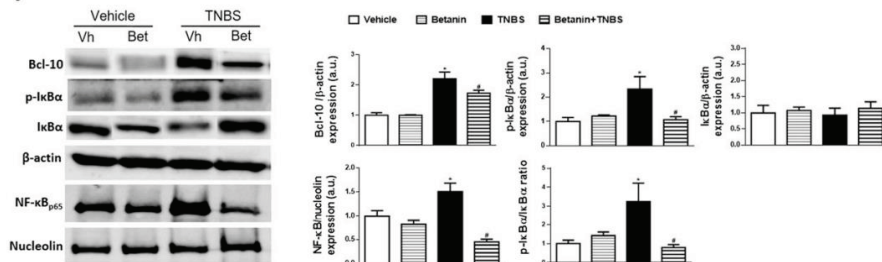
#### 3.4. Stimulators of autophagy decrease NF- $\kappa$ B signalling in the colon of TNBS-treated mice

To understand how autophagy stimulators modulate intestinal inflammation, we analysed the NF- $\kappa$ B signalling pathway in the mucosa. Increased mucosal protein levels of cytosolic BCL10 (a pro-inflammatory complex), p-I $\kappa$ B $\alpha$  and nuclear NF- $\kappa$ B were detected in TNBS-treated mice, compared with vehicle-treated mice, 2 and 4 days after



treatment (Figure 3). In TNBS-treated mice that received betanin, rapamycin or trehalose, protein levels of cytosolic BCL10 and p-IkBa and nuclear NF-κB were significantly lower than those detected in vehicle-TNBS-treated mice. These drugs did not significantly modify protein levels of BCL10, p-IkBa and NF-κB in vehicle-treated mice (Figure 3)

#### Day 2



#### Day 4

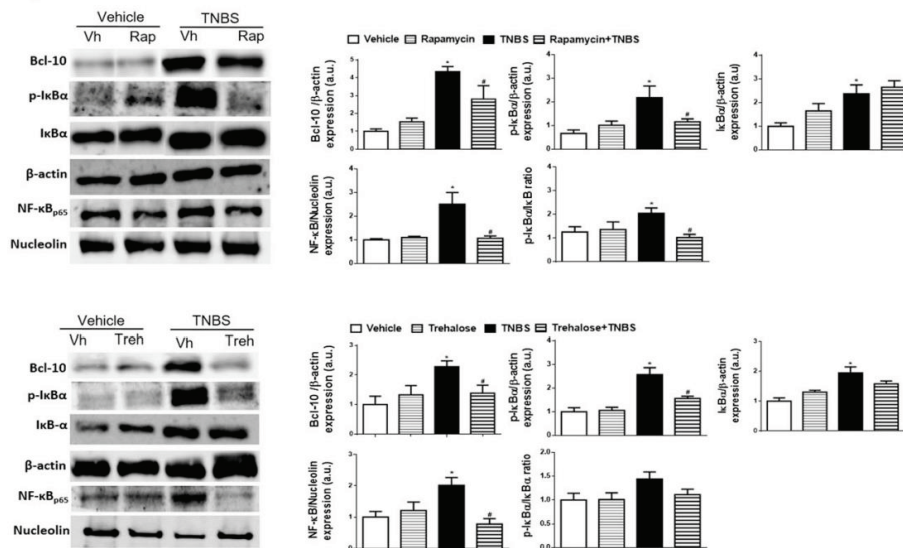


Figure 3. Autophagy stimulators reduce protein levels of cytosolic BCL10 and nuclear NFκBp65 in colon tissue of TNBS-treated mice. Colitis was induced in mice by intrarectal TNBS, as described and mice were killed 2 or 4 days after TNBS. Treatment groups received rapamycin ( $1.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) or betanin ( $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) or trehalose (3% in drinking water), as described. Representative Western blots and graphs showing BCL10, p-IkBa, IkBa, NFκB, β-actin and nucleolin protein levels in the mucosa of vehicle or TNBS-treated mice receiving different treatments. Data shown are means  $\pm$  SEM of five animals per experimental group. \*P < 0.05, significantly different from vehicle-treated group; # P < 0.05, significantly different from the TNBS-treated group.

*3.5. Stimulation of mucosal autophagy mediates the protective effects of betanin on colitis*

To demonstrate that activation of autophagy is involved in the protective effects of betanin in our model of colitis, we treated mice with 3MA, an inhibitor of the formation of autophagosomes. The protective effects induced by betanin in terms of the loss of body weight (Figure 4A) and histological damage score (Figure 4B), 2 days after TNBS, were significantly blocked by treatment with 3MA suggesting that autophagy mediates the protective effects of betanin. In mice receiving only TNBS, the administration of 3MA did not significantly modify the loss of body weight and histological damage score 2 days after TNBS (Figure 4A, B). Of interest, the administration of 3MA to TNBS-treated mice prevented the reduction in p-mTOR, p62, BCL10, p-I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B protein levels induced by betanin (Figure 4C) 2 days after TNBS, suggesting that the blockade of autophagy prevented the anti-inflammatory effects induced by betanin. No significant changes in the body weight of mice receiving the different treatments were detected 4 days after TNBS administration (Figure 4D). At this time, both vehicle- or betanin-treated mice that had received 3MA exhibited higher protein levels of both p62 and BCL10 than those in mice that had not received 3MA (Figure 4D).

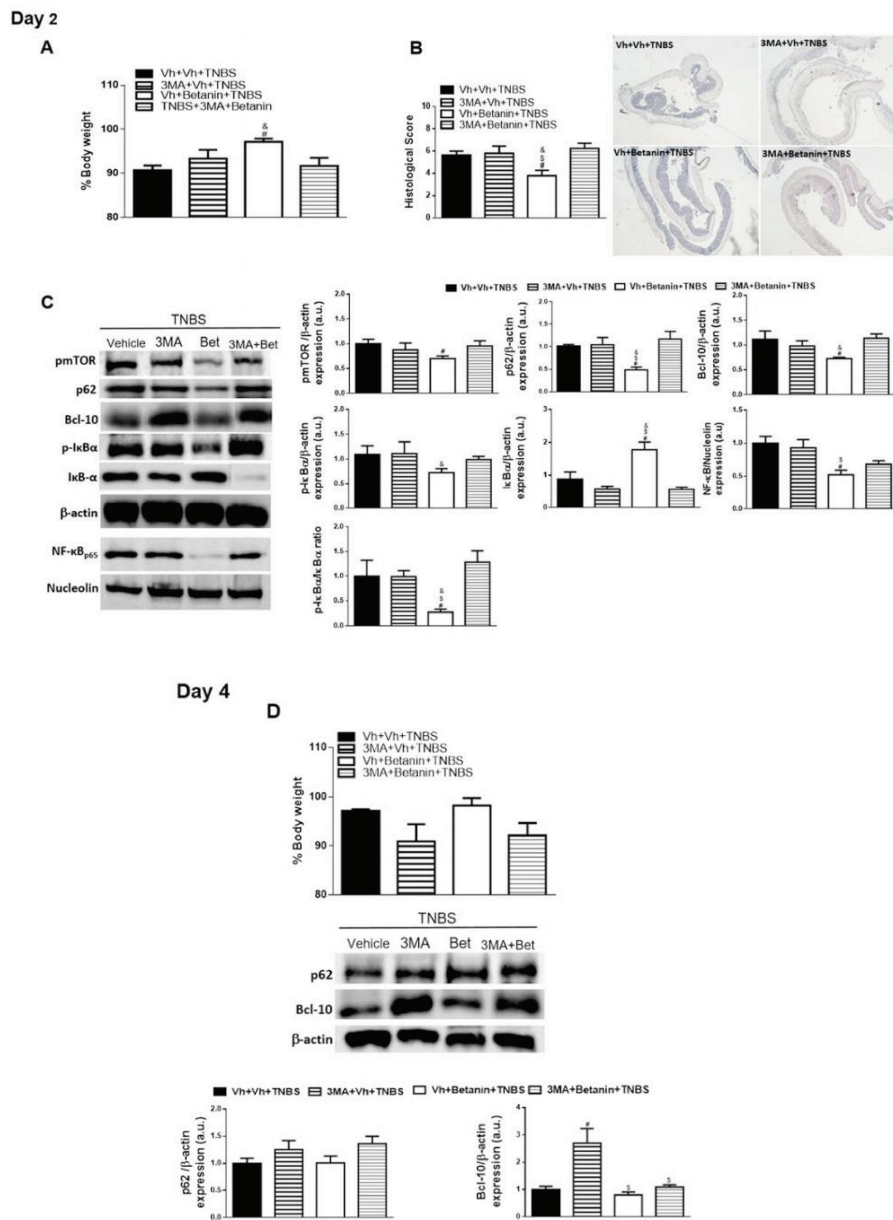


Figure 4. Inhibition of autophagy prevents the protective effects of betanin in TNBS-induced colitis. Mice with TNBS-induced colitis received a single dose of betanin ( $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) or saline, 2 or 4 days before the end of the experiment. One group also received a single dose of 3MA ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) or saline. Graphs show (A) body weight as a percentage of starting weight, measured 2 days after TNBS administration ( $n = 10$ ), (B) histological score ( $n = 5$ ) and representative photographs of the mucosa 2 days after treatment; (C) representative Western blots and graphs showing pmTOR, p62, BCL10, IkB $\alpha$ , p-IkB $\alpha$ , NF $\kappa$ B,  $\beta$ -actin and nucleolin protein levels, 2 days after TNBS administration. (D) Body weight as a percentage of starting weight ( $n = 5$ ) and representative Western blots and graphs showing p62, BCL10, and  $\beta$ -actin protein levels,

4 days after TNBS administration. Data shown are means  $\pm$  SEM. #  $P < 0.05$ , significantly different from the TNBS-treated group; \$  $P < 0.05$ , significantly different from the TNBS/3MA-treated group; &P  $< 0.05$ , significantly different from the TNBS/3MA/betanin-treated group.

#### 4. DISCUSSION

There is growing evidence for defective autophagy in the pathogenesis of IBD. Our results demonstrate that pharmacological activation of mucosal autophagy ameliorates murine colitis through the inhibition of inflammation. The TNBS model of murine colitis used in the present study is characterized by intense inflammation, disruption of epithelial cells by extensive ulcerations and marked loss of body weight. Our data reveal an impaired autophagic flux associated with phosphorylation of mTOR in the intestinal mucosa of TNBS-treated mice, extending previous observations showing a defective autophagy in the mucosa of both IBD patients and DSS-treated mice (Ortiz-Masia *et al.*, 2014). Of interest, systemic administration of three different compounds that share the ability to activate intestinal mucosal autophagy, accelerated the recovery of mice, as shown by the analysis of body weight and histological damage score. This protective effect was achieved with the classic mTOR inhibitor rapamycin (Ravikumar *et al.*, 2004), the mTOR-independent autophagic inducer, trehalose (Sarkar *et al.*, 2007) and the natural pigment betanin which, according to our data, induced an mTOR-dependent activation of autophagy in the colonic mucosa. Although other mechanisms cannot be ruled out, these results strongly suggest that stimulation of autophagy ameliorates murine colitis which was confirmed by the loss of the protective action of betanin, when mucosal autophagic flux was blocked with 3MA. Previous studies have shown the protective effects of autophagy stimulators in neurodegenerative diseases (Sarkar, 2013), spinal cord injury (Wang *et al.*, 2014) and liver damage (Zhu *et al.*, 2015) and the present study demonstrates, for the first time, a protective role for autophagy stimulation in murine colitis.

Several mechanisms such as defects in mucus secretion (Tsuboi *et al.*, 2015) or activation of the inflammasome in myeloid cells (Lee *et al.*, 2016) have been associated with an increased susceptibility to colitis in mice with a defective autophagy. However, little is known about the mechanisms that mediate amelioration of colitis

through autophagy stimulation. The selective degradation of pro-inflammatory complexes, inflammasome structures and damaged mitochondria have all been used to explain how autophagy may prevent inflammation (Nakahira *et al.*, 2011; Lapaquette *et al.*, 2015; Netea-Maier *et al.*, 2016). Our results show, in the mucosa of TNBS-treated mice, that autophagy is impaired and associated with high protein levels of cytosolic BCL10, a pro-inflammatory complex known to regulate the constitutive activation of NF $\kappa$ B through canonical (phosphorylation of I $\kappa$ -B $\alpha$ ) and non-canonical (phosphorylation of NIK) pathways (Bonizzi and Karin, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Wu and Ashwell, 2008). The high protein levels of BCL10 have been detected in parallel with a significant increase in the ratio pI $\kappa$ -B $\alpha$ /I $\kappa$ -B $\alpha$ , demonstrating the activation of the canonical pathway of NF $\kappa$ B in the mucosa of TNBS-treated mice. Consistent with this, a critical role of BCL10 in NF $\kappa$ B activation was reported in a murine model of inflammation induced by carrageenan (Bhattacharyya *et al.*, 2013). Of interest, our data show that the administration of betanin, rapamycin or trehalose to TNBS-treated mice induced a significant decrease in protein levels of both BCL10 and p62. Previous studies have shown degradation of BCL10 by autophagy, in a process that required the expression of p62 (Paul *et al.*, 2012). Accordingly, we found that inhibition of autophagosome formation with 3MA prevented the decrease in both BCL10 and p62 proteins, induced by betanin, strongly suggesting the degradation of BCL10 by autophagy. It seems likely that the reduced levels of BCL10 detected in mice treated with autophagy stimulators are responsible for the detected reduction in I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B, although a direct degradation of NF- $\kappa$ B p65-I $\kappa$ B complexes by autophagy cannot be ruled out (Chang *et al.*, 2013). As a whole, our results suggest that inhibition of mucosal autophagy by TNBS was associated with BCL10 accumulation, phosphorylation of I $\kappa$ B and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B with the consequent increase in the expression of pro-inflammatory cytokines and M1 markers. Pharmacological activation of mucosal autophagy would favour BCL10 degradation and prevent TNBS-induced inflammation (Figure 5).

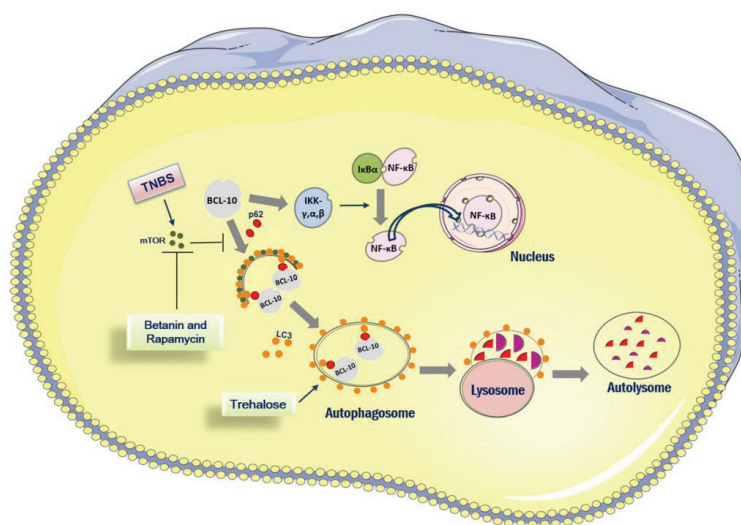


Figure 5. Diagram showing the proposed pathways activated by betanin, rapamycin and trehalose in the mucosa of TNBS-treated mice. TNBS induced an mTOR-dependent inhibition of autophagy with the consequent accumulation of the pro-inflammatory complex, BCL10, and the final activation of the canonical NFκB pathway. Stimulation of autophagy by mTOR-dependent (rapamycin or betanin) or mTOR-independent pathways (trehalose) favours BCL10 degradation.

In conclusion, the present study shows a murine model of colitis characterized by severe intestinal damage associated with mucosal inflammation and blockade of autophagic flux. Pharmacological stimulation of mucosal autophagy attenuated inflammation by degradation of proinflammatory complexes and ameliorated murine colitis. Our results suggest that stimulators of autophagy would be of interest in the clinical management of human IBD in those patients in whom autophagy is not genetically impaired.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dora Martí for her excellent technical assistance during this study and Brian Normanly for his English language editing. This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad and the European Regional Development fund of the European Union (ERDF) [SAF2013-43441-P], Ministerio de Economía, Industria y Competitividad and the European Regional Development fund of the European Union (ERDF) (SAF2016-80072P), CIBERehd and Generalitat Valenciana [PROMETEOII/2014/035, UGP-14-164]. Dulce C. Macias-Ceja is the recipient of a

fellowship from FISABIO and University of Colima, Colima, Mexico. Jesús Cosín is supported by FPU fellowship from Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte. Pedro Salvador is supported by FPI fellowship from Ministerio de Economía y Competitividad. Carlos Hernandez acknowledges support from the “Ramon y Cajal” programme of Spain.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.M., J.C., S.C., J.V.E. and M.D.B. conceived and designed the experiments; D.M., J.C., D.O., S.C., C.H. and P.S. performed the experiments and analysed the data; and D.M., S.C., C.H., M.D.B. wrote the manuscript.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

#### DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research

#### REFERENCES

Alexander SP, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE et al.(2015). The concise guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Enzymes. *Br J Pharmacol* 172: 6024–6109.

Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y et al. (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 41:487–493.

Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I et al. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: an overview. *Ann Med Surg (Lond)* 11: 9–15.

Baxt LA, Xavier RJ (2015). Role of autophagy in the maintenance of intestinal homeostasis. *Gastroenterology* 149: 553–562.

Bhattacharyya S, Xue L, Devkota S, Chang E, Morris S, Tobacman JK (2013). Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice. *Mediators Inflamm* 2013: 397642.

Bonizzi G, Karin M (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280–288.

Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY (2013). TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatomaderived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ* 20:515–523.

Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Esplugues JV, Barrachina MD (2016). The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* 9: 986–998.

Crisan TO, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Farcas MF, Stoffels M, Kullberg BJ et al. (2011). Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS One* 6: e18666.

Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA et al. (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 172:3461–3471.

Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic Biol Med* 63: 207–221.

Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A (2011). Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* 60:1580–1588.

Hernandez C, Santamatilde E, McCreath KJ, Cervera AM, Diez I, Ortiz-Masia D et al. (2009). Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br J Pharmacol* 156: 262–272.

Hooper KM, Barlow PG, Stevens C, Henderson P (2017). Inflammatory bowel disease drugs: a focus on autophagy. *J Crohns Colitis* 11: 118–127.



Impellizzeri D, Bruschetta G, Di Paola R, Ahmad A, Campolo M, Cuzzocrea S et al. (2015). The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 34: 1146–1154

Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 307–317.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1–222.

Lapaquette P, Guzzo J, Bretillon L, Bringer MA (2015). Cellular and molecular connections between autophagy and inflammation. *Mediators Inflamm* 2015: 398483.

Lee HY, Kim J, Quan W, Lee JC, Kim MS, Kim SH et al. (2016). Autophagy deficiency in myeloid cells increases susceptibility to obesity-induced diabetes and experimental colitis. *Autophagy* 12: 1390–1403.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J (2011). New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 60: 1739–1753.

Li Y, Guo Y, Wang X, Yu X, Duan W, Hong K et al. (2015). Trehalose decreases mutant SOD1 expression and alleviates motor deficiency in early but not end-stage amyotrophic lateral sclerosis in a SOD1-G93A mouse model. *Neuroscience* 298: 12–25.

Maloy KJ, Powrie F (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 298–306.

McGrath JC, Lilley E (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193.

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC et al. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12: 222–230.

Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG (2016). Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. *Autophagy* 12: 245–260.

Nowacki L, Vigneron P, Rotellini L, Cazzola H, Merlier F, Prost E et al. (2015). Betanin-enriched red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract induces apoptosis and autophagic cell death in MCF-7 cells. *Phytother Res* 29: 1964–1973.

Ortiz-Masia D, Cosin-Roger J, Calatayud S, Hernandez C, Alos R, Hinojosa J et al. (2014). Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 7:929–938.

Ortiz-Masia D, Diez I, Calatayud S, Hernandez C, Cosin-Roger J, Hinojosa J et al. (2012). Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One* 7: e48535.

Paul S, Kashyap AK, Jia W, He YW, Schaefer BC (2012). Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB. *Immunity* 36: 947–958.

Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal longterm memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12: 1152–1158.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36: 585–595.

Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456: 264–268.

Sarkar S (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans* 41: 1103–1130.

Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282: 5641–5652.

Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J et al. (2012). p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat Commun* 3: 1061.

Southan C, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Alexander SPH et al. (2016). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucleic Acids Res* 44 (Database Issue): D1054–D1068.

Tan D, Wang Y, Bai B, Yang X, Han J (2015). Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. *Food Chem Toxicol* 78: 141–146.

Tsuboi K, Nishitani M, Takakura A, Imai Y, Komatsu M, Kawashima H (2015). Autophagy protects against colitis by the maintenance of normal gut microflora and secretion of mucus. *J Biol Chem* 290:20511–20526.

Wang ZY, Lin JH, Muharram A, Liu WG (2014). Beclin-1-mediated autophagy protects spinal cord neurons against mechanical injury-induced apoptosis. *Apoptosis* 19: 933–945.

Wu CJ, Ashwell JD (2008). NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3023–3028.

Zhang D, Wang L, Yan L, Miao X, Gong C, Xiao M et al. (2015). Vacuolar protein sorting 4B regulates apoptosis of intestinal epithelial cells via p38 MAPK in Crohn's disease. *Exp Mol Pathol* 98:55–64.

Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M et al. (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 427: 167–171.

Zhu J, Lu T, Yue S, Shen X, Gao F, Busuttill RW et al. (2015). Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation. *Transplantation* 99: 48–55

CAPÍTULO 3:

## **“SUCCINATE RECEPTOR MEDIATES INTESTINAL INFLAMMATION AND FIBROSIS”**

**Dulce C. Macias-Ceja**, Dolores Ortiz-Masiá, Pedro Salvador, Laura Gisbert-Ferrándiz, Carlos Hernández, Martin Hausmann, Gerhard Rogler, Juan V. Esplugues, Joaquín Hinojosa, Rafael Alós, Francisco Navarro, Jesus Cosin-Roger, Sara Calatayud, María D. Barrachina.

MUCOSAL IMMUNOLOGY. (2018).

[DOI.org/10.1038/s41385-018-0087-3](https://doi.org/10.1038/s41385-018-0087-3)



## 1. INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract characterized by initial transmural inflammation that is commonly associated with complications such as strictures, abscesses and fistulas<sup>1-3</sup>. Inflammation is necessary for fibrosis development but current anti-inflammatory therapy does not prevent fibrosis in susceptible patients, which in most cases leads to surgery. To improve the clinical management of the disease, new putative targets should be identified from a better knowledge of fibrosis etiopathogenesis.

The development of fibrosis is associated with chronic, recurrent or unresolved intestinal inflammation<sup>4</sup>. At sites of inflammation, hypoxia, oxidative stress and necrosis of inflamed tissue determine important metabolic changes that have been associated with an increase in the local concentration of succinate, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle<sup>5,6</sup>. Proinflammatory macrophages may be partly responsible for these metabolic alterations since macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide (LPS) increase glycolysis and reduce TCA cycle activity and mitochondrial respiration, which provokes an accumulation of succinate<sup>7</sup>. Interestingly, recent evidences suggest that similar metabolic changes may take place in fibroblast activation and fibrosis development<sup>8-10</sup>.

In last years, new roles for succinate beyond metabolism have emerged and it has been shown that accumulation of this metabolite can act as a signal for inflammation<sup>5</sup>. In these conditions, succinate is released from the mitochondria into the extracellular environment where it selectively binds to the G-coupled receptor 91, GPR91, also named succinate receptor (SUCNR1)<sup>11,12</sup>. This receptor is expressed in several cell types including immune cells<sup>13</sup> and its activation by succinate induces pro-inflammatory signaling pathways<sup>5</sup>. In this line, in human monocyte-derived dendritic cells, SUCNR1 stimulation by succinate triggers intracellular calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation<sup>14</sup> and promotes cellular migration and the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages<sup>15,16</sup>. Of note, increased levels of succinate and the resultant autocrine and paracrine signaling through SUCNR1 have been recently

shown to exacerbate and sustain inflammation in chronic pathological conditions such as rheumatoid arthritis<sup>15</sup> or obesity<sup>17</sup>.

In the present study, we aimed to determine whether succinate levels and the intestinal expression of SUCNR1 are modified by Crohn's disease and to analyze the possible role of this receptor in murine models of intestinal inflammation and fibrosis. Our results, by showing the enhanced SUCNR1 expression in intestinal tissue from CD patients and the involvement of this receptor in murine colitis and fibrosis, lead us to identify SUCNR1 as a potential target for Crohn's disease.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Patients

Blood and surgical resections from the damaged intestine were obtained from CD patients with severe refractory CD who had lost response to second line treatment, presenting a stricturing behavior (Montreal classification: B2) or a penetrating behavior (Montreal classification: B3) and requiring surgery (Table 1). Blood from healthy donors and surgical resections from the non-damaged intestine of patients with colorectal cancer (named as non-IBD patients) were used as controls (Table 1). The study was approved by the Institutional Review Board of both the Hospital of Manises (Valencia, Spain) and Hospital of Sagunto (Valencia, Spain). Written informed consent was obtained from all participating patients.

Table 1. Patient characteristics

	Non-IBD	CD B2 (Structuring)	CD B3 (Penetrating)
<b>Number of patients</b>	40	25	15
<b>Age (y)</b>			
15-40 years	22	13	9
>40 years	18	12	6
<b>Gender</b>			
Male	13	8	5
Female	27	17	10
<b>Intestinal surgery</b>	40	25	15



## 2.2. Mice

Sucrn1<sup>-/-</sup> mice or WT mice (9-12 weeks old, 20-25 g weight, kindly provided by Dr Kenneth Mc Creath<sup>31</sup>) were bred with a C57Bl/6 background. All animals were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal facility of the University of Valencia and were co-housed to minimize potential effects of different microbiota. All protocols were approved by the institutional animal care and use committees of the University of Valencia, and all experiments were performed in compliance with the European Animal Research Laws (European Communities Council Directives 2010/63/EU, 90/219/EEC, Regulation (EC) No. 1946/2003) and Generalitat Valenciana (Artículo 31, Real Decreto 53/2013).

## 2.3. Induction of experimental colitis

TNBS acute colitis was induced by intra-rectal administration of 100 µl of TNBS (3.5 mg per 20 g mice) dissolved in 40% ethanol as previously described<sup>23</sup>. Body weight was monitored daily and mice were sacrificed by cervical dislocation 2 days after TNBS administration.

## 2.4. Induction of intestinal fibrosis

Intestinal fibrosis was induced *in vivo* using a heterotopic intestinal transplant model as previously described<sup>27</sup>. Briefly, colon resections from WT and Sucrn1<sup>-/-</sup> donor mice, were washed with 0.9% NaCl to remove the stool and transplanted subcutaneously into the neck of WT recipient mice. Recipient mice were anesthetized with isoflurane and a small area of the back was shaved. Two incisions were made perpendicularly to the body axis, the grafts were implanted into the pockets and the skin was closed with vicryl 5- stiches. After 7 days, recipient mice were sacrificed by neck dislocation and intestinal grafts were obtained. An adjacent segment of the colon from each donor mouse was kept to be used as autologous control tissue (referred to as day 0 or non-transplanted tissue).

## 2.5. Histological studies

Histological analysis was performed in murine colon samples fixed and embedded in paraffin, sectioned (5µm) and stained with hematoxylin. Histological

damage was analyzed as previously described<sup>23</sup>. Sirius Red staining was performed in order to determine the collagen layer in paraffin-embedded tissues, and the staining was examined under both transmission and polarized light.

#### *2.6. Immunohistochemical studies*

Immunostaining for SUCNR1 (supplementary table S1) was performed in fixed and paraffin-embedded representative sections (5  $\mu$ M) of intestinal surgical resections from damaged mucosa of CD patients or healthy mucosa from colorectal cancer patients, as previously described<sup>32</sup>.

#### *2.7. Immunofluorescence*

Immunofluorescence for SUCNR1, CD86, CD206 and  $\alpha$ -SMA (supplementary table 1) was performed in frozen intestinal human tissue as previously described<sup>33</sup>. Samples were visualized with by confocal microscopy (Leica TCS SP8, software LASX).

#### *Isolation of peritoneal macrophages and in vitro polarization*

Peritoneal macrophages were isolated from WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice and polarized towards an M1 and M2 phenotype as previously described<sup>23</sup>.

#### *2.8. Fibroblast isolation*

Primary intestinal fibroblasts were obtained from human intestinal resections or from mouse colons. Briefly, the tissue was cut in small pieces and incubated with HBSS-EDTA 30 minutes at 37°C in order to remove the epithelial cells. After washing with PBS, a digestion of the small explants with collagenase I (1 mg/ml), hyaluronidase (2 mg/ml) and DNase (1  $\mu$ l/ml) was performed during 30 minutes at 37°C. Finally, the small explants were seeded in a Petri dish and maintained under culture with DMEM high glucose (Sigma-Aldrich) supplemented with FCS 20%, Penicilin/Streptomycin (100  $\mu$ g/ml), Gentamycin (100  $\mu$ g/ml), Amphotericin B (2  $\mu$ g/ml) and Ciprofloxacin (16 $\mu$ g/ml). Intestinal fibroblasts from passages 3 to 8 were used in all experiments and they were treated with several concentrations of succinate (0.1-5 mM) or TGF $\beta$  (5 ng/ml) for 24 h.

### 2.9. *Small interfering (siRNA) transfection*

Primary fibroblasts were transfected with 20 pmol of specific SUCNR1 siRNA (Life Technologies) using Lipofectamine-2000 (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The efficiency of transfection was determined by analyzing the SUCNR1 mRNA expression.

### 3. *Protein extraction and Western Blot*

Human primary fibroblasts or homogenized intestinal frozen tissues from human or mice were obtained and total proteins were extracted as previously described<sup>34</sup>. Protein levels were analyzed by western blot using specific antibodies (supplementary Table 1).

#### 3.1. *RNA extraction and qPCR analysis*

RNA extraction from human or mice tissue was performed using Tripure Isolation reagent (Roche) as previously described<sup>35</sup>. RNA from macrophages or from primary fibroblasts was isolated using the Illustra RNA Spin Mini (GE Healthcare). RT-PCR for all genes analysed (supplementary table 2, 3) was performed using the Prime Script RT reagent Kit (Takara Biotechnology) and qPCR with the Prime Script Reagent Kit Perfect Real Time (Takara Biotechnology). Relative gene expression was expressed as follows: change in expression (fold) =  $2^{-\Delta(\Delta CT)}$  where  $\Delta CT = CT(\text{target}) - CT(\text{housekeeping})$ , and  $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT(\text{treated}) - \Delta CT(\text{control})$ .  $\beta$ -Actin was used as the housekeeping gene.

#### 3.2. *Measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels*

Intracellular Ca<sup>2+</sup> levels were determined in fibroblasts cells using the Fluo-4 AM dye (3  $\mu$ M) for 30 min. Pictures were taken with an DMI3000 inverted fluorescence microscope and LASV4.8 software.

#### 3.3. *Perchloric acid extraction.*

The water-soluble metabolites were extracted using perchloric acid extraction. Briefly, frozen tissues were weighed and homogenized in 6% perchloric acid. The homogenate was centrifuged (10000 rpm, 15 min), and the supernatant was neutralized

(KOH 3M) to pH 7. Potassium perchlorate salt was removed by centrifugation (10000 rpm, 15 min). The supernatant was analysed by proton NMR spectroscopy.

#### 3.4. *<sup>1</sup>H NMR Spectroscopy and succinate metabolite concentration*

The samples of serum from both healthy donors and CD patients and water-soluble metabolites were delivered to the Metabolomics Service of the Faculty of Medicine-UCIM (Central Research Unit) of the University of Valencia, and kept frozen at a temperature of -80°C. Twenty-seven microliters of sodium-3'-trimethylsilylpropionate-2,2,3,3-d<sub>4</sub> (TSP, 48 mM) in deuterium oxide were mixed with 473 µl of serum and placed in a 5mm high-resolution NMR tube (Wilmad, Buena, NJ, USA). NMR spectra were acquired using a standard one-dimensional pulse sequence with water suppression in a Bruker Avance DRX 600 spectrometer (Valencia, Spain) operating at a <sup>1</sup>H frequency of 600.13 MHz.) as previously described <sup>36</sup>. All spectra before analysis were processed through phased baseline correction and the spectra were segmented into 0,005 ppm of wide. The spectra were normalized to total aliphatic spectral area (0.5–4.5 ppm) in order to eliminate differences in total metabolite concentration. Metabolite spin systems and resonances were identified by using the standard Chenomx NMR suite version 8.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada), the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>) and additional 2D homo- and multi-nuclear experiments information in line with previous studies <sup>37, 38</sup>.

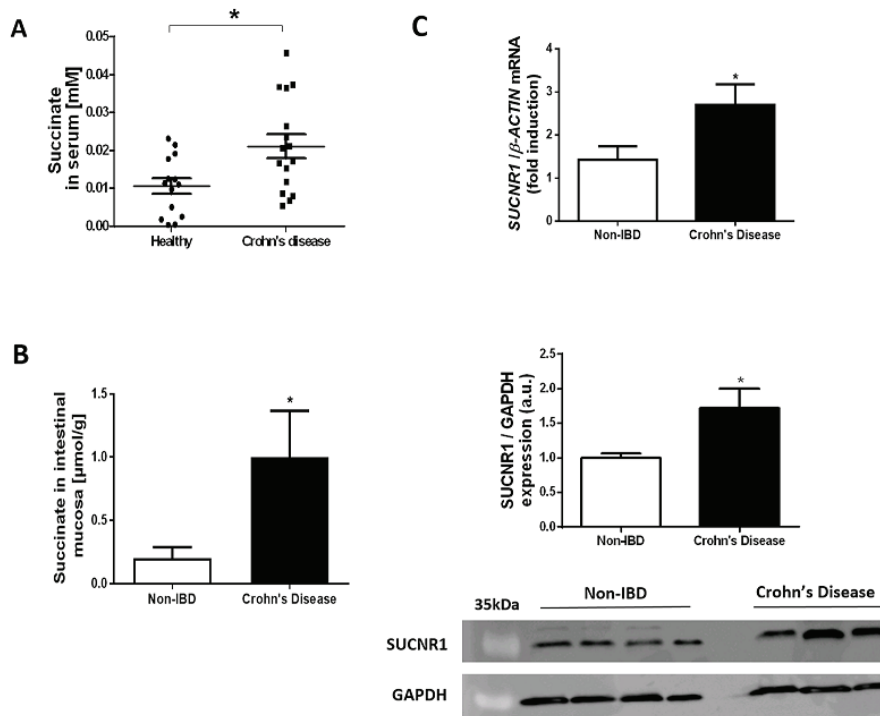
#### 3.5. *Statistical analysis*

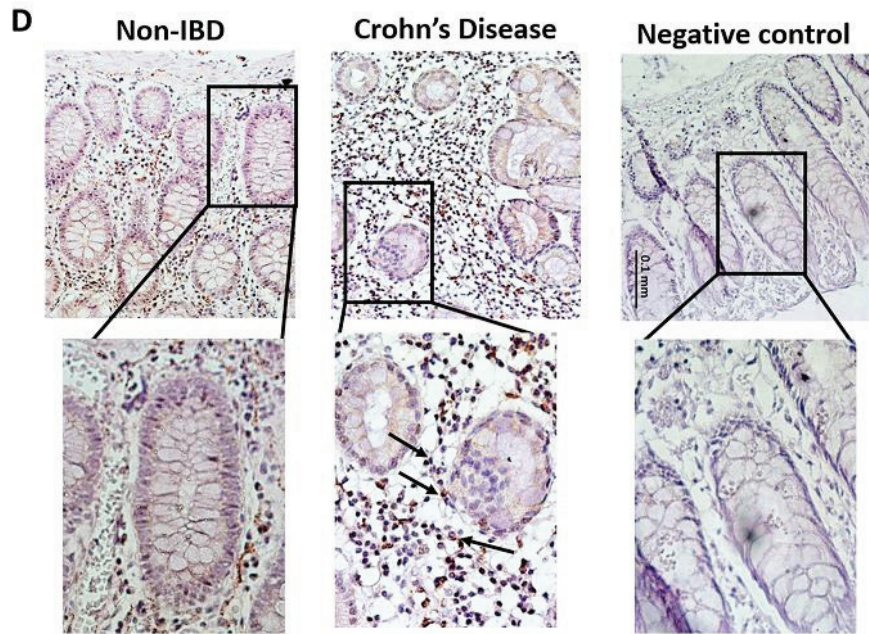
Data were expressed as mean ± S.E.M. and were compared by analysis of variance (one way-ANOVA; in all cases F achieved P<0.05 and there was no significant variance inhomogeneity) with a Newman-Keuls *post hoc* correction for multiple comparisons or a *t*-test when appropriate (Graph-Pad Software 6.0). A *P*-value <0.05 was considered to be statistically significant. For the body weight changes we used two-way ANOVA followed by Newman-keuls multiple comparison test, setting as variables the treatment and the time. Clinical correlation was analyzed in human samples using Spearman's correlation coefficient.

## 4. RESULTS

### 4.1. Serum and intestinal succinate levels and SUCNR1 intestinal expression are increased in CD patients.

Serum succinate levels were significantly higher in samples from CD patients than in serum from healthy donors (Figure 1A). In parallel, succinate levels in intestinal mucosa from CD patients were significantly higher than the ones from non-IBD patients (Figure 1B). Increased *SUCNR1* mRNA expression and enhanced SUCNR1 protein levels were detected in intestinal tissue from CD patients compared with those detected in samples from non-IBD patients (Figure 1C). SUCNR1 staining was detected in epithelial cells and cells present in the lamina propria of human intestine (Figure 1D). Immunofluorescence experiments confirmed the expression of SUCNR1 in the cellular membrane and revealed that SUCNR1 co-localized with CD206, CD86 and  $\alpha$ -SMA positive cells in this tissue (Figure 1E).





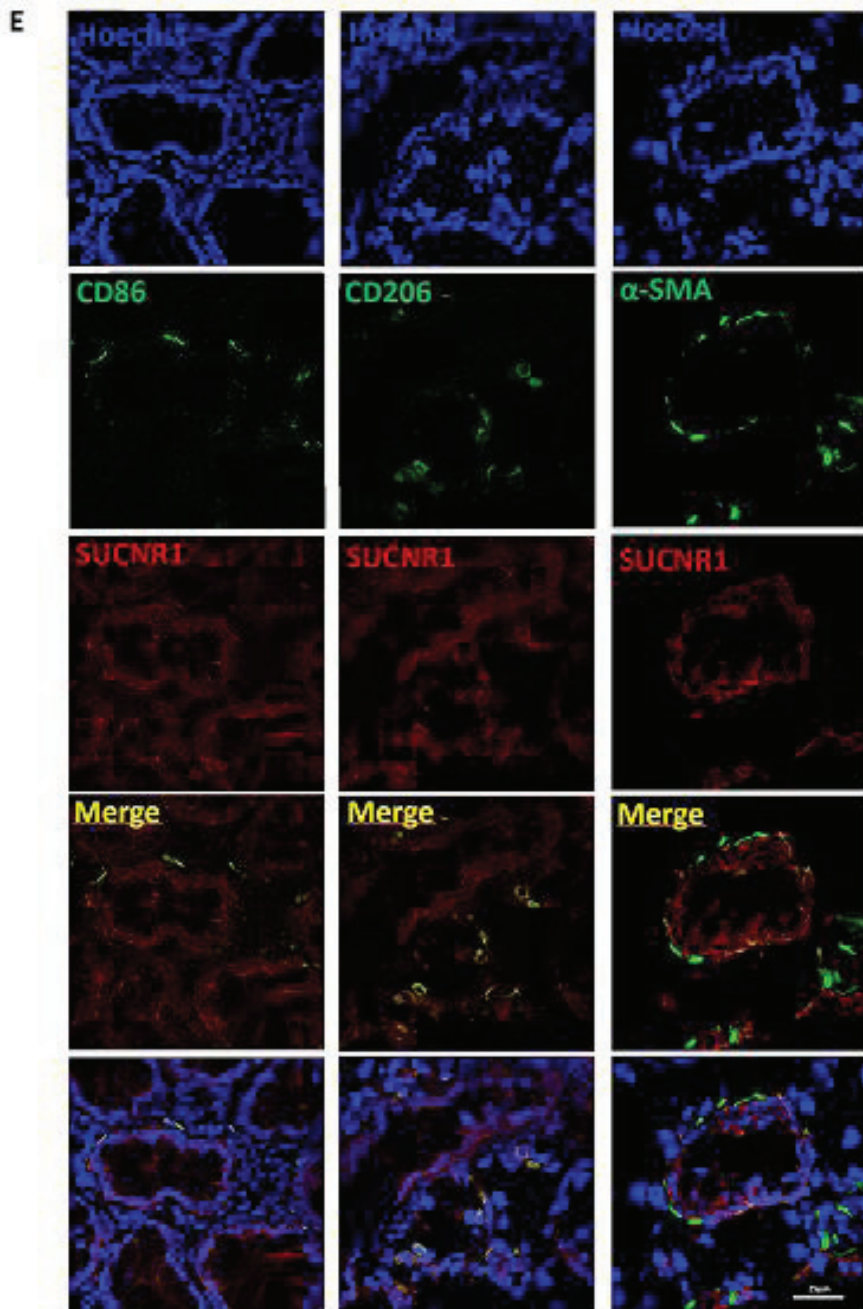


Figure 1. Serum and intestinal succinate levels and SUCNR1 intestinal expression are increased in CD patients. A) Graph shows succinate levels in serum from healthy donors (n=14) and CD patients (n=16). B) Graph shows succinate levels from intestinal mucosa from non-IBD (n=5) and CD patients (n=5). C) Graphs show, in intestinal resections, *Sucnr1*mRNA expression in CD patients (n=40), expressed as fold induction vs non-IBD (n=40) and SUCNR1 protein levels in

non-IBD (n=5) and CD patients (n=6); A representative western blot showing SUCNR1 protein levels in intestine from control and CD patients. D) A representative image showing SUCNR1 immunostaining in human intestine from non-IBD patients, of a total of 5 per group. E) A representative immunofluorescence images taken with the confocal microscope Leica TCS SP8 showing co-localization of SUCNR1 in CD86, CD206 and  $\alpha$ -SMA positive cells in the lamina propria of human intestine, of a total of 5 per group. Bars in graphs represent mean $\pm$ s.e.m. and significant differences vs the control group are shown by \*P<0.05.

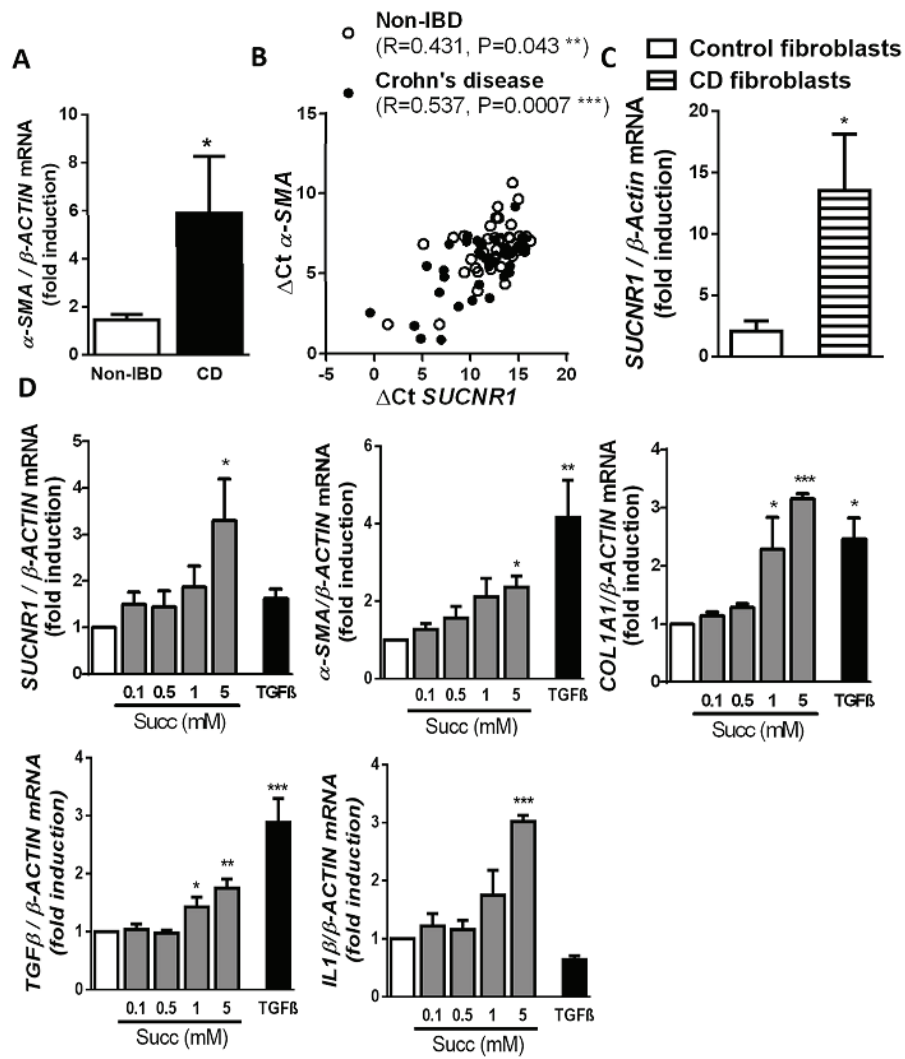
#### 4.2. SUCNR1 correlates with markers of fibrosis in intestinal tissue and it is increased in fibroblasts from CD patients

The mRNA expression of  $\alpha$ -SMA was significantly higher in intestinal tissue from CD patients than in that from control patients (Figure 2A) and a positive and significant correlation was detected between levels the of SUCNR1 and  $\alpha$ -SMA mRNA in intestinal tissue (Figure 2B) suggesting a role for this receptor in human intestinal fibrosis.

An increased expression of SUCNR1 was detected in primary fibroblasts isolated from intestinal tissue of CD patients compared with those obtained from non-IBD patients (Figure 2C). Treatment of fibroblasts with different concentrations of succinate showed a dose-dependent increase in the mRNA expression of SUCNR1, markers of fibrosis (COL1a1,  $\alpha$ -SMA), the pro-fibrotic factor TGF $\beta$  and the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  (Figure 2D). Succinate also increased, in a dose-dependent manner, the protein levels of SUCNR1 and  $\alpha$ -SMA and the phosphorylation of a pro-fibrotic transcription factor (STAT3) and a pro-inflammatory transcription factor (NF- $\kappa$ B) (Figure 2E). Neither induction of SUCNR1 nor phosphorylation of STAT3 or NF- $\kappa$ B was observed in fibroblasts treated with TGF $\beta$ . The specific activation of SUCNR1 receptor by succinate was confirmed by measuring levels of intracellular calcium. Succinate induces a significant increase in the amount of intracellular calcium in a dose-response manner whereas TGF- $\beta$  failed to do that (Figure 2F).

To confirm that SUCNR1 mediates the effects induced by succinate, we knocked down this receptor in primary fibroblasts. The efficiency of the transfection reached an 80% reduction in the expression of SUCNR1 receptor (Fig 2G). Succinate treatment failed to induce the expression of *COL1A1*,  $\alpha$ -SMA nor TGF- $\beta$  when SUCNR1 was knocked down. Of interest, TGF- $\beta$  treatment neither induced the expression of *COL1A1*,  $\alpha$ -SMA nor TGF- $\beta$  in the absence of SUCNR1 receptor (Fig 2G).





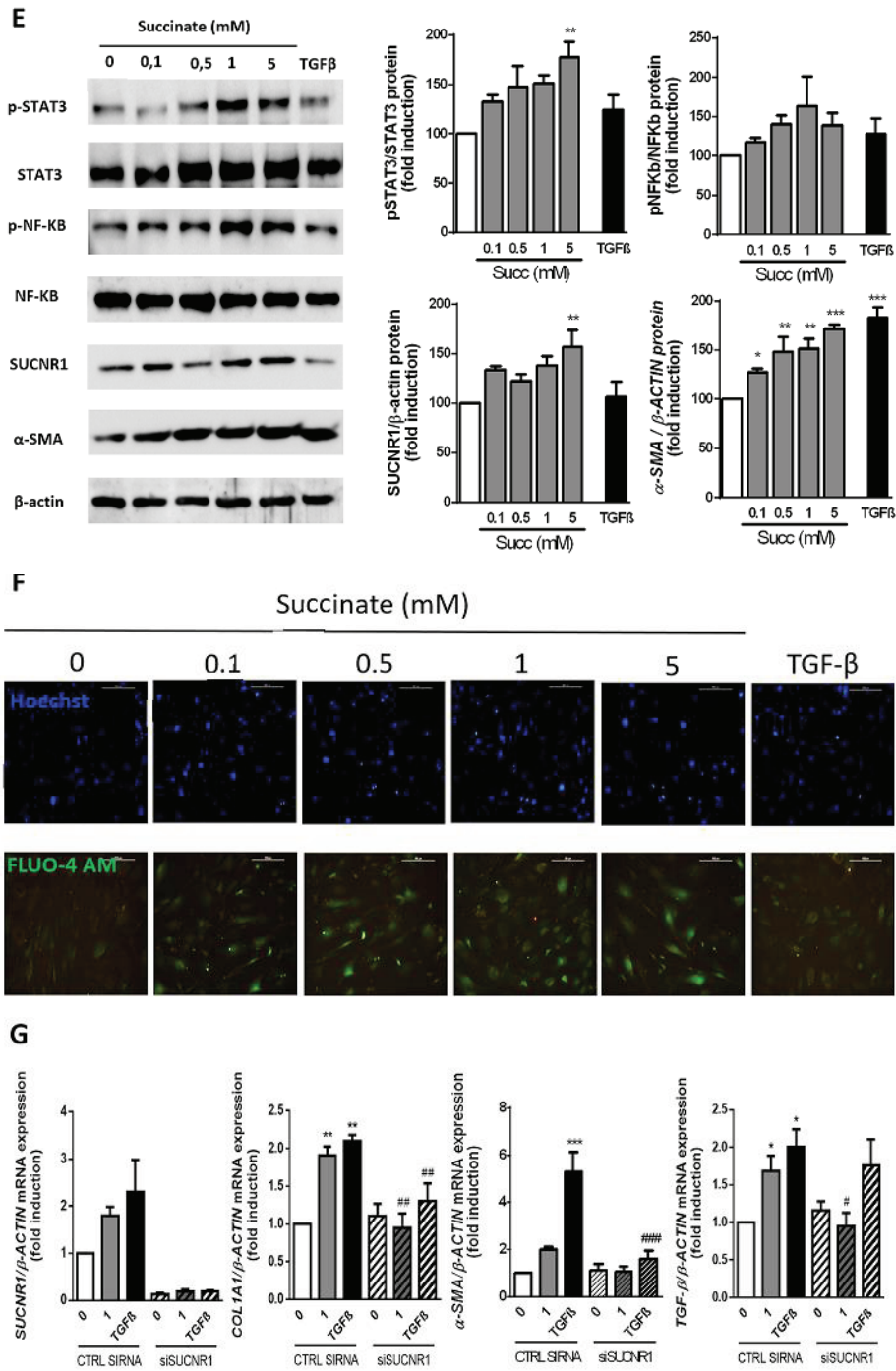


Figure 2. Increased SUCNR1 expression in human intestinal fibroblasts isolated from CD. A) mRNA expression of  $\alpha$ SMA in intestinal tissue from non-IBD (n=40) and CD patients (n=40). Bars in graph represent mean $\pm$ s.e.m and significant differences from non-IBD patients is shown by

\*P<0.05. B) A positive and significant correlation is detected between the expression of *SUCNR1* and  $\alpha$ -SMA in human intestinal tissue. C) Primary fibroblasts were isolated from the intestine of non-IBD (n=6) and CD patients (n=6) and graph shows *SUCNR1* mRNA expression (expressed as fold induction); significant differences from control fibroblasts is shown by \*P<0.05. D) Fibroblasts were treated with different concentrations of succinate (0, 0.1, 0.5, 1 and 5 mM) or TGF $\beta$  (5ng/ml) for 24 hours. Graphs show the effects of succinate and TGF $\beta$  on the mRNA expression of *SUCNR1*, *COL1A1*,  $\alpha$ SMA, *IL1 $\beta$*  and *TGF $\beta$* . E) Graphs and representative Western blots of a total of four showing the effects of different concentrations of succinate (0, 0.1, 0.5, 1 and 5 mM) or TGF $\beta$  on protein levels of *SUCNR1*, p-STAT3, STAT3, p-NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B,  $\alpha$ -SMA and  $\beta$ -ACTIN. Bars in graphs represent mean $\pm$ s.e.m. Significant differences from vehicle-treated fibroblasts is shown by \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001. F) Intracellular calcium was measured using the Fluo-4AM dye. Representative pictures of one out of three independent experiments. G) Primary fibroblasts were transfected with specific *SUCNR1* siRNA and treated with succinate 1mM of TGF- $\beta$  5ng/ml for 24 hours. Graphs show the *SUCNR1*, *COL1A1*,  $\alpha$ -SMA and *TGF- $\beta$*  mRNA expression (expressed as fold induction). Significant differences vs non treated cells are shown by \* P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 and significant differences vs respective control siRNA cells are shown by #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001.

#### 4.3. *SUCNR1*-deficient mice are protected from colitis

We used an experimental mouse model of inflammatory bowel disease based on the intra-rectal administration of TNBS to mice. This sensitizing agent induced, 2 days after its administration, a loss of body weight, a diminution in colon length and an increase of the histological damage score due to the inflammatory infiltrate and the slight disruption of the epithelial architecture (Figure 3A-C). A significant increased mRNA expression of *Sucnr1* was detected in the colon of TNBS-treated mice compared with levels detected in vehicle-treated mice (Figure 3D). Administration of TNBS to *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice showed that the loss of body weight was significantly attenuated compared with the one detected in TNBS-treated WT mice and the histological damage and the reduction in colon length were significantly prevented (Figure 3A-C).

Two days after TNBS administration, a significant increase in the expression of M1 markers (*Cd11c* and *iNOS*), and pro-inflammatory cytokines (*Il1 $\beta$* , *Il6* and *Tnfa*,) was detected in colonic tissue from WT mice compared with vehicle-treated mice while the expression of M2 markers (*Cd206*, *Fizz1*, *Ym1* and *Arg1*) was not significantly modified (Figure 3E). In *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice, TNBS failed to significantly modify the expression of M1 markers, pro-inflammatory cytokines and M2 markers with the exception of *Fizz1* that it was significantly reduced (Figure 3E). A detailed analysis between TNBS-treated WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice revealed a different expression of *Cd11c*, *iNOS*, *Fizz1*, *Tnfa*, *Il1 $\beta$* , *Il6* and *Il10* (Figure 3E). In vehicle-treated *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice, higher mRNA levels of the M2

markers were detected compared with vehicle-treated WT mice, which reached statistical significance for *Cd206* and *Fizz1* (Figure 3E).

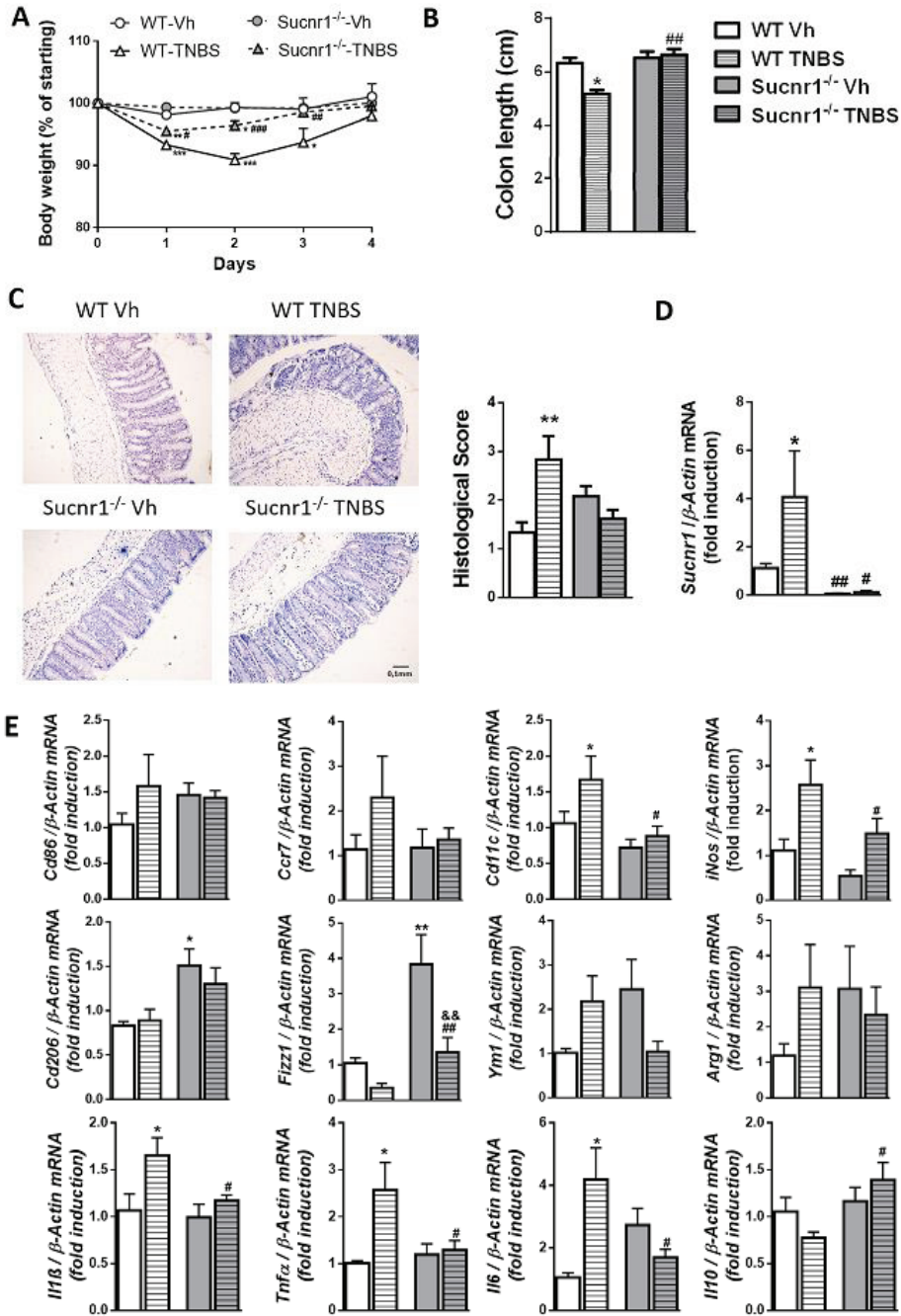


Figure 3. SUCNR1-deficient mice are protected from colitis. Acute colitis was induced in both wild-type (WT, n=23) and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice (n=25) by intrarectal administration of TNBS (3.5 mg per 20 g mice) or vehicle (EtOH 40%, Vh). Mice were killed 2 days after TNBS-administration. Graphs show: A) body weight as a percentage of starting weight, measured daily; B) colon length; C) histological damage score (according to the Wallace score parameters) and representative photographs of the mucosa; D) *Sucnr1* mRNA expression in intestinal tissue (expressed as fold induction); E) Relative mRNA expression levels of M1 markers (*Cd86*, *CcrR7*, *Cd11c* and *iNOS*), M2 markers (*Cd206*, *Fizz1*, *Ym1* and *Arg1*) and pro-inflammatory (*Tnfa*, *Il-6* and *Il-1β*) and antiinflammatory cytokines (*Il-10*) in both vehicle- and damaged-colon of TNBS-treated mice vs. the housekeeping gene β-actin and represented as fold induction vs. vehicle WT group. Points or bars in graphs represent mean±s.e.m. Significant differences in relation to the WT vehicle-treated group are shown by \*P<0.05 and \*\*P<0.01; from the WT TNBS-treated mice by # P<0.05 and ##P<0.01 and from the *Sucnr1*<sup>-/-</sup> vehicle-treated group by &&P<0.01.

#### 4.4. SUCNR1 mediates the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages

Peritoneal macrophages were isolated from both WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice and data showed that the expression of pro-inflammatory cytokines (*Il1β*, *Il6* and *TNFα*) was significantly lower in macrophages isolated from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice than in those derived from WT mice while no significant changes were detected in the expression of *Cd86*, *Cd206* and *Il10* (Figure 4). After treatment with LPS+IFNγ, macrophages from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> animals exhibited a significant diminution in *Il1β*, *Il6* and *Cd206* and increased levels of *Cd86* compared with the ones detected in macrophages from WT mice (Figure 4). M2a polarization by treatment of macrophages with IL4 revealed that, macrophages from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice exhibited significant lower levels of *Tnfa* and higher levels of *Cd206*, compared with the expression detected in WT macrophages (Figure 4)

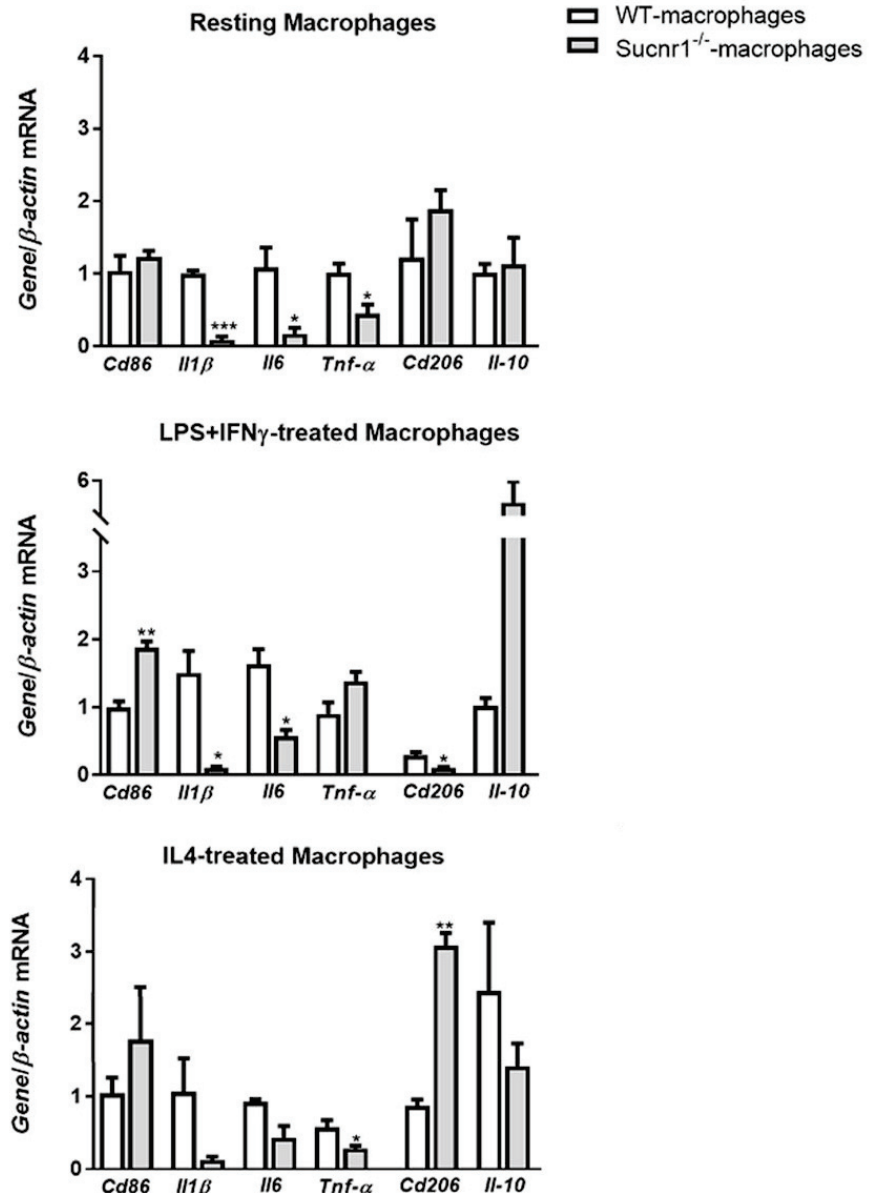


Figure 4. SUCNR1 mediates the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages. Murine peritoneal macrophages were obtained from WT ( $n=3$ ) and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice ( $n=3$ ) and polarized towards M1 or M2a macrophages with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  (LPS and IFN- $\gamma$ ) for 24 hours or interleukin-4 (IL4) for 72 hours, respectively. Graphs show gene/ $\beta$ -actin mRNA expression (fold induction vs resting WT macrophages). Significant differences from the respective group of WT macrophages are shown by \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  and \*\*\* $P<0.001$ .

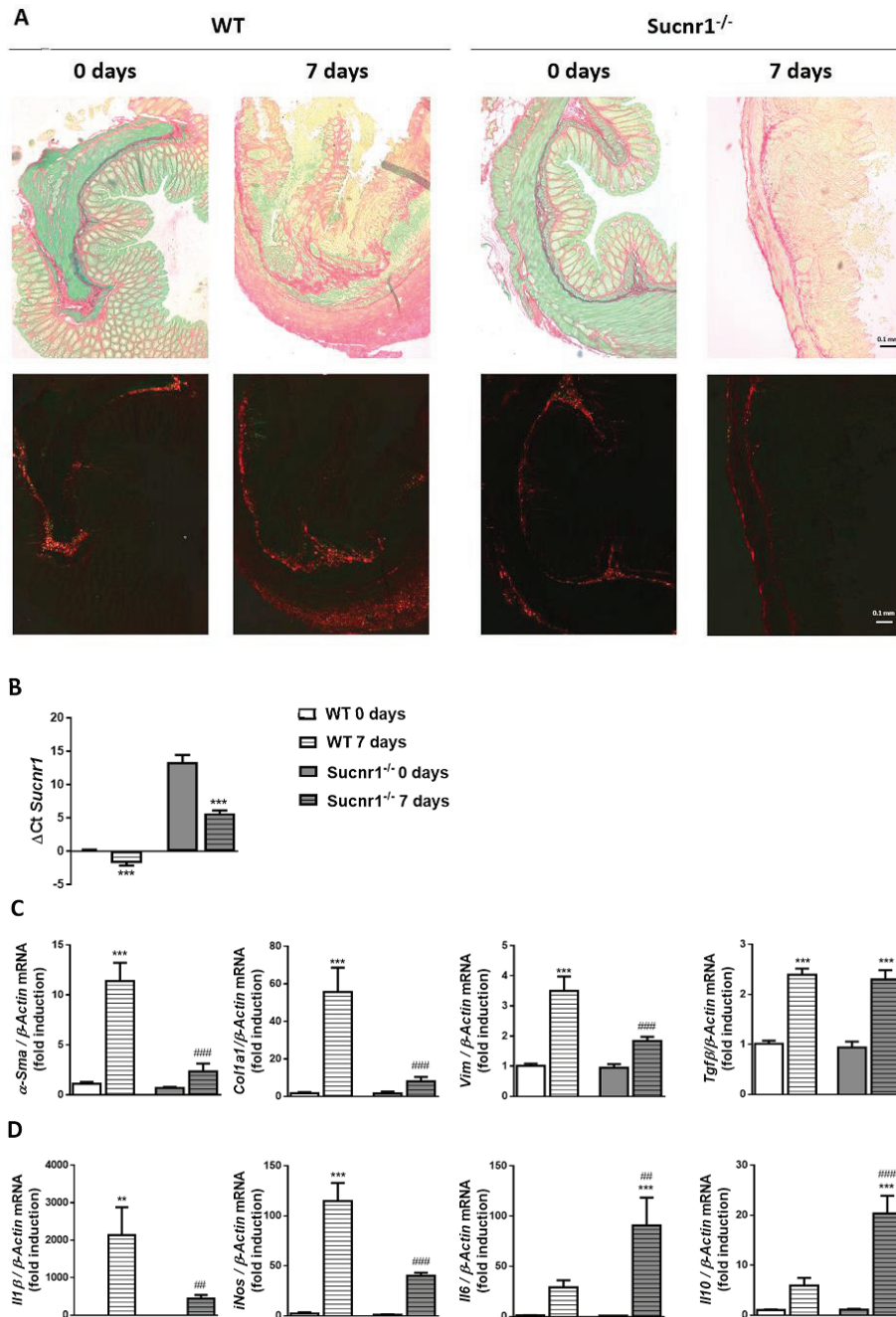
#### 4.5. Lack of SUCNR1 protects against intestinal fibrosis

We have analyzed the role of SUCNR1 in the heterotopic transplant mouse model of intestinal fibrosis. Intestinal grafts from both WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice were explanted 7 days after transplantation, and fibrosis was detected by analyzing the Sirius Red staining under transmission and polarized light. As shown in Figure 5A, explants from WT mice exhibited an increased collagen deposition compared with the thin collagen layer adjacent to the submucosa observed in intestinal tissue at day 0. These explants also presented an increased expression of fibrotic markers ( $\alpha$ -SMA, *Col1a1* and *Vimentin*), fibrogenic mediators (*TGF $\beta$* ) and enhanced *Sucnr1* mRNA expression compared with that detected in the corresponding non-transplanted tissues (Figure 5B, C). In contrast, grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice exhibited similar collagen deposition (Figure 5A) and similar mRNA levels of fibrotic markers between day 0 and day 7, which in turn were similar to those detected at day 0 in tissues from WT mice (Figure 5C). Of interest, grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice exhibited an increased mRNA expression of *TGF $\beta$*  seven days after transplantation that was similar to that detected in grafts from WT mice (Figure 5C).

This model of intestinal fibrosis is characterized by macrophage infiltration from the host into the intestinal graft as revealed by the significant increase in the mRNA expression of *F4/80* observed (Figure 5E) and by the fact that *Sucnr1* expression was detected in grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice, seven days after transplantation (Figure 5B). The increase in the *F4/80* expression was similar in explants from WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice but the mRNA expression of pro-inflammatory agents and macrophage markers significantly differed. An important increase in *Il1 $\beta$* , *iNOS*, *Il6*, *Cd86*, and *Cd16* was detected in intestinal tissue from WT mice, seven days after transplantation (Figure 5D, E); increased levels of *Il1 $\beta$* , *iNOS* and *Cd86* were also observed in grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice but they were significantly lower than those detected in WT grafts (Figure 5D, E). In contrast, the expression of *Il6*, *Il10*, *Cd206* and *Cd16* was significantly higher in explanted tissue from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice than in WT grafts.

Finally, primary fibroblasts were isolated from both WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> colonic tissues and were treated with succinate (1mM) or TGF $\beta$  (5ng/ml). As shown in Figure 5F, succinate but not TGF $\beta$  induced a significant increase in the mRNA expression of *Sucnr1*. However, both treatments significantly enhanced the expression of *Col1a1* in WT

fibroblasts and not in *Sucnr1*<sup>-/-</sup> cells, showing a role for *Sucnr1* in the activation of fibroblasts induced by both succinate and TGFβ in mice (Figure 5F).





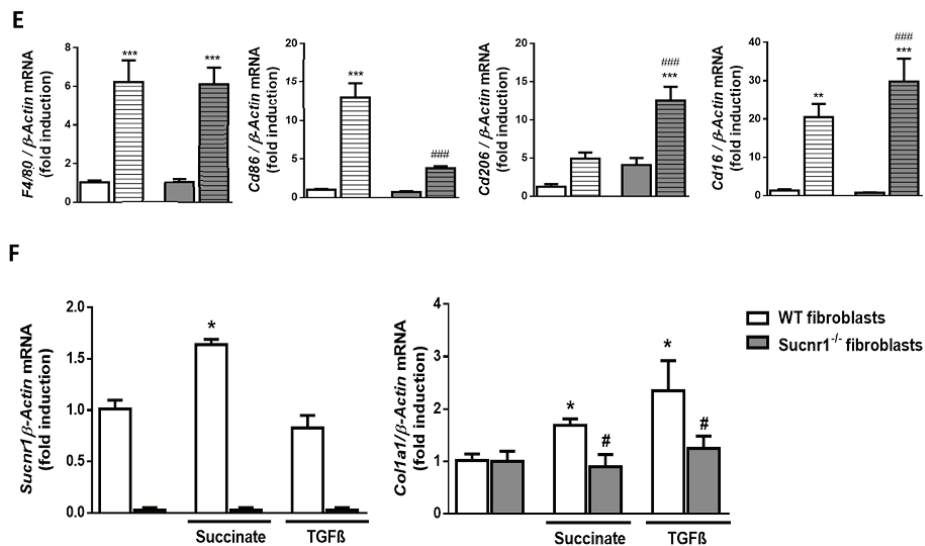


Figure 5. SUCNR1-deficient mice are protected against intestinal fibrosis. Murine intestinal fibrosis was induced with a heterotopic intestinal transplant model. Intestinal grafts from both WT (n=7) and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice (n=7) were obtained 7 days after transplantation. A) Sirius Red staining was performed in paraffin-embedded tissues. Representative pictures taken under transmission and polarized light. B) RNA from intestinal grafts from WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice was isolated and the expression of *Sucnr1* was analysed by qPCR. Graph show the  $\Delta$ Ct of each group. Significant differences from their respective intestinal graft at day 0 are shown by \*\*\* P<0.001. C, D and E) Graphs show the expression of pro-fibrotic markers (*Col1a1*,  $\alpha$ -SMA, *Vimentin* and *Tgf- $\beta$* ), pro-inflammatory cytokines (*Il1 $\beta$* , *iNos* and *Il-6*), anti-inflammatory cytokine (*Il10*) and macrophage markers (*F4/80*, *Cd86*, *Cd206* and *Cd16*). Results were normalized with  $\beta$ -actin and are represented as fold induction vs. intestinal grafts from WT at day 0. Bars in graphs represent mean $\pm$ s.e.m. Significant differences from intestinal WT grafts at day 0 is shown by \*\*P<0.01 or \*\*\*P<0.001 and from intestinal WT grafts at day 7 by ##P<0.01 or ###P<0.001. F) Primary murine intestinal fibroblasts were isolated from the colon of both WT (n=4) and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice (n=4) and were treated with succinate (1mM) or TGF $\beta$  (5ng/ml) for 24 hours and the mRNA expression of *Sucnr1* and *Col1a1* was analyzed by qPCR (n=4). Bars in graphs represent mean $\pm$ s.e.m. Significant differences from vehicle-treated fibroblasts is shown by \*P<0.05 and from the respective WT fibroblasts by #P<0.05.

## 5. DISCUSSION

The present study shows increased serum and intestinal levels of succinate and enhanced intestinal expression of SUCNR1 in CD patients. This receptor exacerbates the pro-inflammatory activity of macrophages and fibroblast activation and plays a role in murine colitis and intestinal fibrosis.

SUCNR1 belongs to the family of the metabolite-sensing G-protein-coupled receptors and it binds selectively to succinate. The activation of SUCNR1 by succinate has been revealed as important in the regulation of immune and metabolic functions<sup>12</sup>.

The present study localizes SUCNR1 in epithelial cells, macrophages and fibroblasts of human intestine, and shows for the first time an increased expression of SUCNR1 in intestinal tissue from CD patients compared with the one detected in non-IBD subjects. Previous studies have reported the up-regulation of SUCNR1 by succinate<sup>8, 15, 18</sup> and our data reveal increased levels of succinate in both the damaged intestinal tissue and serum from CD patients compared with those detected in controls. It seems likely that succinate accumulates in cells of the damaged intestine where the described stimuli for its release - hypoxia<sup>19, 16</sup>, high pro-inflammatory activity of macrophages<sup>7, 15</sup> and necrosis in inflamed tissue<sup>14</sup> - are present. From there, and once released to the extracellular milieu, succinate would reach the circulating blood. In this line, recent studies report increased levels of succinate in serum<sup>20</sup> and feces<sup>21</sup> in a murine model of colitis.

CD patients included in the present study exhibit a complicated behavior characterized by the presence of intestinal fibrosis. Our results demonstrate for the first time a higher expression of *Sucnr1* in fibroblasts isolated from the intestine of CD patients than in those obtained from control patients. Exogenous succinate increased the mRNA and protein expression of this receptor in intestinal fibroblasts and activates pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways and mediators, which is in line with previous studies performed in hepatic stellate cells<sup>8, 18</sup>. Of interest, a dose-dependent increase in calcium levels was detected in fibroblasts treated with succinate which, joined to results showing a reduced expression of pro-fibrotic markers in cells transiently transfected with siSUCNR1, demonstrate the role of the receptor in the effects of the metabolite. These effects strongly suggest a role for *sucnr1* in intestinal fibrosis associated to CD, which is reinforced by the positive and significant correlation between SUCNR1 expression and  $\alpha$ SMA detected in human intestine.

In Crohn's disease, the development of fibrosis is associated with chronic intestinal inflammation and we analyzed further the role of *Sucnr1* in intestinal inflammation and fibrosis by using *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice. We observed that the colitis induced by intrarectal administration of TNBS reproduces the increased *Sucnr1* expression detected in human samples from CD. In addition, and by using *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice, we demonstrated the involvement of this receptor in the body weight loss, the reduction in

colon length and the intestinal damage induced by this haptenizing agent. This model of colitis is characterized by macrophage infiltration and increased expression of pro-inflammatory cytokines<sup>22, 23</sup> and these changes were significantly prevented in TNBS-treated *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice. These observations joined to results obtained in isolated macrophages showing that, the absence of SUCNR1 significantly impairs the expression of pro-inflammatory cytokines in both constitutive and stimulated conditions, strongly support that *Sucnr1* is modulating macrophage activation *in vivo*. Our data are in line with previous evidences<sup>15</sup> and go further by showing that this receptor impairs the induced expression of M2 macrophage markers and anti-inflammatory cytokines which suggest that *Sucnr1* modulates macrophage polarization. In this line we found a diminished expression of M1 markers together with increased levels of M2 markers in the intestine of vehicle- and TNBS- treated *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice.

Intestinal fibrosis associated to Crohn's disease is characterized by an intense submucosal and subserosal ECM deposition<sup>2, 24</sup>. Several animal models of intestinal fibrosis have been proposed<sup>25</sup> and we consider that the heterotopic transplant model of fibrosis used in the present study reproduce some features of CD fibrosis such as transmural inflammation and ECM deposition<sup>26, 27</sup>. We observed an important submucosal and subserosal collagen accumulation and high levels of fibrosis markers associated with an increased expression of SUCNR1 in WT grafts seven days after transplantation. This receptor plays a fundamental role in intestinal fibrosis since little collagen deposition and low expression of fibrosis markers were detected in grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice. Increased F4/80 mRNA expression was detected in intestinal tissues from both *Sucnr1*<sup>-/-</sup> and WT mice, which shows that the absence of the receptor in the implants does not affect the ability of macrophages from the host to infiltrate the tissue. However, the pattern of gene expression of these macrophages significantly differed. Macrophage markers of a pro-inflammatory phenotype were highly expressed in WT grafts and much less in grafts from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice, that in turn, showed a higher expression of CD206, a marker of a regulatory macrophage phenotype. It seems likely that these differences, rather than cause, are consequence of the different extent of fibrosis, which in turn depends on the presence of *sucnr1* in those cells of the transplanted tissue mediating the fibrotic response. Of interest, graphs from both

groups showed an increased expression of CD16, a recently reported marker of profibrotic macrophages<sup>28</sup>, and of the well-known fibrogenic mediator, TGFβ<sup>1</sup>. The presence of similar levels of these pro-fibrotic elements in both, WT and *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice suggest that fibrosis, in the heterotopic transplant model, may depend mainly on the pro-inflammatory cytokines, although, a reduced cellular reactivity to fibrogenesis resulting from the lack of *Sucnr1* in intestinal tissue cannot be ruled out. In this line, the development of fibrosis is largely dependent on fibroblasts activated by signals derived from immune and non-immune cells<sup>29</sup>. Our results reproduce in murine intestinal fibroblasts the effects of succinate in human fibroblasts and go further by demonstrating that this metabolite stimulate these cells through *Sucnr1* activation. Interestingly, we found that the absence of this receptor reduced the pro-fibrotic effects of TGFβ in these cells. A recent study shows increased levels of succinate in fibroblasts treated with TGFβ,<sup>30</sup> but our results showing no increase in calcium levels after treatment of fibroblasts with TGFβ makes this possibility unlikely. We propose that *Sucnr1* exacerbates the response of fibroblasts to pro-fibrotic stimuli as it promotes the response of immune cells to pro-inflammatory agents<sup>14,15</sup>. As a whole, our data suggest that the absence of *Sucnr1* in fibroblasts determines to a large extent the reduced fibrotic response detected in intestinal tissue from *Sucnr1*<sup>-/-</sup> mice. Further studies using conditional deletion of *Sucnr1* will help to clarify the specific cellular role that this receptor plays in intestinal fibrosis.

In summary, our results show that CD patients present high levels of serum succinate and increased SUCNR1 expression in both surgical resections and intestinal fibroblasts and demonstrate for the first time a role for this receptor in murine intestinal inflammation and fibrosis. We propose that, in the intestinal microenvironment of CD patients with a stricturing or penetrating behavior, SUCNR1 signaling exacerbates inflammation and fibroblasts activation, and point to this receptor as a possible new pharmacological target for Crohn's disease treatment.

#### FUNDING

This work was supported by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad and the European Regional Development fund of the European Union (ERDF) (SAF2016-80072P),

CIBERehd (CB06/04/0071) and Generalitat Valenciana [PROMETEOII/2014/035, UGP-14-164, GV/2018/041].

#### AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

MDB, SC, DCM, JCR, CHS, conceived the experiments and analyzed the data. MDB, SC wrote the manuscript. DCM, JCR, PS, DOM, LG, conducted the experiments. JH, RA, FL, provided human CD tissue samples and provided intellectual input. MH, GR, JVE provided intellectual input. All authors reviewed the manuscript.

#### REFERENCES

1. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **18**, 1028-1040 (2012).
2. Rieder, F., Zimmermann, E. M., Remzi, F. H. & Sandborn, W. J. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut* **62**, 1072-1084 (2013).
3. Li, C. & Kuemmerle, J. F. Mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's disease. *Inflam. Bowel Dis.* **20**, 1250-1258 (2014).
4. Rieder, F., Fiocchi, C. & Rogler, G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **152**, 340-350 e346 (2017).
5. Mills, E. & O'Neill, L. A. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* **24**, 313-320 (2014).
6. Corcoran, S. E. & O'Neill, L. A. HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation. *J. Clin. Invest.* **126**, 3699-3707 (2016).
7. Tannahill, G. M., et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* **496**, 238-242 (2013).
8. Li, Y. H., Woo, S. H., Choi, D. H. & Cho, E. H. Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 853-858 (2015).
9. Xie, N., Tan, Z., Banerjee, S., Cui, H., Ge, J., Liu, R. M., Bernard, K., Thannickal, V. J. & Liu, G. Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 1462-1474 (2015).

10. Vallee, A., Lecarpentier, Y. & Vallee, J. N. Thermodynamic Aspects and Reprogramming Cellular Energy Metabolism during the Fibrosis Process. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2537 (2017).
11. Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B. & Hanson, J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol. Ther.* **159**, 56-65 (2016).
12. Tan, J. K., Mckenzie, C., Marino, E., Macia, L. & Mackay, C. R. Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors-Facilitators of Diet-Related Immune Regulation. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 371-402 (2017).
13. De Castro Fonseca, M., Aguiar, C. J., Da Rocha Franco, J. A., Gingold, R. N. & Leite, M. F. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun. Signal.* **14**, 3 (2016).
14. Rubic, T., et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* **9**, 1261-1269 (2008).
15. Littlewood-Evans, A., et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **213**, 1655-1662 (2016).
16. Van Diepen, J. A., et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* **60**, 1304-1313 (2017).
17. Serena, C., et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J.* (2018).
18. Le, C. T., Nguyen, G., Park, S. Y., Choi, D. H. & Cho, E. H. LY2405319, an analog of fibroblast growth factor 21 ameliorates alpha-smooth muscle actin production through inhibition of the succinate-G-protein couple receptor 91 (GPR91) pathway in mice. *PLoS One* **13**, e0192146 (2018).
19. Ariza, A. C., Deen, P. M. & Robben, J. H. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **3**, 22 (2012).
20. Shiomi, Y., et al. GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflam. Bowel Dis.* **17**, 2261-2274 (2011).

21. Osaka, T., Moriyama, E., Arai, S., Date, Y., Yagi, J., Kikuchi, J. & Tsuneda, S. Meta-Analysis of Fecal Microbiota and Metabolites in Experimental Colitic Mice during the Inflammatory and Healing Phases. *Nutrients* **9**, 1329 (2017).
22. Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L. I., Kuhl, A. A., Erben, U., May, C., Schulzke, J. D. & Siegmund, B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflam. Bowel Dis.* **21**, 1297-1305 (2015).
23. Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Calatayud, S., Hernandez, C., Esplugues, J. V. & Barrachina, M. D. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Muc. Immunol.* **9**, 986-998 (2016).
24. Rogler, G. & Hausmann, M. Factors Promoting Development of Fibrosis in Crohn's Disease. *Front. Med. (Lausanne)* **4**, 96 (2017).
25. Rieder, F., Kessler, S., Sans, M. & Fiocchi, C. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G786-801 (2012).
26. Goffin, L., et al. Anti-MMP-9 Antibody: A Promising Therapeutic Strategy for Treatment of Inflammatory Bowel Disease Complications with Fibrosis. *Inflam. Bowel Dis.* **22**, 2041-2057 (2016).
27. Meier, R., et al. Decreased Fibrogenesis After Treatment with Pirfenidone in a Newly Developed Mouse Model of Intestinal Fibrosis. *Inflam. Bowel Dis.* **22**, 569-582 (2016).
28. Salvador, P., et al. CD16+ Macrophages Mediate Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* (2018).
29. Lawrance, I. C., Rogler, G., Bamias, G., Breynaert, C., Florholmen, J., Pellino, G., Reif, S., Specca, S. & Latella, G. Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J. Crohns Colitis* **11**, 1491-1503 (2017).
30. Bernard, K., Logsdon, N. J., Benavides, G. A., Sanders, Y., Zhang, J., Darley-Usmar, V. M. & Thannickal, V. J. Glutaminolysis is required for transforming growth factor-beta1-induced myofibroblast differentiation and activation. *J. Biol. Chem.* **293**, 1218-1228 (2018).

31. Mccreath, K. J., Espada, S., Galvez, B. G., Benito, M., De Molina, A., Sepulveda, P. & Cervera, A. M. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes* **64**, 1154-1167 (2015).
32. Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Calatayud, S., Hernandez, C., Alvarez, A., Hinojosa, J., Esplugues, J. V. & Barrachina, M. D. M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis. *PLoS One* **8**, e78128 (2013).
33. Ortiz-Masia, D., Cosin-Roger, J., Calatayud, S., Hernandez, C., Alos, R., Hinojosa, J., Apostolova, N., Alvarez, A. & Barrachina, M. D. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Muc. Immunol.* **7**, 929-938 (2014).
34. Macias-Ceja, D. C., Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Salvador, P., Hernandez, C., Esplugues, J. V., Calatayud, S. & Barrachina, M. D. Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 2501-2511 (2017).
35. Ortiz-Masia, D., Diez, I., Calatayud, S., Hernandez, C., Cosin-Roger, J., Hinojosa, J., Esplugues, J. V. & Barrachina, M. D. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One* **7**, e48535 (2012).
36. Monleon, D., Morales, J. M., Barrasa, A., Lopez, J. A., Vazquez, C. & Celda, B. Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed.* **22**, 342-348 (2009).
37. Bodi, V., et al. Metabolomic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic resonance spectroscopy of peripheral blood serum: a translational study based on transient coronary occlusion models. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 1629-1641 (2012).
38. Garcia-Simon, M., Morales, J. M., Modesto-Alapont, V., Gonzalez-Marrachelli, V., Vento-Rehues, R., Jorda-Minana, A., Blanquer-Olivas, J. & Monleon, D. Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by <sup>1</sup>H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit. *PLoS One* **10**, e0140993 (2015).



## **II. BIBLIOGRAFIA**



Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009 Nov 19;361(21):2066-2078.

Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Ohman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol* 2018 Apr;53(4):379-389.

Ali T, Choe J, Awab A, Wagener TL, Orr WC. Sleep, immunity and inflammation in gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2013 Dec 28;19(48):9231-9239.

Ali T, Madhoun MF, Orr WC, Rubin DT. Assessment of the relationship between quality of sleep and disease activity in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Oct;19(11):2440-2443.

Allegra M, D'Acquisto F, Tesoriere L, Livrea MA, Perretti M. Cross-talk between minimally primed HL-60 cells and resting HUVEC reveals a crucial role for adhesion over extracellularly released oxidants. *Biochem Pharmacol* 2011;81:396-01.

Allegra M, Ianaro A, Tersigni M, Panza E, Tesoriere L, Livrea MA. Indicaxanthin from cactus pear fruit exerts anti-inflammatory effects in carageenin-induced rat pleurisy. *J Nutr* 2014;144:185-92.

Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor a production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut* 1997;41:487-93.

Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015 Apr;12(4):205-217.

Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018 Jan;15(1):39-49.

Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Sleep duration affects risk for ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014 Nov;12(11):1879-1886.

Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011 Mar;43(3):246-252.

Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg (Lond)* 2016 Aug 19;11:9-15.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012 Feb 16;3:22.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000 Aug;1(2):113-118.

Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011 Mar;25(3):397-407.

Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol Rev* 2014 Jul;260(1):102-117.

Baxt LA, Xavier RJ. Role of Autophagy in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Gastroenterology* 2015 Sep;149(3):553-562.

Bernardo D, Chaparro M, Gisbert JP. Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol Nutr Food Res* 2018 Apr;62(7):e1700931.

Bernardo D, Sanchez B, Al-Hassi HO, Mann ER, Urdaci MC, Knight SC, et al. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide. *PLoS One* 2012;7(5):e36262.

Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, Poli G. Inflammatory bowel disease: mechanism, redox considerations, and therapeutic targets. *Antioxid Redox Signaling* 2013;19:1711-47.

Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* 2013 Aug 1;126(Pt 15):3237-3247.

Blumberg RS. Environment and Genes: What Is the Interaction? *Dig Dis* 2016;34(1-2):20-26.

Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004 Jun;25(6):280-288.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001 Nov 1;167(9):4974-4980.

Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 1999 Oct;171:45-87.

Burke KE, Boumitri C, Ananthkrishnan AN. Modifiable Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2017 May;19(5):21-017-0562-0.

Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* 2013 Nov;62(11):1653-1664.

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008 Nov 13;456(7219):259-263.

Canonico B, Cesarini E, Salucci S, Luchetti F, Falcieri E, Di Sario G, et al. Defective Autophagy, Mitochondrial Clearance and Lipophagy in Niemann-Pick Type B Lymphocytes. *PLoS One* 2016 Oct 31;11(10):e0165780.

Castaneda FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S, Kolachala VL, et al. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 2005 Dec;129(6):1991-2008.

Castillo EF, Dekonenko A, Arko-Mensah J, Mandell MA, Dupont N, Jiang S, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Nov 13;109(46):E3168-76.

Chan SN, Low END, Raja Ali RA, Mokhtar NM. Delineating inflammatory bowel disease through transcriptomic studies: current review of progress and evidence. *Intest Res* 2018 Jul;16(3):374-383.

Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY. TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ* 2013 Mar;20(3):515-523.

Chen JM, Liu T, Gao S, Tong XD, Deng FH, Nie B. Efficacy of noninvasive evaluations in monitoring inflammatory bowel disease activity: A prospective study in China. *World J Gastroenterol* 2017 Dec 14;23(46):8235-8247.

Choy MC, Visvanathan K, De Cruz P. An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2017 Jan;23(1):2-13.

Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 2010 Jan 19;49(2):304-311.

Conway KL, Kuballa P, Khor B, Zhang M, Shi HN, Virgin HW, et al. ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* 2013 Apr;9(4):528-537.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010 Jan;16(1):90-97.

Correa PR, Kruglov EA, Thompson M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson MH. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatol* 2007 Aug;47(2):262-269.

Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Alvarez A, Hinojosa J, et al. M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis. *PLoS One* 2013 Oct 22;8(10):e78128.

Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Esplugues JV, Barrachina MD. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* 2016 Jul;9(4):986-998.

Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med (Lausanne)* 2014 Aug 25;1:24.

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011 May;140(6):1785-1794.

Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013 Feb;123(2):700-711.

Danese S. New therapies for inflammatory bowel disease: from the bench to the bedside. *Gut* 2012;61:918-32.

Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011 Sep 2;146(5):772-784.

Dave M, Papadakis KA, Faubion WA, Jr. Immunology of inflammatory bowel disease and molecular targets for biologics. *Gastroenterol Clin North Am* 2014 Sep;43(3):405-424.

de Ridder L, Waterman M, Turner D, Bronsky J, Hauer AC, Dias JA, et al. Use of Biosimilars in Paediatric Inflammatory Bowel Disease: A Position Statement of the ESPGHAN Paediatric IBD Porto Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015 Oct;61(4):503-508.

de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016 Jan;13(1):13-27.

Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 2008 Apr 9;27(7):1110-1121.

Dembitsky VM, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S, Trakhtenberg S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. *Food Res Int* 2011;44:1671-01.

Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* 2018;14(2):243-251.

Diaz Pena R, Valdes E, Cofre C, Castro-Santos P. Th17 response and autophagy--main pathways implicated in the development of inflammatory bowel disease by genome-wide association studies. *Rev Esp Enferm Dig* 2015 Sep;107(9):559-565.

Dionne S, Duchatelier CF, Seidman EG. The influence of vitamin D on M1 and M2 macrophages in patients with Crohn's disease. *Innate Immun* 2017 Aug;23(6):557-565.

Domenech E, Manosa M, Cabre E. An overview of the natural history of inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* 2014;32(4):320-327.

Dorfel D, Appel S, Grunebach F, Weck MM, Muller MR, Heine A, et al. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 2005 Apr 15;105(8):3199-3205.

Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014;27(4):294-303.

El-Khider F, McDonald C. Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig Dis* 2016;34(1-2):27-34.

Eri R, Kodumudi KN, Summerlin DJ, Srinivasan M. Suppression of colon inflammation by CD80 blockade: evaluation in two murine models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Apr;14(4):458-470.

Esposito E, Mazzon E, Riccardi L, Caminiti R, Meli R, Cuzzocrea S. Matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2 activity and expression is reduced by melatonin during experimental colitis. *J Pineal Res* 2008 Sep;45(2):166-173.

Esteban-Martinez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, Salazar-Roa M, Marino G, Seco E, et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J* 2017 Jun 14;36(12):1688-1706.

Everts B, Amiel E, van der Windt GJ, Freitas TC, Chott R, Yarasheski KE, et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* 2012 Aug 16;120(7):1422-1431.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF, et al. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between Treg and Th17 cells. *Eur J Immunol* 2007 Nov;37(11):3155-3163.

Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005 Sep;2(9):416-422.

Frei SM, Hemsley C, Pesch T, Lang S, Weber A, Jehle E, et al. The role for dickkopf-homolog-1 in the pathogenesis of Crohn's disease-associated fistulae. *PLoS One* 2013 Nov 8;8(11):e78882.

Frei SM, Pesch T, Lang S, Weber A, Jehle E, Vavricka SR, et al. A role for tumor necrosis factor and bacterial antigens in the pathogenesis of Crohn's disease-associated fistulae. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Dec;19(13):2878-2887.

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 2008 May;19(5):2092-2100.

Gandía-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F. Biological activities of plant pigments betalains. *Food Sci Nutr* 2014.

Garrido-Mesa J, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A et al. A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmacol Res* 2015;97:48-63.

Ge L, Schekman R. The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane. *Autophagy* 2014 Jan;10(1):170-172.

Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014 Jan;13(1):3-10.

Gerner RR, Moschen AR, Tilg H. Targeting T and B lymphocytes in inflammatory bowel diseases: lessons from clinical trials. *Dig Dis* 2013;31(3-4):328-335.

Gilroy L and Allen PB. Is there a role vedolizumab in the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease? *Clin Exp Gastroenterol* 2014;7:163-72.

Girardelli M, Basaldella F, Paolera SD, Vuch J, Tommasini A, Martelossi S, et al. Genetic profile of patients with early onset inflammatory bowel disease. *Gene* 2018 Mar 1;645:18-29.



Goffin L, Fagagnini S, Vicari A, Mamie C, Melhem H, Weder B, et al. Anti-MMP-9 Antibody: A Promising Therapeutic Strategy for Treatment of Inflammatory Bowel Disease Complications with Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis* 2016 Sep;22(9):2041-2057.

Grainger JR, Konkel JE, Zangerle-Murray T, Shaw TN. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflugers Arch* 2017 Apr;469(3-4):527-539.

Gross A, Pack LAP, Schacht GM, Kant S, Ungewiss H, Meir M, et al. Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunol* 2018 Aug 16.

Guo BJ, Bian ZX, Qiu HC, Wang YT, Wang Y. Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2017 Aug;1401(1):37-48.

Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2008 Jan;28(2):718-731.

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 2010 May 14;141(4):656-667.

Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S, Le T, Liaw C, Connolly DT, et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009 May;85(5):837-843.

Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2014 Jan;146(1):67-75.e5.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005 Jul;129(1):50-65.

He C, Baba M, Cao Y, Klionsky DJ. Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell* 2008 Dec;19(12):5506-5516.

He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 2004 May 13;429(6988):188-193.

He W, Newman JC, Wang MZ, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012 Sep;23(9):467-476.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Herbach KM, Stintzing FC and Carle R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hydroxybetanin solutions. *J Agric Food Chem* 2006;54:390-98.

Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 2013 Mar;137(3):283-297.

Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum* 2001 Jul;44(7):1540-1544.

Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor- $\kappa$ B and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of crohn disease. *J Biol Chem* 2005;280:14981-88.

Hooper KM, Barlow PG, Stevens C, Henderson P. Inflammatory Bowel Disease Drugs: A Focus on Autophagy. *J Crohns Colitis* 2017 Jan;11(1):118-127.

Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Yam MF, Hashim MA, Chung PL, et al. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic toxicity studies. *Regul Toxicol Pharm* 2012;63:106-14.

Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011 Mar;140(3):957-965.

Huber LA, Teis D. Lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Curr Opin Cell Biol* 2016 Apr;39:8-14.

Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PD, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 2012 Dec;61(12):1693-1700.

Huett A, Goel G, Xavier RJ. A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2010 Jul;26(4):302-309.

Impellizzeri D, Bruschetta G, Di Paola, R, Ahmad A, Campolo M, Cuzzocrea S et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (Bje) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin Nutr* 2014;XXX:1-9.

Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J* 2011 Sep 15;438(3):433-436.

Inoue T, Murano M, Kuramoto T, Ishida K, Kawakami K, Abe Y, et al. Increased proliferation of middle to distal colonic cells during colorectal carcinogenesis in experimental murine ulcerative colitis. *Oncol Rep* 2007 Dec;18(6):1457-1462.

Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* 2017 May 5;356(6337):513-519.

Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, Kazumori H, Kinoshita Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J Gastroenterol* 2009;44(11):1097-1108.

Jacquel A, Obba S, Boyer L, Dufies M, Robert G, Gounon P, et al. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood* 2012 May 10;119(19):4527-4531.

Janeway CA, Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

Jenkins SJ, Hume DA. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends Immunol* 2014 Aug;35(8):358-367.

Jesuratnam-Nielsen K, Logager V, Rezanavaz-Gheshlagh B, Munkholm P, Thomsen H. Plain magnetic resonance imaging as an alternative in evaluating inflammation and bowel damage in inflammatory bowel disease-a prospective comparison with conventional magnetic resonance follow-through. *Scand J Gastroenterol* 2015;50:519-27.

Jia Z, Nallasamy P, Liu D, Shah H, Li JZ, Chitrakar R et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocytes adhesion to endothelial cells via suppressing IKB-a/NF-kB signaling pathway. *J Nutr Biochem* 2015;26:293-02.

Jiang H, Shen J, Ran Z. Epithelial-mesenchymal transition in Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 2018 Mar;11(2):294-303.

Jobin C. Probiotics and ileitid:could augmentation of TNF/NFkB activity be the aswer? *Gut Microbes* 2010;1:196-99.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531-564.

Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2014 Dec;44(11):328-334.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, et al. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut* 2015 Mar;64(3):504-517.

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 2008 Jun;118(6):2269-2280.

Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017 Feb;152(2):313-321.e2.

Kaser A, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2010 Jan;3(1):11-16.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.

Kaur M, Panikkath D, Yan X, Liu Z, Berel D, Li D, et al. Perianal Crohn's Disease is Associated with Distal Colonic Disease, Strictureing Disease Behavior, IBD-Associated Serologies and Genetic Variation in the JAK-STAT Pathway. *Inflamm Bowel Dis* 2016 Apr;22(4):862-869.

Ke P, Shao BZ, Xu ZQ, Chen XW, Liu C. Intestinal Autophagy and Its Pharmacological Control in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* 2017 Jan 9;7:695.

Kedia S, Ahuja V. Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in India: The Great Shift East. *Inflamm Intest Dis* 2017 Nov;2(2):102-115.

Kelley KA, Kaur T, Tsikitis VL. Perianal Crohn's disease: challenges and solutions. *Clin Exp Gastroenterol* 2017 Feb 8;10:39-46.

Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 2015 Jul;25(7):771-784.

Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J Pathol* 2008 Jan;214(2):242-259.

Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 Jun 15;474(7351):307-317.

Kietzmann T, Gorkach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005 Aug-Oct;16(4-5):474-486.

Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004 May;53(5):701-709.

Kish L, Hotte N, Kaplan GG, Vincent R, Tso R, Ganzle M, et al. Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PLoS One* 2013 Apr 24;8(4):e62220.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12(1):1-222.

Kmieć Z, Cyman M, Slebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci* 2017 Mar;62(1):1-16.

Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010 Jun 10;115(23):4742-4749.

Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010 Oct 22;40(2):280-293.

Kuhl AA, Erben U, Kredel LI, Siegmund B. Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 2015 Dec 7;6:613.

Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 2008;3:427-455.

Lapaquette P, Guzzo J, Bretillon L, Bringer MA. Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation. *Mediators Inflamm* 2015;2015:398483.

Latella G. Redox Imbalance in Intestinal Fibrosis: Beware of the TGFbeta-1, ROS, and Nrf2 Connection. *Dig Dis Sci* 2018 Feb;63(2):312-320.

Latella G, Di Gregorio J, Flati V, Rieder F, Lawrance IC. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol* 2015 Jan;50(1):53-65.

Latella G, Rieder F. Intestinal fibrosis: ready to be reversed. *Curr Opin Gastroenterol* 2017 Jul;33(4):239-245.

Latella G, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, et al. Results of the 4th scientific workshop of the ECCO (I): pathophysiology of intestinal fibrosis in IBD. *J Crohns Colitis* 2014 Oct;8(10):1147-1165.

Lawrance IC. What is left when anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases fails? *World J Gastroenterol* 2014 Feb 7;20(5):1248-1258.

Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011 Oct 25;11(11):750-761.

Le CT, Nguyen G, Park SY, Choi DH, Cho EH. LY2405319, an analog of fibroblast growth factor 21 ameliorates alpha-smooth muscle actin production through inhibition of the succinate-G-protein couple receptor 91 (GPR91) pathway in mice. *PLoS One* 2018 Feb 14;13(2):e0192146.

Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 2007 Mar 9;315(5817):1398-1401.

Lee HY, Kim J, Quan W, Lee JC, Kim MS, Kim SH, et al. Autophagy deficiency in myeloid cells increases susceptibility to obesity-induced diabetes and experimental colitis. *Autophagy* 2016 Aug 2;12(8):1390-1403.

Lee JP, Foote A, Fan H, Peral de Castro C, Lang T, Jones SA, et al. Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages. *Autophagy* 2016 Jun 2;12(6):907-916.

Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009 Jan;136(1):257-267.

Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V, Brazier F, Debeugny S, Marti R, et al. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007 Jan;102(1):122-131.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008 Jan 11;132(1):27-42.

Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011 Jan 20;469(7330):323-335.

Lewis JD, Abreu MT. Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2017 Feb;152(2):398-414.e6.

Li F, He X, Ye D, Lin Y, Yu H, Yao C, et al. NADP(+)-IDH Mutations Promote Hypersuccinylation that Impairs Mitochondria Respiration and Induces Apoptosis Resistance. *Mol Cell* 2015 Nov 19;60(4):661-675.

Li H, Li Y, Jiao J, Hu HM. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nat Nanotechnol* 2011 Sep 18;6(10):645-650.

Li YH, Choi DH, Lee EH, Seo SR, Lee S, Cho EH. Sirtuin 3 (SIRT3) Regulates alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Production through the Succinate Dehydrogenase-G Protein-coupled Receptor 91 (GPR91) Pathway in Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem* 2016 May 6;291(19):10277-10292.

Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH. Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 Aug 7;463(4):853-858.

Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* 2010 Jun 25;38(6):864-878.

Limketkai BN, Mullin GE, Limsui D, Parian AM. Role of Vitamin D in Inflammatory Bowel Disease. *Nutr Clin Pract* 2017 Jun;32(3):337-345.

Lin SM, Lin BH, Hsieh WM, Ko HJ, Liu ChD, Chen LG et al. Structural identification and bioactives of red-violet pigments present in *Basella alba* fruits. *J Agric Food Chem* 2010;58:10364-72.

Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kuhl AA, Erben U, et al. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2015 Jun;21(6):1297-1305.

Littlewood-Evans A, Sarret S, Apfel V, Loesle P, Dawson J, Zhang J, et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2016 Aug 22;213(9):1655-1662.

Liu T, Tang Q, Liu K, Xie W, Liu X, Wang H, et al. TRIM11 Suppresses AIM2 Inflammasome by Degrading AIM2 via p62-Dependent Selective Autophagy. *Cell Rep* 2016 Aug 16;16(7):1988-2002.

Liu TF, McCall CE. Deacetylation by SIRT1 Reprograms Inflammation and Cancer. *Genes Cancer* 2013 Mar;4(3-4):135-147.

Liu YH, Ding Y, Gao CC, Li LS, Wang YX, Xu JD. Functional macrophages and gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2018 Mar 21;24(11):1181-1195.

Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol* 2015 Nov 2;6:551.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Lugo-Radillo A, Delgado-Enciso I, Peña-Beltrán E. Betanidin significantly reduces blood glucose levels in Balb/c mice fed with an atherogenic diet. *Nat Prod Bioprospect* 2012;2:154-5.

Luo H, Cai Y, Peng Z, Liu T, Yang S. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chem Cent J* 2014;8:1-7.

Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood* 2007 Apr 15;109(8):3260-3269.

Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004 Mar 12;303(5664):1662-1665.

Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 Jun 15;474(7351):298-306.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013 Jan;229(2):176-185.

Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG, Stio M. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008 May;14(5):597-604.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008 Jan 1;13:453-461.

Martinez-Martin N, Maldonado P, Gasparrini F, Frederico B, Aggarwal S, Gaya M, et al. A switch from canonical to noncanonical autophagy shapes B cell responses. *Science* 2017 Feb 10;355(6325):641-647.

Matsuzawa-Ishimoto Y, Hwang S, Cadwell K. Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol* 2018 Apr 26;36:73-101.

Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Jul;19(8):1772-1788.

Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Riccardi L, Muia C, Di Bella P, et al. Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis. *J Pineal Res* 2006 Nov;41(4):363-373.



McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008 Sep;40(9):1107-1112.

McGettrick AF, O'Neill LA. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem* 2013 Aug 9;288(32):22893-22898.

McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):735-738.

Meier R, Lutz C, Cosin-Roger J, Fagagnini S, Bollmann G, Hunerwadel A, et al. Decreased Fibrogenesis After Treatment with Pirfenidone in a Newly Developed Mouse Model of Intestinal Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis* 2016 Mar;22(3):569-582.

Menning A, Loddenkemper C, Westendorf AM, Szilagyi B, Buer J, Siewert C, et al. Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *Eur J Immunol* 2010 Sep;40(9):2539-2548.

Meroni E, Stakenborg N, Viola MF, Boeckxstaens GE. Intestinal macrophages and their interaction with the enteric nervous system in health and inflammatory bowel disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2018 Jul 11:e13163.

Middel P, Raddatz D, Gunawan B, Haller F, Radzun HJ. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* 2006 Feb;55(2):220-227.

Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* 2008 Apr;4(3):309-314.

Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 2014 May;24(5):313-320.

Mintern JD, Harris J. Autophagy and immunity. *Immunol Cell Biol* 2015 Jan;93(1):1-2.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011 Nov 11;147(4):728-741.

Mizushina Y, Ogawa Y, Onodera T, Kuriyama I, Sakamoto Y, Nishikori S et al. Inhibition of mammalian DNA polymerases and the suppression of inflammatory and allergic responses by tyrosol from used activated charcoal waste generated during sake production. *J Agric Food Chem* 2014;62:7779-86.

Mizushina Y, Ogawa Y, Onodera T, Kuriyama I, Sakamoto Y, Nishikori S, et al. Inhibition of mammalian DNA polymerases and the suppression of inflammatory and allergic responses by tyrosol from used activated charcoal waste generated during sake production. *J Agric Food Chem* 2014 Aug 6;62(31):7779-7786.

Mohd Adzim Khalili R, Norhayati AH, Rokiah MY, Asmah R, Siti Muskinah M, Abdul Manaf A. Hypocholesterol effect of red pitaya (*Hylocereus* sp.) on hypercholesterolemia induced rats. *Int Food Res J* 2009;16:431-40.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.

Monteleone G, Caruso R, Pallone F. Targets for new immunomodulation strategies in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014 Jan;13(1):11-14.

Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003 Jul 3;424(6944):88-93.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008 Dec;8(12):958-969.

Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun* 2011;3(6):550-564.

Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997 Apr;156:145-166.

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011 Mar;12(3):222-230.

Negróni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati L. NOD2 and inflammation: current insights. *J Inflamm Res* 2018 Feb 12;11:49-60.

Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy* 2016;12(2):245-260.

Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol* 2014 Jan;7(1):6-19.

Newberry RD, Lorenz RG. Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev* 2005 Aug;206:6-21.

Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2015 Sep 28;6:493.

Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005 Jan 14;307(5707):254-258.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell* 2016 Jun 30;166(1):21-45.

Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 2003 May;33(5):1250-1259.

Obba S, Hizir Z, Boyer L, Selimoglu-Buet D, Pfeifer A, Michel G, et al. The PRKAA1/AMPKalpha1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. *Autophagy* 2015;11(7):1114-1129.

O'Neill LA, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* 2016 Jan 11;213(1):15-23.

Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2012 May;23(10):1860-1873.

Ortiz-Masiá D, Díez I, Calatayud S, Hernández C, Cosín-Roger J, Hinojosa J et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *Plos one* 2012;7:1-11.

Ortiz-Masia D, Cosin-Roger J, Calatayud S, Hernandez C, Alos R, Hinojosa J, et al. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 2014 Jul;7(4):929-938.

Osaka T, Moriyama E, Arai S, Date Y, Yagi J, Kikuchi J, et al. Meta-Analysis of Fecal Microbiota and Metabolites in Experimental Colitic Mice during the Inflammatory and Healing Phases. *Nutrients* 2017 Dec 6;9(12):10.3390/nu9121329.

Panes J, Rimola J. Perianal fistulizing Crohn's disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017 Nov;14(11):652-664.

Park ChM and Song YS. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- $\kappa$ B/AP-1/PI3K-Akt signaling cascade in raw 264.7 cells. *Nutr Res Pract* 2013;7:423-29.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Parmar AS, Lappalainen M, Paavola-Sakki P, Halme L, Farkkila M, Turunen U, et al. Association of celiac disease genes with inflammatory bowel disease in Finnish and Swedish patients. *Genes Immun* 2012 Sep;13(6):474-480.

Paul S, Kashyap AK, Jia W, He YW, Schaefer BC. Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB. *Immunity* 2012 Jun 29;36(6):947-958.

Pavel M, Rubinsztein DC. Mammalian autophagy and the plasma membrane. *FEBS J* 2017 Mar;284(5):672-679.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002 Aug 1;33(3):311-322.

Pengo N, Scolari M, Oliva L, Milan E, Mainoldi F, Raimondi A, et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol* 2013 Mar;14(3):298-305.

Peti-Peterdi J, Kang JJ, Toma I. Activation of the renal renin-angiotensin system in diabetes--new concepts. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Oct;23(10):3047-3049.

Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans* 2016 Oct 15;44(5):1499-1505.

Puleston DJ, Zhang H, Powell TJ, Lipina E, Sims S, Panse I, et al. Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation. *Elife* 2014 Nov 11;3:10.7554/eLife.03706.

Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* 2013 Sep 12;154(6):1285-1299.

Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med* 2017 Dec;6(1):24-017-0154-5. Epub 2017 Jul 26.

Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, Cloonan SM. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy* 2018;14(2):221-232.

Raman M, Milestone AN, Walters JR, Hart AL, Ghosh S. Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Therap Adv Gastroenterol* 2011 Jan;4(1):49-62.

Ramli NS, Brown L, Ismail P and Rahmat A. Effects of red pitaya juice supplementation on cardiovascular and hepatic changes in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome rats. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:1-10.

Randall-Demllo S, Chieppa M, Eri R. Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Front Immunol* 2013 Sep 30;4:301.

Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci* 2017 Nov 1;188:53-67.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004 Jun;36(6):585-595.

Recio C, Lucy D, Iveson P, Iqbal AJ, Valaris S, Wynne G, et al. The Role of Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors in Inflammation and Metabolic Disease. *Antioxid Redox Signal* 2018 Jul 20;29(3):237-256.

Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* 2008 Oct 31;135(3):561-571.

Ren T, Qiu Y, Wu W, Feng X, Ye S, Wang Z et al. Activation of adenosine A3 receptor alleviates TNF- $\alpha$ -induced inflammation through inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in human colonic epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2014;2014:1-11.

Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 2009 Sep;119(9):2441-2450.

Riaño A, Ortiz-Masia D, Velázquez M. Nitric oxide induces HIF-1 $\alpha$  stabilization and expression of intestinal trefoil in the damage rat jejunum and modulates ulcer healing. *J Gastroenterol* 2011;46:565-76.

Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2017 Feb;152(2):340-350.e6.

Rieder F, Kessler S, Sans M, Fiocchi C. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012 Oct;303(7):G786-801.

Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut* 2013 Jul;62(7):1072-1084.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007 May;39(5):596-604.

Rogler G, Hausmann M. Factors Promoting Development of Fibrosis in Crohn's Disease. *Front Med (Lausanne)* 2017 Jul 7;4:96.

Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of crohn's disease. *Biochem Pharmacol* 2011;82:737-45.

Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005 Aug 1;175(3):1373-1381.

Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015;2015:816460.

Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* 2008 Nov;9(11):1261-1269.

Ruiz PA, Moron B, Becker HM, Lang S, Atrott K, Spalinger MR, et al. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis: role of the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2017 Jul;66(7):1216-1224.

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013 Jul;15(7):741-750.

Ryter SW, Koo JK, Choi AM. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014 Jul;17(4):329-337.

Sadagopan N, Li W, Roberds SL, Major T, Preston GM, Yu Y, et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* 2007 Nov;20(11):1209-1215.

Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008 Nov 13;456(7219):264-268.

Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T, Akira S. Autophagy and innate immunity. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2008 Dec;53(16 Suppl):2279-2285.

Salaritabar A, Darvishi B, Hadjiakhoondi F, Manayi A, Sureda A, Nabavi SF, et al. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2017 Jul 28;23(28):5097-5114.

Saleh M. The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death. *Immunol Rev* 2011 Sep;243(1):235-246.

Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy* 2015 Apr 3;11(4):585-594.

Salem M, Nielsen OH, Nys K, Yazdanyar S, Seidelin JB. Impact of T300A Variant of ATG16L1 on Antibacterial Response, Risk of Culture Positive Infections, and Clinical Course of Crohn's Disease. *Clin Transl Gastroenterol* 2015 Nov 5;6:e122.

Salvador P, Macias-Ceja DC, Gisbert-Ferrandiz L, Hernandez C, Bernardo D, Alos R, et al. CD16+ Macrophages Mediate Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2018 Apr 27;12(5):589-599.

Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón de la Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1733-44.

Sandler RS, Wurzelmann JJ, Lyles CM. Oral contraceptive use and the risk of inflammatory bowel disease. *Epidemiology* 1992 Jul;3(4):374-378.

Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 2008 Oct;14(10):1067-1076.

Sarkar S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans* 2013 Oct;41(5):1103-1130.

Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007 Feb 23;282(8):5641-5652.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006 Jun;55(6):749-753.

Scharl M, Bruckner RS, Rogler G. The two sides of the coin: Similarities and differences in the pathomechanisms of fistulas and stricture formations in irritable bowel disease. *United European Gastroenterol J* 2016 Aug;4(4):506-514.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Scharl M, Frei S, Pesch T, Kellermeier S, Arikkat J, Frei P, et al. Interleukin-13 and transforming growth factor beta synergise in the pathogenesis of human intestinal fistulae. *Gut* 2013 Jan;62(1):63-72.

Scharl M, Rogler G. Inflammatory bowel disease: dysfunction of autophagy? *Dig Dis* 2012;30 Suppl 3:12-19.

Scharl M, Weber A, Furst A, Farkas S, Jehle E, Pesch T, et al. Potential role for SNAIL family transcription factors in the etiology of Crohn's disease-associated fistulae. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Sep;17(9):1907-1916.

Schmid D, Munz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 2007 Jul;27(1):11-21.

Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003 Mar;24(3):353-362.

Shih DQ, Targan SR, McGovern D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr Gastroenterol Rep* 2008 Dec;10(6):568-575.

Shiomi Y, Nishiumi S, Ooi M, Hatano N, Shinohara M, Yoshie T, et al. GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Nov;17(11):2261-2274.

Siegmund B, Feakins RM, Barmias G, Ludvig JC, Teixeira FV, Rogler G, et al. Results of the Fifth Scientific Workshop of the ECCO (II): Pathophysiology of Perianal Fistulizing Disease. *J Crohns Colitis* 2016 Apr;10(4):377-386.

Siegmund B, Zeitz M. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011 Jul 21;17(27):3178-3183.

Silva JPB, Navegantes-Lima KC, de Oliveira ALB, Rodrigues DVS, de Franca Gaspar SL, Monteiro VVS, et al. Protective mechanisms of Butyrate on Inflammatory Bowel Disease. *Curr Pharm Des* 2018 Oct 1.

Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005 Sep;19 Suppl A:5A-36A.

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006 Sep 8;313(5792):1438-1441.



Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005 Aug;206:149-159.

Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol* 2011 Jan;4(1):31-42.

Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesolowska E, Wierzbicka P, Wlzlowski M, et al. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep* 2014 Oct;66(5):766-775.

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010 Jun;10(6):427-439.

Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2012 May 24;12:51-230X-12-51.

Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 Mar;25(2):92-99.

Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, Saitoh T, Huett A, Darfeuille-Michaud A, et al. Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy* 2011 Apr;7(4):355-374.

Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Betacyanins in fruit from red-purple pitaya, *Hyloceres polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chem* 2002;77:101-06.

Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 2004 Sep;76(3):509-513.

Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, Mortensen M, Ferguson DJ, Puleston DJ, et al. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun* 2015;7(4):375-391.

Su HJ, Chiu YT, Chiu CT, Lin YC, Wang CY, Hsieh JY, et al. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. *J Formos Med Assoc* 2018 Jul 24.

Suh DH, Lee S, Heo DY, Kim YS, Cho SK, Lee S et al. Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus*) and (*Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014;62:8764-71.

Sun X, Zhu MJ. AMP-activated protein kinase: a therapeutic target in intestinal diseases. *Open Biol* 2017 Aug;7(8):10.1098/rsob.170104.

Sung J and Lee J. Anti-inflammatory activity of butein and luteolin through suppression of NF- $\kappa$ B activation and induction of heme oxygenase-1. *J Med Food* 2015;18:557-64.

Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2015 Dec;63(6):435-449.

Tan D, Wang Y, Bai B, Yang X, Han J. Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat. *Food and Chem Toxicol* 2015;78:141-46.

Tan JK, McKenzie C, Marino E, Macia L, Mackay CR. Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors-Facilitators of Diet-Related Immune Regulation. *Annu Rev Immunol* 2017 Apr 26;35:371-402.

Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 2013 Apr 11;496(7444):238-242.

Tegtmeyer D, Seidl M, Gerner P, Baumann U, Klemann C. Inflammatory bowel disease caused by primary immunodeficiencies-Clinical presentations, review of literature, and proposal of a rational diagnostic algorithm. *Pediatr Allergy Immunol* 2017 Aug;28(5):412-429.

Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest* 2008 Jul;118(7):2526-2534.

Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet* 2017 Apr 29;389(10080):1741-1755.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010 Jan;11(1):55-62.

Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehepato-globin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Sep 29;106(39):16799-16804.

Tsuboi K, Nishitani M, Takakura A, Imai Y, Komatsu M, Kawashima H. Autophagy Protects against Colitis by the Maintenance of Normal Gut Microflora and Secretion of Mucus. *J Biol Chem* 2015 Aug 14;290(33):20511-20526.

Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ* 2009 Jul;16(7):991-1005.

Umesalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010 Aug;107(2):650-655.

Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Dec 30;105(52):20858-20863.

Valdor R, Mocholi E, Botbol Y, Guerrero-Ros I, Chandra D, Koga H, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 2014 Nov;15(11):1046-1054.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006 Jul;131(1):117-129.

van Diepen JA, Robben JH, Hooiveld GJ, Carmone C, Alsady M, Boutens L, et al. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia* 2017 Jul;60(7):1304-1313.

Veza T, Rodriguez-Nogales A, Algieri F, Utrilla MP, Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients* 2016 Apr 9;8(4):211.

Vidal, PJ, López-Nicolás JM, Gandía-Herrero F, García-Carmona F. Inactivation of lipoxigenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem* 2014;154:246-54.

Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014 Jan 7;20(1):6-21.

Wang ZY, Lin JH, Muharram A, Liu WG. Beclin-1-mediated autophagy protects spinal cord neurons against mechanical injury-induced apoptosis. *Apoptosis* 2014 Jun;19(6):933-945.

Watanabe Y, Arase S, Nagaoka N, Kawai M, Matsumoto S. Chronic Psychological Stress Disrupted the Composition of the Murine Colonic Microbiota and Accelerated a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* 2016 Mar 7;11(3):e0150559.

Weisshof R, Chermesh I. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015 Nov;18(6):576-581.

Wichienchot S, Jatupornpipat M and Rastal RA. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem* 2010;120:850-57.

Wobben R, Husecken Y, Lodewick C, Gibbert K, Fandrey J, Winning S. Role of hypoxia inducible factor-1alpha for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biol Chem* 2013 Apr;394(4):495-505.

Wu CJ, Ashwell JD. NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 26;105(8):3023-3028.

Wu W, Chen F, Liu Z, Cong Y. Microbiota-specific Th17 Cells: Yin and Yang in Regulation of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2016 Jun;22(6):1473-1482.

Wu WK, Cho CH, Lee CW, Wu YC, Yu L, Li ZJ, et al. Macroautophagy and ERK phosphorylation counteract the antiproliferative effect of proteasome inhibitor in gastric cancer cells. *Autophagy* 2010 Feb;6(2):228-238.

Wybraniec S and Mizrahi Y. Generation of descarboxilated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2005;53:6704-12.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013 Apr 25;496(7446):445-455.

Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012 Jul 6;18(7):1028-1040.

Xilouri M, Stefanis L. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res Rev* 2016 Dec;32:13-21.

Xu X, Araki K, Li S, Han JH, Ye L, Tan WG, et al. Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat Immunol* 2014 Dec;15(12):1152-1161.

Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010 Jun 9;11(6):467-478.

Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2009 Nov;5(8):1180-1185.

Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Feb;13(2):191-199.

Zanello G, Kevans D, Goethel A, Silverberg M, Tyler A, Croitoru K. Genetics and innate and adaptive immunity in IBD. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2014;79:41-55.

Zhang D, Wang L, Yan L, Miao X, Gong Ch, Xiao M, Ni R, Tang Q. Vacuolar protein sorting 4B regulates apoptosis of intestinal epithelial cell via p38 MAPK in crohn's disease. *Exp Mol Pathol* 2015;98:55-64.

Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* 2017 Aug 14;8:942.

Zhang R, Chen HZ, Liu JJ, Jia YY, Zhang ZQ, Yang RF, et al. SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2010 Mar 5;285(10):7097-7110.

Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood* 2012 Mar 22;119(12):2895-2905.

Zhang Y, Tian L, Sleiman P, Ghosh S, Hakonarson H, International IBD Genetics Consortium. Bayesian analysis of genome-wide inflammatory bowel disease data sets reveals new risk loci. *Eur J Hum Genet* 2018 Feb;26(2):265-274.

Zhou E, Fu Y, Wei Z, Yang Z. Inhibition of allergic airway inflammation through the blockage of NF- $\kappa$ B activation by ellagic acid in an ovalbumin-induced mouse asthma model. *Food Funct* 2014;5:2106-12.

Zhu J, Lu T, Yue S, Shen X, Gao F, Busuttill RW, et al. Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation. *Transplantation* 2015 Jan;99(1):48-55.

Zigmond E, Bernshtein B, Friedlander G, Walker CR, Yona S, Kim KW, et al. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 2014 May 15;40(5):720-733.

