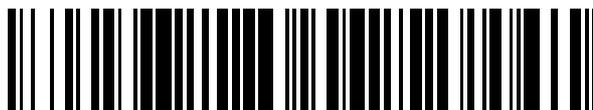


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 362 494**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/564** (2006.01)  
**A61K 31/02** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02779724 .0**  
96 Fecha de presentación: **20.11.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1448995**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Ensayo de fármacos candidatos para el cribado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:  
**21.11.2001 GB 0127916**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.10.2012**

73 Titular/es:  
**The University Court of The University of  
Aberdeen  
University Office, Regent Walk  
Aberdeen AB24 3FX, GB**

72 Inventor/es:  
**Kelly, Denise**

74 Agente/Representante:  
**Martín Santos, Victoria Sofia**

ES 2 362 494 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Ensayo de fármacos candidatos para el cribado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la modulación de las respuestas intestinales a la infección, en concreto a través del uso de la bacteria *Bacteroides thetaiotaomicron*.

**Antecedentes de la invención**

El intestino de los mamíferos es colonizado por varios cientos de especies bacterianas cuyas cantidades aumentan drásticamente en el colon, un sitio anatómico propenso a la infección, la enfermedad inflamatoria y el cáncer.

10 Sin embargo, la flora residente del tracto gastrointestinal de los animales adultos transmite un alto grado de protección (resistencia a la colonización) contra la infección (van der Waaij, 1984; Salminen *et al.*, 1998). Como resultado, la mayoría de los patógenos oportunistas que se encuentran en el entorno son incapaces de establecer un punto de anclaje y son excluidos rápidamente (van der Waaij, 1984; Salminen *et al.*, 1998). Sin embargo, si la flora comensal se ve comprometida, los patógenos oportunistas pueden entonces persistir en el intestino. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* no suele persistir en el intestino murino pero colonizará y causará una infección muy grave tras la alteración de la flora comensal con antibióticos (Pier *et al.*, 1992). Las bacterias comensales también confieren cierto grado de protección contra los patógenos virulentos, como *Salmonella*. Sin embargo, estos patógenos pueden desbordar o eludir los efectos protectores de la flora comensal y causar una infección grave si están presentes en cantidades significativas.

20 La resistencia a la colonización se debe, en parte, a la exclusión competitiva de las bacterias dañinas, a través del uso preferente de nutrientes y sustratos o del bloqueo de los sitios de anclaje potenciales en el intestino por la flora comensal. Sin embargo, las bacterias comensales también modulan los sistemas inmune y celular intestinal del hospedador (Bry *et al.*, 1996; Herias *et al.*, 1998; 1999; Hooper *et al.*, 2000; 2001; Cebra, 1999; Snel *et al.*, 1998; Talham *et al.*, 1999; López-Boado *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001). La flora puede modificar el tracto gastrointestinal para crear microambientes nicho adecuados para ellas pero no para otras bacterias.

25 De manera alternativa, pueden modificar las respuestas de las células epiteliales hacia las bacterias dañinas (Campbell *et al.*, 2001) y atenuar así los cambios que facilitarían la colonización y la invasión.

30 El intestino sano mantiene un tono hiporreactivo hacia su diversa carga bacteriana, sin embargo la presencia de un nivel umbral de bacterias patógenas es suficiente para activar los sistemas transcripcionales que rápidamente sobrerregulan la expresión de genes proinflamatorios en los tejidos del intestino. A continuación, estos productos de transcripción desencadenan una cascada de respuestas que incluyen la quimiotaxis de las células polimorfonucleares (PMN) en la lámina propia de los sitios del intestino infectados. Aunque estos sucesos son esenciales para la eliminación de las bacterias, también causan patología en el tejido que puede agravar los síntomas de la enfermedad. El primer punto de contacto para las bacterias del lumen es una capa continua de células epiteliales que interactúan con y segregan el sistema inmunitario del intestino. La capacidad de las células epiteliales intestinales para discriminar entre bacterias patógenas y no patógenas es crucial para evitar respuestas inadecuadas perjudiciales para las bacterias colonizadoras y mantener la salud del intestino. Esta función discriminatoria está impresa en los sistemas de reconocimiento bacteriano y de señalización celular. El reconocimiento de las estructuras superficiales de la célula bacteriana es, en parte, una función de los receptores tipo Toll expresados en las superficies apical y basolateral de las células epiteliales, que desencadenan la activación inmunitaria mediada por el factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Gerwitz *et al.*, 2001).

40 Hasta ahora, no se han identificado los sistemas receptores vinculados a las actividades inmunosupresoras.

45 La administración de la bacteria comensal humana *B. thetaiotaomicron* a ratones libres de gérmenes desencadenó la expresión de genes clave ligados a la maduración intestinal y el desarrollo de la función de barrera (Hooper *et al.*, 2001). También aumentaron los niveles intestinales de Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ -glicanos (Bry *et al.*, 1996; Hooper *et al.*, 2001) y la matrilisina (López-Boado *et al.*, 2000). También se descubrió que *B. thetaiotaomicron* modificaba las respuestas de las células epiteliales en la exposición *in vitro* a *Salmonella* (Campbell *et al.*, 2001). En concreto, hubo represión de algunas rutas proinflamatorias (Campbell *et al.*, 2001). A pesar de estas propiedades potencialmente protectoras, *B. thetaiotaomicron* no aumentó sin embargo la resistencia de los ratones libres de gérmenes ex a la infección por *Clostridium perfringens* serotipo A (Yurdusev *et al.*, 1989). No obstante, el agente patógeno se eliminaba del intestino si los ratones se trataban con *B. thetaiotaomicron* en combinación con *Fusobacteria necrogenes* (Yurdusev *et al.*, 1989) y la cepa *Clostridia* no patógena CI (Yurdusev *et al.*, 1986). Esto sugiere que, aunque *B. thetaiotaomicron* sola puede inducir cambios potencialmente protectores en el intestino, puede necesitar actuar conjuntamente con otras cepas comensales para mejorar significativamente la resistencia global a la infección.

55 Los métodos terapéuticos se describen en la publicación de la patente internacional N° 90/01335 que implica la sustitución de la microflora entérica anormal con una matriz de flora predeterminada en el sistema gastrointestinal del paciente a tratar. Se contempla una serie de especies de *Bacteroides* para la co-administración con otras especies como parte de la matriz anteriormente mencionada, una de las que puede ser opcionalmente

*Bacteroides thetaiotamicron*. En la patente de los Estados Unidos N° 5.951.977 se describen cultivos probióticos que comprenden prácticamente bacterias biológicamente puras, que pueden incluir opcionalmente *Bacteroides thetaiotamicron*.

5 La publicación de patente internacional N° WO 01/16120, la publicación de patente internacional N° WO 98/4308, y la publicación de patente internacional N° WO 98/57631 muestran el uso de moduladores PPAR $\alpha$  (derivados biaril-oxa(tia)zol, compuestos de fibrato y tiazolidinediona, respectivamente) en el tratamiento de una serie de trastornos y así sugieren su uso en el tratamiento de una serie de trastornos médicos. Los compuestos activos descritos en estos documentos no son microorganismos.

10 La publicación de patente internacional N° WO 99/45955 se refiere a la ubicación inmunoestimuladora de proteínas, que son antígenos para el autoanticuerpo pANCA y que puede ligarse al desarrollo de colitis ulcerosa. El antígeno pertinente se identifica como la histona H1. La solicitud internacional también identifica una proteína de 75kDa que tiene homología con la histona H1, se une a pANCA, y "por lo menos parte" de la que se expresa en *Bacteroides thetaiotamicron*.

15 En esta invención definimos un mecanismo novedoso mediante el cual las bacterias no patógenas, normalmente la distribución nucleocitoplasmática de los PPAR $\gamma$  y la actividad transcripcional de (NF-kB).

20 Además, esta invención se refiere a la utilización de bacterias no patógenas para la modulación de las respuestas inflamatorias. Aún más, la invención proporciona evidencia para la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA) que afectan a la exportación mediada por IKB $\alpha$  de RelA y para un modo novedoso de acción para los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ). En concreto, la invención describe la atenuación de la expresión de genes inflamatorios epiteliales modificando la distribución nucleocitoplasmática de los PPAR $\gamma$  y la actividad transcripcional de NF-kB mediante el uso de bacterias no patógenas. Además la presente invención proporciona un medio de atenuar la inflamación para el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos inflamatorios.

25 La ruta novedosa descrita en la presente invención puede utilizarse para el cribado para métodos novedosos y para productos novedosos para modular la producción de citoquinas inflamatorias. Además, la presente invención describe el uso de una bacteria no patógena para atenuar la producción de citoquinas inflamatorias y devolver el sistema inmunitario a la homeostasis.

La modulación de la producción de citoquinas inflamatorias descrita en este documento difiere de las publicaciones conocidas en una serie de aspectos.

30 US 5.925.657 describe un agonista de los PPAR $\gamma$ . Este agonista es la tiazolidinediona, un compuesto químico con una fracción arilo sustituida unida a un núcleo de tiazolidinediona. En la presente invención, se utiliza una bacteria no patógena para atenuar la respuesta inflamatoria activando directamente los PPAR $\gamma$ .

Neish *et al.*, 2000 describe la regulación de las respuestas epiteliales por inhibición de la ubiquitinización de IKB $\alpha$ . La presente invención difiere de Neish *et al.*, 2000 por el uso de un modo de acción diferente.

35 Se proporcionan pruebas para la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA) que afecta a la exportación mediada por IKB $\alpha$  de RelA y para un modo de acción novedoso para los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ). Estos datos novedosos proporcionan el potencial para idear medios novedosos de, y productos novedosos para, modular la producción de citoquinas inflamatorias. También se describe la validación de los resultados *in vivo*.

40 La presente invención proporciona un ensayo para seleccionar un fármaco candidato para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria debido a la producción de citoquinas. El ensayo comprende:

a) exponer el fármaco candidato a células intestinales; y

b) analizar el efecto de dicho fármaco candidato, seleccionándose dicho efecto a partir del grupo que consiste en:

45 -la variación de la exportación o importación nuclear de factores de transcripción de la familia NF-kB;

-la alteración de la actividad transcripcional de los factores de transcripción de la familia NF-kB;

-la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA);

-la variación de la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de las células; y

50 - la destrucción nucleoplasmática de PPAR $\gamma$ .

El ensayo puede incluir adicionalmente una etapa de seleccionar un fármaco candidato que demuestre por lo menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en:

-el aumento de la exportación nuclear o la disminución de la importación nuclear de factores de transcripción de la familia NF-κB;

-la alteración de la actividad transcripcional de los factores de transcripción de la familia NF-κB;

-la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA);

5 -el aumento de la cantidad de complejos PPARγ/RelA en el citoplasma de las células; y

-destrucción de nucleoplasmática de PPARγ.

Según una forma de realización preferente, el efecto del fármaco candidato que se analiza es la exportación nuclear del factor de transcripción de la familia NF-κB o la variación de la cantidad de complejos PPARγ/RelA en el citoplasma de las células.

10 En otra forma de realización preferente, el ensayo comprende adicionalmente la etapa de analizar la variación del nivel de una o más citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en TNF-α, IL-8, MIP-2α y Cox-2; preferentemente IL-8 y/o MIP-2α.

15 Idealmente las células intestinales en el ensayo pueden estar en forma de línea celular intestinal mantenida en cultivo celular. Líneas celulares adecuadas incluyen la línea celular Caco-2. De manera alternativa el ensayo se puede llevar a cabo *in vivo* utilizando un animal adecuado, como un mamífero (ej. ratones).

Opcionalmente el ensayo puede realizarse en presencia de bacterias patógenas conocidas, por ejemplo *Salmonella sp.*

20 La presente invención también es útil para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la producción de citoquinas inflamatorias que incluye la etapa de administrar una dosis terapéuticamente efectiva de *Bacteroides thetaiotamicron* capaz de modular:

-la exportación nuclear o la importación nuclear de factores de transcripción de la familia NF-κB;

-la alteración de la actividad transcripcional de factores de transcripción de la familia NF-κB;

-la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA);

-la cantidad de complejos PPARγ/RelA en el citoplasma de las células; o

25 - la destrucción nucleoplasmática de PPARγ.

Preferentemente la invención es útil para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, especialmente una enfermedad causada, por lo menos en parte, por la respuesta inflamatoria de las células intestinales. Generalmente una enfermedad de este tipo implicará la producción de citoquinas inflamatorias. El agente es *Bacteroides thetaiotamicron*.

30 La presente invención proporciona el uso de *B. thetaiotaomicron* como fármaco para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria causada, por lo menos en parte, por la respuesta inflamatoria de las células intestinales. Por lo tanto la presente invención proporciona el uso de *B. thetaiotaomicron* para atenuar o evitar o tratar los estados o las enfermedades asociadas a la producción de citoquinas inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a: la enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades (puede hacerse mención especial de la enfermedad de Crohn y del Síndrome de Intestino Irritable); artritis reumatoidea; síndrome de inmunodeficiencia; caquexia; esclerosis múltiple, inhibición de la proliferación de queratinocitos.

35 La presente invención proporciona además el uso de *B. thetaiotaomicron* en la fabricación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria causada, al menos en parte, por una respuesta inflamatoria de las células intestinales, como se define en las reivindicaciones.

40 La presente invención también es útil para tratar, o para atenuar, la respuesta inflamatoria de las células intestinales que comprende administrar una dosis terapéuticamente efectiva de *B. thetaiotaomicron*.

En mayor detalle *B. thetaiotaomicron* puede utilizarse para alterar la ruta NF-κB y/o inhibir la respuesta de p65 (RelA) y/o actuar como un excitador o un inhibidor de los PPARγ. Por lo tanto *B. thetaiotaomicron* puede utilizarse para el tratamiento de enfermedades asociadas a la producción de citoquinas inflamatorias.

45 Puede administrarse *B. thetaiotaomicron* a un paciente vivo por medio de un producto alimentario o un supositorio.

Por lo tanto, esta invención es útil para curar la respuesta inflamatoria de las células intestinales administrando una dosis terapéuticamente efectiva de *B. thetaiotaomicron*.

Para la prevención y el tratamiento de los estados descritos en este documento, *B. thetaiotamicron* se administra de manera preferente al sitio de acción en el tracto gastrointestinal por administración oral en cualquier fórmula o

5 portador o excipiente o diluyente o estabilizador apropiado. Tales mecanismos de administración pueden ser de cualquier formulación que incluya pero no se limite a formulaciones sólidas como pastillas o cápsulas; soluciones líquidas como el yogur o bebidas o suspensiones. Un mecanismo de administración preferente es uno que administra la bacteria por vía oral, preferentemente sin daño a través del entorno ácido del estómago al sitio de la acción en el intestino. Tales bacterias pueden administrarse junto con un prebiótico.

La invención también proporciona un modo novedoso de acción de los PPAR $\gamma$  y de la acetilación diferencial de histonas de p65 (RelA) que afecta a la exportación mediada por IKB $\alpha$  de RelA para el cribado para la detección de ligandos específicos con el potencial para modular, agonísticamente o antagonísticamente, la producción de citoquinas inflamatorias a través de la ruta novedosa descrita en este documento.

10 La invención es útil para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la producción de citoquinas inflamatorias administrando una dosis terapéuticamente efectiva de *Bacteroides thetaiotamicron* capaz de alterar la actividad transcripcional de NF-kB o capaz de aumentar la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de la célula.

15 La invención es útil para devolver y mantener el sistema inmunológico de los mamíferos a la homeostasis, administrando una dosis terapéuticamente efectiva de *Bacteroides thetaiotamicron* capaz de alterar la actividad transcripcional de NF-kB o capaz de aumentar la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de la célula.

Hemos descubierto que la actividad antiinflamatoria de *B. thetaiotaomicron* implica un modo de acción totalmente novedoso, definido por la acelerada exportación nuclear de NF-kB y el secuestro mediado por PPAR $\gamma$  en el citoplasma. El trabajo experimental (descrito en detalle en los ejemplos) se llevó a cabo en tres fases:

20 1) Expresión de genes de citoquinas inflamatorias en células Caco-2 después de la exposición a bacterias patógenas/no patógenas. Los datos se obtuvieron utilizando análisis de hibridación Northern, PCR en tiempo real y macromatriz de ADNc.

2) Validación *in vitro* (cultivos Transwell de Caco-2) e *in vivo* (ratas con flora mínima) de la importancia fisiológica de los efectos antiinflamatorios de *B. thetaiotaomicron*.

3) Análisis de las rutas de transducción de señal de NF-kB y AP-1 y la relación entre los PPAR $\gamma$  y la RelA citosólica.

25 El trabajo experimental llevado a cabo muestra que:

1) La diana principal de la regulación por *B. thetaiotaomicron* es NF-kB y no AP-1.

2) p65 (RelA) se acumulaba en las células tratadas con *B. thetaiotaomicron* y *S. enteritidis* (detectada hasta 30 minutos).

30 3) Los efectos transcripcionales reducidos de la p65 en presencia de *B. thetaiotaomicron* se deben a una mayor eliminación nuclear (exportación) de p65, y esta exportación es sensible a LMB (es decir, mediada por crm-1).

4) Los datos se correlacionaban totalmente con la atenuación de la expresión de citoquinas/quimioquinas inflamatorias, la expresión de IKB $\alpha$ , el reclutamiento de PMN y el nivel fisiológicamente menor de inflamación demostrados *in vivo* en ratas debido a *B. thetaiotaomicron*.

5. PPAR $\gamma$  se localizaba en el citoplasma en presencia de *B. thetaiotaomicron*.

35 6. PPAR $\gamma$  y p65 están acopladas físicamente cuando se co-localizan en el citoplasma.

A continuación se ilustrará la presente invención por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos y a las figuras en las que:

#### Breve descripción de los dibujos

##### Fig. 1

40 (a) Hibridación tipo Northern del ARNm de las citoquinas utilizando sondas premarcadas con  $^{32}\text{P}$  específicas para TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , COX-2 y G3PDH de:

1) Células Caco-2 no infectadas,

2) Células Caco-2 con  $10^8$  *S. enteritidis*;

3) Células Caco-2 con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*;

45 4) Células Caco-2 con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*.

(b) PCR semicuantitativo de IL8 y G3PDH. Las células Caco-2 incubadas en medio solas (1); con  $10^8$  *S. enteritidis*,  $10^8$  *E. coli* 0157 H7, PMA (300 ng/ml) o IL-1 $\alpha/\beta$  (20 ng/ml) como se indica (2); como se describe en (2) pero en presencia de  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3); o con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (4).

(c) Hibridación tipo Northern de ARNm utilizando sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  específicas para TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , COX-2 y G3PDH de:

- 1) Células Caco-2 no infectadas;
- 2) Células Caco-2 con  $10^8$  *S. enteritidis*;
- 5 3) Células Caco-2 con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. vulgatus*;
- 4) Células Caco-2 con  $10^9$  *B. vulgatus*.

(d) Las células Caco-2 se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* durante 2 ó 4 horas como se indica.

10 (e) Migración transepitelial de células PMN a través de la monocapa de Caco-2 según se determina por el Ensayo MPO de grupos de tratamiento (1) a (4) de (a) anteriormente indicado.

(f) Ensayo MPO de la mucosa ileal 6 días después del tratamiento de ratas expuestas a (1) el control; (2)  $10^8$  *S. enteritidis*; (3) *B. thetaiotaomicron* a continuación  $10^8$  *S. enteritidis*; y (4) *B. thetaiotaomicron* sola. Los datos son las medias  $\pm$  SD (n=3).

#### Figura 2

- 15 1) Células Caco-2 no infectadas;
- 2) Células Caco-2 incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis*;
- 3) Células Caco-2 incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*;
- 4) Células Caco-2 incubadas con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*

20 y sondada con anticuerpos primarios (A-D) anti-RelA; (E-H) anti-PPAR $\gamma$ ; (I-L) anti-IK $\beta$ ; y (M-P) anti pIK $\beta$  $\alpha$ . Todas las barras de escala = 25 $\mu\text{m}$ . Los insertos en 0 y P muestran detalles del marcaje nuclear por punción.

#### Figura 3

(A) El análisis de superretardo EMSA llevado a cabo en extractos nucleares de Caco-2 utilizando un oligonucleótido de secuencia de unión NF- $\kappa\text{B}$  marcada con  $^{32}\text{P}$  de consenso e incubados con anticuerpos anti-RelA en los grupos (1) a (4) como se ha descrito anteriormente para la Fig. 1A.

25 Donde se indica la *B. thetaiotaomicron* fue inactivada por calor a 70°C durante 15 minutos.

(B) La hibridación tipo Northern del ARNm de grupos de tratamiento experimentales fue como se ha descrito anteriormente (1-4), con membranas sondadas con sondas IK $\beta$  y G3PDH específicas marcadas con  $^{32}\text{P}$  específicas.

30 (C) Membranas de Western de extractos nucleares derivados de células Caco-2. Los grupos de tratamiento fueron como se ha descrito anteriormente (1-4). Las inmunotransferencias se sondaron con anticuerpos específicos para anti-p38 y anti-pp38 Se busca con anticuerpos específicos contra p38 y anti-pp38 (New English Biolabs).

D) La superinducción de c-Fos y c-Jun se determinó mediante hibridación tipo Northern en ARN total de células Caco-2. Los tratamientos fueron, células Caco-2 en ausencia de ciclohexamida (-C) o como se ha descrito anteriormente (1-4) pero en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de ciclohexamida. Las membranas se hibridaron con sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  específicas para c-Fos, c-Jun y G3PDH.

35 E, F) Membranas de Western de extractos nucleares derivadas de células Caco-2. Los grupos de tratamiento fueron como se ha descrito anteriormente (1-4). Se utilizaron anticuerpos específicos para c-Fos (Santa Cruz), ATF-2 y pATF-2 (New England Biolabs).

40 G) Inmunoprecipitación (IP) utilizando IK $\beta$  y pIK $\beta$  $\alpha$ . Células Caco-2 después del protocolo estándar de cultivo, grupos de tratamiento (1-4). IP analizada por transferencia Western, NS indica no específicos, BI es un control sin extracto celular.

#### Figura 4

A) Hibridación Northern de ARNm de células Caco-2 no infectadas (1), células Caco-2 después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3) y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* solo (4) analizadas por sondas PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  marcadas con  $^{32}\text{P}$  específicas. Las bacterias se aplicaron durante 2 horas.

45 B) Los tratamientos (1) y (2) fueron como se ha descrito anteriormente, o las células se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* en presencia de 30 $\mu\text{M}$  de 15PG-J<sub>2</sub> (3a) o 30 $\mu\text{M}$  de fenofibrato (3b) como se indica.

Las bacterias y los fármacos se aplicaron durante 2 horas.

El ARNm fue analizado por hibridación Northern con una sonda específica de PPAR $\gamma$  marcada con  $^{32}\text{P}$ .

C) El ARNm de las células Caco-2 no infectadas (1), células Caco-2 después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* en presencia de 10, 20 ó  $30\mu\text{M}$  de 15PG-J<sub>2</sub> (3) (4) (5); ó  $30\mu\text{M}$  de 15PG-J<sub>2</sub> sola (6) se analizó por hibridación Northern con G3PDH, COX-2, IL-8 y TNF- $\alpha$  marcado con  $^{32}\text{P}$ .

5 Las bacterias y los fármacos se aplicaron durante 2 horas.

D) El ARNm de células Caco-2 no infectadas (1), células Caco-2 después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* en presencia de 10 ó  $30\mu\text{M}$  ciglitazona (3) (4) se analizó por hibridación Northern con G3PDH, COX-2, IL-8 y TNF- $\alpha$  marcado con  $^{32}\text{P}$ . Las bacterias y los fármacos se aplicaron durante 2 horas.

10 E) El ARNm de células Caco-2 no infectadas (1), de células Caco-2 después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* y  $30\mu\text{M}$  de fenofibrato (3) se analizó por hibridación Northern con G3PDH, COX-2, IL-8 y TNF- $\alpha$  marcado con  $^{32}\text{P}$ . Las bacterias y los fármacos se aplicaron durante 2 horas.

15 F) Los extractos citoplasmáticos y nucleares de células Caco-2 no infectadas (1), células Caco-2 después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3) y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* sola (4) se analizaron por transferencia Western con anti-PPAR $\gamma$  (Santa Cruz). Las bacterias se aplicaron durante 2 horas. Las células Caco-2 preparadas como fracciones citoplasmáticas y nucleares, o fracciones de detergente soluble (D. soluble) o insoluble (D. insoluble).

20 G) Las células Caco-2 co-cultivadas con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* durante 2 horas se lisaron en PBS que contenía como solución Nonidet P40 al 1% y se incuban durante toda la noche con seferosa anti-RelA policlonal (Santa Cruz). Los inmuno-precipitados se identificaron utilizando SDS-PAGE. Las membranas Western se desarrollaron utilizando un anti-RelA [NF- $\kappa\text{B}$  p65] monoclonal, anticuerpos anti-PPAR $\gamma$  y anti-HDAC3 (Santa Cruz).

H) Microscopía de inmunofluorescencia de PPAR $\gamma$  (f-m, o) y RelA (n). Co-localización de PPAR $\gamma$  y RelA de placas n y o (p). Las células Caco-2 se hicieron crecer en medio solo (t, j); con  $10^8$  *S. enteritidis* (g, k); con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (h, l, n-p); o con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (i, m). Los tratamientos en ausencia (t-i, n-p) o en presencia de  $4\mu\text{M}$  de TSA (j-m). Todas las barras de escala =  $25\mu\text{m}$ .

25 Figura 5

La mutación de PPAR $\gamma$  interfiere con la atenuación mediada por *B. thetaiotaomicron* NF- $\kappa\text{B}$  y el secuestro citosólico de RelA.

A) Inmuno-detección RelA. Las células Caco-2 preparadas después de un protocolo de cultivo estándar, grupos de tratamiento (1-4). Inmuno-precipitados preparados utilizando conjugado de seferosa anti-PPAR $\gamma$ .

30 B) Traducción *in vitro* que muestra la asociación RelA/PPAR $\gamma$

35 C) Las células Caco-2 fueron transfectadas con PPAR $\gamma$  DN y un constructo del gen reporter de la luciferasa de NF- $\kappa\text{B}$  (DN), y se compararon con células de control transfectadas con el gen reporter de la luciferasa de NF- $\kappa\text{B}$  sola (MOCK). La actividad de luciferasa (expresada como % de estimulación) se determinó en células Caco-2 no infectadas (1), células Caco-2 después de la incubación durante otras seis horas más con  $10^8$  *S. enteritidis* (2), y  $10^8$  *S. enteritidis* en presencia de  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3).

D) Las células Caco-2 fueron transfectadas con un constructo de proteína PPAR $\gamma$  DN y GFP (D, E). Todas las células se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*.

40 A continuación las células se inmunotifieron con anticuerpos específicos anti-RelA (p65) (Santa Cruz) y se examinaron mediante LSCM. (B) y (D) captura de canal dual que muestra imágenes combinadas de GFP (verde) y de RelA (rojo). (B) y (D) mismas áreas que (B) y (D) respectivamente, con captura de canal único que muestra sólo RelA. Barras de escala =  $25\mu\text{m}$ .

45 E) Las células Caco-2 se transfectaron con un constructo quimérico de RelA con el extremo carboxilo terminal de la proteína fluorescentes amarilla (YFP) y PPAR $\gamma$  (d-f) o PPAR $\gamma$  DN (g-i), ambas como constructos quimera con el extremo carboxilo terminal de la proteína fluorescente cian (CFP). Dos días después de la transfección, las células se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*. Fluorescencia CFP (d, g) y fluorescencia YFP (e, h). Colocalización de CFP-PPAR $\gamma$  (DN) e YFP-RelA de las placas d y e (f), y CFP-PPAR $\gamma$  (DN) e YFP-RelA de las placas g y h (i). Todas las barras de escala =  $25\mu\text{m}$  (j, k). Las células Hela fueron transfectadas con CFP-PPAR $\gamma$  y 2 días después de la transfección se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron*. Células Hela fijadas, permeabilizadas e inmunotifidas para SC35. Inmunofluorescencia indirecta de CFP-PPAR $\gamma$  (j) de SC35 (k). Barras de escala =  $10\mu\text{m}$ .

50 Figura 6

La Fig. 6 muestra la acreción del músculo esquelético ( $\square$ , peso húmedo y  $\blacksquare$  peso seco) ( $\text{mg}/\text{rata d}^{-1}$ ) por ratas de control o ratas tratadas oralmente con *Bacterioides thetaiotaomicron* (BT), *Salmonella enterica* var. *enteritidis* (SE) o

*S. enteritidis* más *B. thetaiotaomicron* (SE + BT). \* muestra una diferencia significativa respecto al control, BT o SE + BT para el peso seco y el peso húmedo respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

5 El músculo gemelo es tomado como representante del músculo esquelético y el músculo esquelético total en ratas Hooded-Lister jóvenes como aproximadamente 47 veces el peso de los músculos gemelos (Bardocz *et al.*, 1996). El peso inicial de los músculos gemelos  $804 \pm 10$  mg en peso húmedo [ $194 \pm 7$  mg en peso seco] por 100 g de peso corporal fresco inicial.

#### Fig.7

La Fig. 7 muestra los datos cuantitativos (membrana Northern o PCR en tiempo real) que ilustran los efectos en la expresión del ARNm de quimioquina/citoquina. S.e. = *S. enteritidis*. B.t. = *B. thetaiotaomicron*.

#### 10 Figura 8

La Fig. 8 muestra los conteos de bacterias después de una incubación de 2 horas con monocapa de células Caco-2.

a) B.t asociada a célula Caco-2 (las que quedan después de lavar la capa celular) en presencia y en ausencia de B.t.

b) S.e asociada a células en presencia y en ausencia de B.t.

15 c) *Salmonella* invadida (las que quedan después del lavado celular y el tratamiento con gentamicina (100µg/ml durante 4 horas) en presencia y en ausencia de B.t. n=6 +/- desviación estándar.

#### Figura 9

Figura 9A: muestra la activación de NF-kB en células Caco-2 en respuesta a *S. enteritidis* utilizando EMSA.

Figura 9B: Análisis de respuesta de las citoquinas por hibridación Northern.

20 a) se analizó el ARNm de células Caco-2 después de 2 horas de exposición a  $10^8$  y  $10^{10}$  cfu de S.e por inducción de citoquinas proinflamatorias y se normalizó contra G3PDH.

b) Se analizó el ARNm de células Caco-2 después de la exposición a  $10^9$  S.e durante períodos de tiempo variables para la inducción de citoquinas proinflamatorias y se normalizó contra G3PDH. También se muestran los datos de hasta 2 y 4 horas (figura 9D).

25 c) Se analizó el ARNm de células Caco-2 después de la exposición 2 horas a  $10^7$  a  $10^{10}$  B.t. para las citoquinas proinflamatorias y se normalizó contra G3PDH.

d) Se analizó el ARNm de células Caco-2 para la expresión de citoquinas inflamatorias (COX-2 e IL-8), que ilustra los efectos supresores de B.t. a las 2 horas y a las 4 horas.

30 Fig. 9C: Curso temporal de la activación de Rel (p65) después de la exposición de las células Caco-2 a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* utilizando la detección inmunocitoquímica. Las células Caco-2 expuestas a S.e. +/- B.t. durante 2 horas se fijaron en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 y se inmunomarcaron con anti-p65 (RelA) (Santa Cruz). La detección secundaria fue con IgG anti-conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Las imágenes se capturaron digitalmente utilizando una cámara Zeiss Axiocam en un microscopio Axiovert 2000.

Figura 9D: Curso temporal de los efectos PPARγ después de la exposición de las células Caco-2 a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* utilizando la detección inmunocitoquímica.

35 Las células Caco-2 se expusieron a S.e. +/- B.t. durante 2 horas, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con el Tritón X-100 y se inmunomarcaron con anti-PPARγ (Santa Cruz). La detección secundaria fue con IgG anti-cabra Alexa Fluor 568 (Molecular Probes). Las imágenes se capturaron digitalmente con una cámara Zeiss Axiocam en un microscopio Axiovert 2000.

#### 9E Fig.

40 Muestra el co-marcaje de NF-kB p65 y PPARγ en las células Caco-2 después de 2 horas de exposición a *B. thetaiotaomicron* y *S. enteritidis*.

#### Figura 10

45 Músculo esquelético (músculo gemelo) (□, peso húmedo; ■ peso seco) acreción ( $\text{mg/rata d}^{-1}$ ) por ratas control o ratas oralmente tratadas con *B. thetaiotaomicron* [B.t], *Salmonella enterica* var. *enteritidis* [S.e] o S. e + B. t n=6, +/- Error Estándar.

#### Figura 11

Muestra inmunoprecipitados de p65, separados utilizando SDS-PAGE, electrotransferidos e inmunoteñidos con anticuerpo monoclonal de lisina acetilada.

## Descripción detallada de la invención

### Ejemplo 1: Respuestas inflamatorias de células Caco-2 expuestas a *S. enteritidis* en presencia y en ausencia de *B. thetaiotaomicron* y *B. vulgatus*.

5 Las pruebas para la regulación bacteriana de la respuesta inflamatoria del hospedador se obtuvieron a partir de estudios que investigan la expresión de genes inflamatorios después de la exposición a corto plazo de células Caco-2 intestinales a *Salmonella enteritidis* co-cultivada en presencia y en ausencia de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Utilizando la tecnología de macromatrices de ADNc (sistema de matrices citoquina/receptor humano CLONTECH Atlas) identificamos varios genes que incluían TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 $\alpha$  y COX-2, cuya inducción después de la exposición a *S. enteritidis* fue atenuada por la presencia de *B. thetaiotaomicron*. Estos resultados fueron confirmados utilizando hibridación Northern y PCR en tiempo real (Fig. 1a, f). También investigamos la actividad antiinflamatoria de *B. thetaiotaomicron* contra otros mediadores inflamatorios que incluyen IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PMA, LPS y *E. coli* 0157 H7 enterohemorrágica (Fig 1F). De aquellos ligandos que inducían la expresión de IL-8 en células Caco-2, sólo los efectos de PMA, *S. enteritidis* y *E. coli* 0157 H7 fueron atenuados por *B. thetaiotaomicron*.

15 Al establecer las condiciones experimentales para estos estudios, se llevaron a cabo muchos experimentos de optimización (que incluían el curso temporal, la fase dosis/crecimiento bacteriano, estudios de pase/confluencia de células Caco-2). Lo importante es que hemos establecido que el crecimiento, la unión y la invasión de bacterias no se vieron afectadas por las condiciones del cultivo/co-cultivo, descartando así la posibilidad de que los datos pudieran atribuirse a una unión/invasión diferencial (véase la Fig. 8).

20 La expresión de genes inflamatorios se determinó en células Caco-2 no infectadas (1), células incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* sola (2), células incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3) o células incubadas con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* sola (4). Las bacterias se aplicaron durante 2 horas. Las células se lavaron y cosecharon para el aislamiento de ARNm y se analizaron 50 $\mu$ g de ARNm mediante hibridación Northern con sondas marcadas con  $^{32}$ P específicas para TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-2 $\alpha$ , TGF- $\beta$ , COX-2 y G3PDH.

25 Algunos de los resultados que describen los efectos de *B. thetaiotaomicron* están en consonancia con el informe de análisis molecular reciente de Hooper *et al.*, 2001. Nuestros resultados fueron confirmados utilizando hibridación Northern y PCR en tiempo real. Los niveles de TNF- $\alpha$  IL-8, MIP-2 $\alpha$  y COX-2 aumentaron significativamente en respuesta a la exposición a *S. enteritidis* (Fig. 1a). En presencia de *B. thetaiotaomicron* sin embargo, todos los niveles de expresión de estos genes fueron atenuados con la excepción de TGF- $\beta$ , que fue disminuido por *S. enteritidis* aunque mantenido en valores de control por la presencia de *B. thetaiotaomicron*. Las tasas de crecimiento y la viabilidad de las bacterias y las cantidades de *S. enteritidis* que se adherían e invadían las células epiteliales no difirieron entre los tratamientos y no se vieron afectadas por el procedimiento de cultivo.

30 Los datos cuantitativos mostrados en la Fig. 7 confirman estos resultados y se obtuvieron utilizando ARNm purificado a partir de células Caco-2 después de una incubación de 2 horas con vehículo (control),  $5 \times 10^8$  *Salmonella enteritidis* (S.e),  $5 \times 10^8$  S.e y  $1,5 \times 10^9$  *B. thetaiotaomicron* (B.t) o B.t sola. Las membranas Northern se cuantificaron por densitometría y se normalizaron hasta los niveles de G3PDH. El PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando ABI Taqman y se normalizó hasta niveles de ARNr 18S. n=4 +/- desviación estándar.

Para investigar si la atenuación de la expresión de citoquinas inflamatorias era específica para *B. thetaiotaomicron*, también se estudió una cepa aerotolerante relacionada, *B. vulgatus*.

40 Los tratamientos fueron como se ha descrito anteriormente para (1) y (2), células incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. vulgatus* (3a) o células incubadas con  $10^9$  *B. vulgatus* sola (4a). Las bacterias se aplicaron durante 2 horas.

*B. vulgatus* fue negativa para la actividad biológica (véase la Fig. 1b).

45 En los resultados obtenidos la pequeña inducción de la expresión de genes inflamatorios desencadenada por ambas cepas comensales, que puede estar relacionado con el hecho de que se sometieron a ensayo bacterias de la fase logarítmica final; fue notable. La aplicación de bacterias de la fase logarítmica temprana desprovista de los restos de la célula bacteriana, puede invalidar completamente esta respuesta. Por lo tanto se llevó a cabo un experimento adicional en el que las células Caco-2 se incubaron con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* durante 2 ó 4 horas. El efecto inhibitorio de *B. thetaiotaomicron* en la expresión de IL-8 fue sostenido durante períodos prolongados (Fig. 1d), lo que contrastaban con el TNF- $\alpha$ , lo que sugería que los mecanismos de regulación de la expresión de estos genes se veía influenciada de manera diferente por *B. thetaiotaomicron*.

50 La importancia fisiológica de los datos que muestran la represión de las citoquinas inflamatorias por *B. thetaiotaomicron* fue verificada utilizando un modelo funcional *in vitro* de reclutamiento de PMN y un modelo de infección en ratas por *S. enteritidis* *in vivo*. El reclutamiento de PMN *in vitro* e *in vivo* se monitorizó utilizando la actividad mieloperoxidasa (MPO).

55 Se sembraron células Caco-2 sobre Transwells invertidas (Corning) y diversas combinaciones de bacterias aplicadas a las superficies apicales de las células.

Se aplicaron PMNs humanas recién aisladas al compartimiento basolateral y su migración transepitelial se determinó mediante un ensayo MPO (Neish *et al.*, 2000). Los grupos de tratamiento (1-4) fueron como se ha descrito

anteriormente. Las células se incubaron durante 2 horas y a continuación se eliminaron las bacterias y se aplicó medio fresco.

Las células se incuban durante 2 horas más y a continuación se lavaron en HBSS. Las células y los medios obtenidos del compartimiento apical, se solubilizaron en Tritón C-100 al 1% y se determinó la MPO.

- 5 Los resultados obtenidos del modelo *in vitro* del ensayo de reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) confirmó la actividad antiinflamatoria de *B. thetaiotaomicron* (Fig. 1e).

Hay que reseñar que la infección por *S. enteritidis* del intestino de rata se da principalmente en el íleon, el hábitat natural de *B. thetaiotaomicron*.

- 10 Ratas con una flora mínima (alimentadas con dietas de laboratorio normales) recién destetadas (21 d) se dividieron en 2 grupos y un grupo se alimentó adicionalmente con gelatina preparada anaeróticamente (0,5 g/d) que contenía  $10^8$  cfu de *B. thetaiotaomicron* durante 19 días. La mitad de las ratas de cada grupo fueron a continuación expuestas por vía oral a  $10^8$  *S. enteritidis*. La gravedad de la respuesta inflamatoria en todos los animales se evaluó determinando los niveles MPO en la mucosa ileal a los 6 días de postinfección de *S. enteritidis*. Los tratamientos fueron, no *B. thetaiotaomicron* y no *S. enteritidis* (1), no *B. thetaiotaomicron* a continuación  $10^8$  *S. enteritidis* (2), *B. thetaiotaomicron* a continuación  $10^8$  *S. enteritidis* (3), y *B. thetaiotaomicron* sola (4). Los experimentos se llevaron a cabo por lo menos 3 veces con resultados similares.

- 15 El nivel de MPO en la mucosa ileal de ratas expuestas a *S. enteritidis* aumentó ( $P < 0,005$ ), pero fue atenuado significativamente por la inoculación oral anterior y la estabilización de *B. thetaiotaomicron* dentro de la flora ( $P < 0,001$ ) (Fig. 1f). Además, a partir de los experimentos de reclutamiento de PMN descubrimos que *S. enteritidis* inducía 400pg/ml de proteína IL-8 en los sobrenadantes del cultivo por más de 4 h mientras que cuando se co-cultivaba en la presencia de *B. thetaiotaomicron* la concentración era significativamente inferior a 230 pg/ml. La colonización por *B. thetaiotaomicron* se confirmó por amplificación con cebador específico de los tejidos intestinales. Como IL-8 y MIP-2 $\alpha$  son quimioquinas esenciales para la migración transepitelial de PMN (McCormick *et al.*, 1993; Hang *et al.*, 1999), los efectos de *B. thetaiotaomicron* son por lo tanto debidos a la disminución de la transcripción de IL-8 y MIP-2 $\alpha$ , que a continuación afectará a la traducción y a la secreción de proteína activa. En consonancia con Neish *et al.*, 2000 hemos demostrado, utilizando un sistema de modelo novedoso, que las bacterias no patógenas pueden ejercer efectos inmunosupresores subvirtiendo los sistemas del hospedador que regulan la expresión génica. Lo que es más importante, también hemos proporcionado validación *in vivo* de nuestros descubrimientos.

- 20 Además de los datos de MPO analizados anteriormente la Fig. 10 muestra evidencia adicional de los efectos protectores de *B. thetaiotaomicron* en la biología muscular durante la respuesta inflamatoria inducida por *S. enteritidis*.

**Ejemplo 2: *B. thetaiotaomicron* atenúa la inflamación alterando el estado de activación y la distribución celular de las proteínas PPAR $\gamma$  y NF- $\kappa$ B e implica la alteración selectiva de la ruta de transducción de señales de NF- $\kappa$ B.**

- 35 La familia NF- $\kappa$ B de factores de transcripción juega un papel central en la regulación de las respuestas inflamatorias. Estas proteínas comparten una secuencia NH<sub>2</sub>-terminal altamente conservada denominada dominio de homología Rel, que es necesaria para la dimerización de sus subunidades, la unión al ADN y la interacción con las proteínas I $\kappa$ B inhibitorias. Las señales que inducen NF- $\kappa$ B llevan a la fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B inhibitorias (I $\kappa$ B $\alpha$  en Ser-32 y Ser-36) que a continuación son dirigidas para la ubiquitinación y la degradación mediada por el proteasoma. Las proteínas RI, que incluyen RelA (p65), son así liberadas para translocarse al núcleo y unirse al ADN.

- 40 Se incubaron células Caco-2 no infectadas (1) con  $10^8$  *S. enteritidis* sola (2),  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3) y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* sola (4) durante 2 horas. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con Tritón-X 1000 al 0,2% a 4°C y se examinaron por microscopía de inmunofluorescencia indirecta. Anticuerpos primarios (Santa Cruz) (A-D) anti-RelA [NF- $\kappa$ B p65], (E-H) anti-PPAR $\gamma$ , (I-L) anti-I $\kappa$ B $\alpha$  y (M-P) anti-pI $\kappa$ B $\alpha$ . Anticuerpos secundarios: anti-IgG específico de especie Alexa Fluor (Molecular Probes).

Descubrimos que la exposición de células Caco-2 a *S. enteritidis* desencadenaba una cascada de eventos que llevaron a una mejor translocación de RelA al núcleo (Fig. 2B).

- 50 De manera significativa, se descubrió que *B. thetaiotaomicron* suprimía la translocación de RelA al núcleo con prácticamente toda la RelA localizada en el citoplasma después de 2 horas de exposición a esta bacteria (Fig. 2C, D).

- La fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y, sobre todo, su degradación se observó después de la exposición a *S. enteritidis* en presencia y en ausencia de *B. thetaiotaomicron* (Fig. 2G). Después de una exposición de 2 h, se mejoraron el nivel de ARNm de I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B) y proteína (Fig. 2J, K), especialmente en las células expuestas a *S. enteritidis* sola y *S. enteritidis*/*B. thetaiotaomicron*, los que indica la presencia de NF- $\kappa$ B transcripcionalmente activa (Cheng *et al.* 1994; Chiao *et al.* 1994).

**La *B. thetaiotaomicron* viable interfiere selectivamente con la actividad transcripcional de las proteínas NF- $\kappa$ B pero no influye en la síntesis o la fosforilación de las proteínas AP-1.**

El análisis de superretardo EMSA se llevó a cabo en los extractos nucleares, incubados con anticuerpos específicos de RelA [NF- $\kappa$ B p65] (Santa Cruz), a partir de células Caco-2 no infectadas (1) después de la incubación con  $10^8$  *S. enteritidis* (2),  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (3) y  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* sola (4) durante 2 horas. Donde se indique *B. thetaiotaomicron* fue inactivada por calor a 70°C durante 15 minutos antes de su adición a las células Caco-2.

Utilizando ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA), hemos confirmado que la RelA fue la subunidad principal activada por *S. enteritidis* (Fig. 3A), aunque también se puso de manifiesto una activación de menor nivel de p52 (datos no mostrados). A continuación planteamos la hipótesis de que *B. thetaiotaomicron* atenuaba la producción de mediadores de la respuesta inmune, desencadenada por *Salmonella*, al alterar la ruta de transducción de señales de NF- $\kappa$ B.

Un experimento similar se ilustra en la Fig. 9A que demuestra que los análisis de superretardo EMSA que muestra la activación máxima de p65 2 horas después de la exposición a *S. enteritidis* en células Caco-2. Banda 1, sin proteína, líneas 2, 5, 8, 11 extractos nucleares de las células del control; bandas 3, 6, 9, 12 extractos nucleares de células infectadas con S.e.; bandas 4, 7, 10, 13 extractos nucleares para células infectadas con S.e. y superretardadas con anticuerpo p65 (RelA).

También demostramos que la *B. thetaiotaomicron* viable pero no inactivada por calor inhibía la respuesta RelA (Fig. 3A). De manera similar, ni el sobrenadante de los cultivos bacterianos ni el medio de cultivo condicionado (medio de células Caco-2 expuestas a *B. thetaiotaomicron*) poseía la actividad biológica (datos no mostrados). Esto sugiere que el contacto de la célula epitelial es esencial para la actividad antiinflamatoria de *B. thetaiotaomicron*. Dentro de los 20 minutos de exposición a *S. enteritidis*, en presencia y en ausencia de *B. thetaiotaomicron*, se observó la degradación y la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  (datos no mostrados).

Además, la viabilidad, el crecimiento, la unión y la invasión de las cepas bacterianas estudiadas se vieron afectadas por los tratamientos de cultivo (datos no mostrados) y por lo tanto los efectos observados no pueden atribuirse a las diferencias de activación y reconocimiento del receptor.

Utilizando los mismos grupos experimentales (1-4) como se ha descrito anteriormente, las bacterias se aplicaron durante 2 horas antes de analizar el ARNm por hibridación Northern y las membranas se sondaron con sondas específicas G3PDH e I $\kappa$ B $\alpha$  marcadas con  $^{32}$ P. Se mejoraron los niveles de ARNm de I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B) y la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 2J, K). Este aumento podría atribuirse a la actividad transcripcional de RelA que induce la neosíntesis de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (Cheng *et al.*, 1994).

A continuación, I $\kappa$ B $\alpha$  entra al núcleo y se asocia con RelA retirándola de las regiones promotoras del ADN (Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1995). Curiosamente, también se ha descrito la estimulación mediada por PPAR $\alpha$  de la síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$  (Delerive *et al.*, 2000). Para investigar adicionalmente si se produce una translocación RelA transitoria en las células tratadas con *B. thetaiotaomicron* se llevaron a cabo experimentos utilizando leptomicina B (LMB), un inhibidor específico de la exportación nuclear dependiente de CRM-1. El fundamento era que la ubicación citoplasmática de las proteínas Rel, incluyendo p65, es mantenida por la exportación dependiente de CRM-1 de los complejos RelA/I $\kappa$ B $\alpha$  fuera del núcleo (Huang *et al.*, 2000; Tam *et al.*, 2000). Descubrimos que LMB provocó una acumulación de RelA en los núcleos de las células co-cultivadas con *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* (resultados no mostrados) que indica que, independiente de la presencia de *B. thetaiotaomicron*, se producen la translocación de RelA transitoria al núcleo. Este resultado está en consonancia con la fosforilación y la ubiquitinación del complejo I $\kappa$ B $\alpha$ /RelA citosólico y la activación de la expresión génica de I $\kappa$ B $\alpha$  después de la exposición inicial de las células intestinales a las bacterias.

**Ejemplo 3: *B. thetaiotaomicron* induce la introducción nucleocitoplasmática de PPAR $\gamma$  y secuestra la RelA.**

Un reciente informe de inmunosupresión por bacterias no patógenas atribuía el mecanismo a la inhibición de la ubiquitinación y la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (Neish *et al.*, 2000), que claramente no se aplica a nuestro sistema de modelo. La ubicación citosólica predominante de los complejos NF- $\kappa$ B en células co-cultivadas con *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* podría explicarse entonces por una mayor eficiencia de la exportación nuclear mediada por I $\kappa$ B $\alpha$  sobre la localización nuclear. Los niveles de proteína I $\kappa$ B $\alpha$  son moderadamente superiores en los núcleos de las células tratadas con *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* que con *S. enteritidis* sola, que potencialmente podría acelerar la desactivación de NF- $\kappa$ B y contribuir a las propiedades antiinflamatorias globales de *B. thetaiotaomicron*. Sin embargo, una explicación más probable es la desacetilación diferencial de RelA. Se ha informado recientemente que la duración de la activación de RelA nuclear viene determinada por la acetilación reversible (Chen *et al.*, 2001). La forma acetilada de RelA tiene una baja afinidad para I $\kappa$ B $\alpha$  mientras que la desacetilación de RelA por la histona deacetilasa 3 (HDAC3) mejora la unión a I $\kappa$ B $\alpha$  y la exportación nuclear mediada por CRM-1 de RelA. Demostramos que *B. thetaiotaomicron* mejoraba la asociación de HDAC3 con RelA (Fig. 4G). Se llevaron a cabo experimentos utilizando tricostatin A (TSA), un inhibidor específico de histonas deacetilasas. Los resultados mostraron que la inhibición de las HDACs, en respuesta al tratamiento con TSA (800nM durante 4 horas), resultaba en la acumulación de p65 parcial, pero lo que es más importante, en una salida acelerada de PPAR $\gamma$  al citoplasma en las células tratadas con *S. enteritidis* sola. Los datos presentados apoyan el papel de la acetilación/desacetilación como un

mecanismo importante que facilita la exportación nuclear de p65 y PPAR $\gamma$  en las células tratadas con *B. thetaiotaomicron* (véase la Fig.11).

Además, las proteínas gamma receptoras activadas por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) y RelA parecían co-localizadas dentro del mismo compartimento celular (Fig. 2C, G) y también planteamos la hipótesis de que un mecanismo importante que limita adicionalmente la translocación nuclear de RelA en las células tratadas con *B. thetaiotaomicron* implica el secuestro citosólico de RelA por PPAR $\gamma$ . Más adelante se presenta la evidencia experimental.

Los complejos AP-1 desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión de genes inflamatorios y son activados rápidamente por una variedad de estímulos extracelulares que incluyen factores de crecimiento, citoquinas y bacterias (Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2000). Hemos investigado si los efectos inhibitorios de *B. thetaiotaomicron* se extendían a esta ruta de señalización. La actividad de AP-1 está regulada por dos mecanismos principales, que implican la fosforilación y la expresión mejorada de las subunidades de AP-1 que consiste en homodímeros y heterodímeros de los protooncogenes de las familias Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2), Jun (JunB, c-Jun y JunD) y ATF (ATF2, ATF3/LRF2 y B-ATF), todos miembros de la familia de la cremallera de leucina de las proteínas de unión a ADN. Estas proteínas son controladas principalmente por tres quinasas relacionadas, denominadas colectivamente proteinquinasas activadas por mitógenos (MAP). Hemos investigado si el nivel de fosforilación de las proteínas de las quinasas p42 y p44 (quinasa regulada por señales extracelulares; ERK), las quinasas N-terminales c-Jun (JNK) / proteinquinasas activadas por el estrés (SAP) y las quinasas p38 fueron modificadas en respuesta a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron*. Descubrimos que *S. enteritidis* activaba la MAP quinasa p38 (Figura 3C) pero no la ERK o JNK durante el período de tiempo estudiado (resultados no mostrados). Este descubrimiento está en consonancia con el hecho de que la p38 es activada rápidamente por los estímulos inflamatorios (Raingeaud *et al.*, 1996), mientras que la activación de JNK puede producirse en un momento posterior (Kujime *et al.*, 2000). La activación de la p38 lleva a la fosforilación de elk-1, que junto con el factor de respuesta sérica, se une al elemento de respuesta sérica en el promotor c-fos, para aumentar la traducción y la transcripción de c-fos, como se muestra por los cambios en los niveles de proteínas y genes (Fig. 3D, E). Demostramos que la fosforilación de p38 inducida por *Salmonella* no era modificada por la co-incubación con *B. thetaiotaomicron*. Los niveles de proteína y mensaje fueron aumentados en respuesta a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* y los efectos en la expresión génica de c-fos parecían ser aditivos. La síntesis de c-Fos *de novo* lleva a la formación de heterodímeros Jun-Fos, que tienen una afinidad de unión al ADN diez veces mayor, resultando en una mayor actividad de AP-1 (Musti *et al.*, 1997; Smeal *et al.*, 1991). ATF-2 es también una diana de la MAP quinasa p38 y las rutas de transducción de señales de JNK. El factor de transcripción de ATF-2 es fosforilado por la MAP quinasa p38 en Thr-69 y Thr-71. Sin embargo JNK, fosforila y activa ATF-2 y c-Jun. ATF-2 y c-Jun son por lo tanto, regulados de manera diferente por p38 y las rutas de transducción de señales de JNK (Raingeaud *et al.*, 1996). En nuestro estudio no se observó un aumento del nivel de proteínas c-Jun ni su estado de fosforilación en respuesta a cualquiera de las cepas bacterianas, lo que indica que es probable que la fosforilación de ATF-2 en respuesta a *S. enteritidis* (Fig. 3F) sea inducida por la MAP quinasa p38 y no por JNK. Estos datos están en consonancia con el efecto directo de *S. enteritidis* sobre la actividad de la MAP quinasa p38. Es probable que la activación de ATF-2 desencadene la formación de heterodímeros c-Jun/ATF-2, que a continuación estimulan la transcripción génica de c-jun en respuesta a la *Salmonella* (Fig. 3D). Los efectos antiinflamatorios de *B. thetaiotaomicron* parecen apuntar a la ruta de NF-kB de manera selectiva y esto puede explicar por qué los genes como el IL-8 que tienen una necesidad absoluta de NF-kB (Mukaida *et al.*, 1994; Elliott *et al.*, 2001) son especialmente sensibles a la inhibición por *B. thetaiotaomicron*.

#### Ejemplo 4

Para investigar adicionalmente el mecanismo de la inmunosupresión por bacterias no patógenas inicialmente estudiamos las citoquinas antiinflamatorias, IL-10 y TGF- $\beta$ . La expresión de genes IL-10 no se vio afectada por tratamiento con *B. thetaiotaomicron* (datos no mostrados) aunque esto no excluye la posibilidad de que las proteínas constitutivas puedan estar involucradas. Hubo alguna sugerencia a partir de los datos de que la citoquina contrainflamatoria TGF- $\beta$  pueda estar involucrada.

Sin embargo, si esta citoquina está actuando para regular por disminución las respuestas inflamatorias, es más probable que esté involucrada en los efectos antiinflamatorios a largo plazo, ya que la síntesis de citoquinas *de novo* no habría sido significativa a lo largo del curso temporal de estos estudios agudos.

Los PPARs están surgiendo como moduladores importantes de los procesos inflamatorios (Nakajima *et al.*, 2001).

Los PPARs son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión génica mediante la unión al receptor de x retinoide (RXR), como parejas heterodiméricas, a elementos específicos de la secuencia de ADN denominados elementos de respuesta PPAR (PPRE). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que la activación por ligando de PPAR $\gamma$  puede ser importante en la modulación de AP-1 y la expresión génica mediada por NF-kB (Su *et al.*, 1999). Hemos investigado el papel de los PPARs en la regulación de NF-kB por *B. thetaiotaomicron*. En consonancia con la activación del receptor pudimos demostrar que el ARNm para PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  disminuía en células expuestas a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* (Fig. 4A) y también después de la exposición a un ligando PPAR $\gamma$  específico, 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PG<sub>J</sub>) pero no con el fenofibrato, un ligando de PPAR $\alpha$  específico (Fig. 5B). La activación de PPAR $\gamma$  se ha asociado anteriormente con la regulación por disminución de las proteínas y el ARNm de PPAR $\gamma$  en los adipocitos 3T3-L1 (Camp *et al.*, 1999). Utilizando 15d-PG<sub>J</sub> y ciglitazona también demostramos que la

activación de la expresión de citoquinas inflamatorias por *S. enteritidis* podría atenuarse en un intervalo de concentración considerado fisiológico (Fig. 4C, D). Se sometieron a ensayo dos ligandos diferentes para PPAR $\gamma$  ya que 15d-PGJ<sub>2</sub> puede inhibir directamente la I KappaB quinasa (Straus *et al.*, 2000). Se ha descrito que tanto la 15d-PGJ<sub>2</sub> como la ciglitazona inhiben la inducción de AP-1 y COX-2 en las células epiteliales del intestino humanas (Subbaramaiah *et al.*, 2001) y puede tener también un beneficios terapéutico en el tratamiento de la colitis (Su *et al.*, 1999). Descubrimos que los ligandos de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  eran capaces de atenuar la inducción de citoquinas mediada por *Salmonella* (Fig. 4C, D, E). Esto está en consonancia con los informes recientes sobre los agonistas de PPAR $\gamma$ , que han demostrado atenuar la expresión de NK-KB e IL-8 en células epiteliales gástricas tratadas con *H. pylori* (Gupta *et al.*, 2001), y también inhiben la infiltración de PMN en las lesiones intestinales inducidas por isquemia-reperusión (Nakajima *et al.*, 2001).

Aunque hemos observado efectos con agonistas de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$ , en los experimentos posteriores nos concentramos en PPAR $\gamma$ , ya que ha demostrado expresarse a niveles mucho mayores que PPAR $\alpha$  en la mucosa del colon (Mansen *et al.*, 1996; Fajas *et al.*, 1997).

Además de regular la transcripción génica a través de PPPE, se ha demostrado recientemente que los PPARs recientemente inhiben la transcripción génica al interferir con otras rutas del factor de transcripción a través de un mecanismo independiente de unión al ADN (Delerive *et al.*, 1999). PPAR $\gamma$ 2 puede encontrarse en los compartimentos citosólicos y nucleares (Thuillier *et al.*, 1998), aunque actualmente se desconoce la importancia fisiológica de la PPAR $\gamma$  citosólica. Utilizando la localización inmunocitoquímica en células Caco-2 fijas descubrimos que *S. enteritidis* inducía la acumulación nuclear de PPAR $\gamma$  (Fig. 2F). Es importante señalar que la fosforilación del dominio NH<sub>2</sub>-terminal de PPAR $\gamma$  (en Ser-122) por la MAP quinasa, reduce la afinidad de unión del ligando y regula negativamente las funciones transcripcional y biológica de PPAR $\gamma$  (Shao *et al.*, 1998). Esto explicaría por qué la acumulación nuclear de PPAR $\gamma$ , durante las primeras etapas de una respuesta inflamatoria a *Salmonella*, es ineficaz en la supresión de la transcripción de genes inflamatorios. Después de los co-cultivos de *S. enteritidis* con *B. thetaiotaomicron*, PPAR $\gamma$  se redistribuía al citoplasma (Fig. 2G, H). La distribución diferencial de PPAR $\gamma$  dentro de las células Caco-2 expuestas a *S. enteritidis* y en el contexto de *B. thetaiotaomicron* también se demostró por transferencia Western utilizando extractos citoplasmáticos y nucleares (Fig. 4F).

Sin embargo, todos los datos publicados referentes a PPAR $\gamma$  se han centrado en su sitio nuclear de acción. Utilizando inmunocitoquímica descubrimos que *S. enteritidis* inducía la acumulación nuclear de PPAR $\gamma$  en la células Caco-2 (Fig. 4H(g)). En cambio, PPAR $\gamma$  se redistribuía al citoplasma después del co-cultivo con *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* (Fig. 4H(h,i)). Los estudios del curso temporal indican que este proceso era claramente evidente a los 60 min después de la exposición a la bacteria y prácticamente se completaba en 2 h (resultados no mostrados). La distribución diferencial de PPAR $\gamma$  en las células Caco-2 expuestas a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* también se demostró mediante transferencia Western de extractos citoplasmáticos y nucleares (Fig. 4F).

La proteína PPAR $\gamma$  inducida por *Salmonella* formaba un complejo heterodimérico con RXR $\alpha$  (demostrado por IP, resultados no mostrados) y separaba la fracción celular insoluble en detergente mientras que inducida por *B. thetaiotaomicron* era soluble en detergente (Fig. 4F). La introducción nucleocitoplasmática de PPAR $\gamma$ , inducida por el co-cultivo de *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron*, no era bloqueada por el tratamiento con leptomicina B (LMB) (resultados no mostrados) y por lo tanto no era facilitada por el receptor de exportación crm-1 análogo a otros receptores nucleares (Bunn *et al.*, 2001). Sin embargo, los inhibidores metabólicos y el frío redujeron significativamente la exportación nuclear considerablemente reducida (resultados no mostrados). Otros inhibidores biológicos como TSA (inhibidor de la histona desacetilasa) (Fig. 4H(j-m)) y SB (inhibidor de la MAP quinasa p38) (datos no mostrados) también se aplicaron a las células Caco-2 tratadas con *S. enteritidis* y demostraron inducir la exportación y el marcaje citosólico por punción de PPAR $\gamma$  del núcleo (Fig. 4H(k)), imitando así el efecto de *B. thetaiotaomicron*. Las rutas de señalización de AP-1, que incluyen p38, no fueron inhibidas por *B. thetaiotaomicron* (resultados no mostrados), lo que indicaba que las reacciones de acetilación/desacetilación son potencialmente relevantes para el mecanismo de exportación nuclear de PPAR $\gamma$ .

Además, aunque los ligandos de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  atenúan la inducción de citoquinas mediada por *Salmonella* (resultados no mostrados), los ligandos de PPAR sometidos a ensayo en estos experimentos no imitaban el efecto de *B. thetaiotaomicron* en la re-localización celular de PPAR $\gamma$ , lo que sugería un mecanismo de regulación o un ligando endógeno novedoso para PPAR $\gamma$ .

Utilizando la inmunocitoquímica de doble marcaje descubrimos que gran parte de la proteína PPAR $\gamma$  se co-localizaba con RelA (Fig. 4H n-p). Propusimos la hipótesis de que el acoplamiento físico entre PPAR $\gamma$  y RelA es un factor importante para facilitar la localización citoplasmática en las células intestinales, expuestas a *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron*.

Se ha sugerido que las PPAR $\gamma$  y NF-kB nucleares pueden formar un complejo inactivo (Ricote *et al.*, 1999). Además, los experimentos de "pull down" de la glutatión S-transferasa demostraron que la PPAR $\alpha$  interactúa físicamente con c-Jun y RelA p65 (Delerive *et al.*, 1999). En nuestro estudio, utilizando protocolos de inmunopurificación (IP) demostramos que el aislamiento de PPAR $\gamma$  a partir de células tratadas con *S. enteritidis* en presencia de *B. thetaiotaomicron* resultaban en la co-purificación de RelA (Fig. 4G) lo que sugería que las proteínas se asocian físicamente, posiblemente como componentes de un complejo de multiproteínas en capas.

La interacción directa de PPAR $\gamma$  y RelA fue confirmada por la traducción *in vitro* y la IP (Fig. 4b).

## Ejemplo 5

Para investigar adicionalmente la importancia de PPAR $\gamma$  en la regulación de RelA utilizamos una forma negativa dominante (DN) del receptor (donada por el profesor Chatterjee, Universidad de Cambridge, Reino Unido) (Gurnell *et al*, 2000). Dentro de los receptores PPAR hay una conservación sorprendente de la leucina y el ácido glutámico.

Estos residuos son esenciales para la unión por ligando y el reclutamiento de los co-activadores nucleares. La mutación de estos residuos genera una forma DN del receptor, que perjudica su capacidad para reclutar co-activadores y liberar dos co-represores, silenciando el mediador de retinoide y los receptores de tiroides (SMRT) y el co-represor nuclear (NcoR) (Gurnell *et al*, 2000). Los experimentos de co-inmunoprecipitación con PPAR $\gamma$  DN indican que la SMRT interactúa con el receptor *in vivo* y que la PPAR $\gamma$  mutada es un potente represor de la transcripción. Se prepararon constructos de proteína quimérica fluorescente de PPAR $\gamma$  humana y la forma negativa dominante de PPAR $\gamma$  que contiene una proteína fluorescente cian (CFP) en el dominio carboxilo terminal negativa predominante por amplificación PCR a partir de clones descritos anteriormente (Gurnell *et al* desarrollo). La RelA quimérica unida a YFP fue donada por el Dr. J. Schmid (Schmid *et al* 2000). La confirmación de la expresión exitosa se llevó a cabo por análisis de transferencia Western de células Hela transfectadas transitoriamente utilizando anticuerpos RelA antihumano y PPAR $\gamma$  antihumano.

Se llevaron a cabo estudios de doble transfección con el gen reporter de la luciferasa NF-kB y PPAR $\gamma$  DN un (donado por el Dr. Israel, Instituto Pasteur, París, Francia). En consonancia con un informe reciente descubrimos que las células expuestas durante largos períodos a *S. enteritidis* patógena inactivaba la actividad luciferasa (Savkovic *et al*, 2000). Para evitar esto estimulamos las células durante 2 horas y a continuación eliminamos las bacterias por lavado y determinamos la producción de proteína luciferasa después de 8 horas. Descubrimos tanto en las células transfectadas con PPAR $\gamma$  DN como en las control, que *S. enteritidis* inducía la síntesis de proteína luciferasa y la activación de NF-kB ( $P < 0,001$ ) (Fig. 5C). En las células transfectadas de tipo salvaje (NT) con PPAR $\gamma$  (sólo luciferasa) esta respuesta fue atenuada por *B. thetaiotaomicron* ( $P < 0,028$ ), pero no en las células transfectadas con el negativo dominante (DN) (Fig. 5C).

De manera similar, hubo modificación de la distribución celular de RelA, como se determinó utilizando inmunocitoquímica y microscopía confocal de barrido láser (LSCM), en células transfectadas con proteína fluorescente verde (GFP) con y sin PPAR $\gamma$  DN. En las células de control (GFP sola) la distribución de RelA fue predominantemente citosólica como se ha descrito anteriormente para las células no transfectadas (Fig. 5D (inserto B, C)). En las células transfectadas con PPAR $\gamma$  DN, la distribución fue irregular y RelA se localizaba en los compartimentos citosólicos y nucleares (Fig. 5D, (inserto D, E)). Estos datos demuestran que la PPAR $\gamma$  es esencial para secuestrar la RelA y para evitar la translocación nuclear.

Además hemos investigado la distribución celular de PPAR $\gamma$  y RelA utilizando microscopía fluorescente llevada a cabo en células Caco-2 y en células Hela transfectadas con constructos quiméricos de WT y PPAR $\gamma$  DN y CFP y RelA e YFP quimérica. Gran parte de la proteína PPAR $\gamma$ /RelA expresa se localizaba dentro de los núcleos de las células transfectadas como se ha descrito anteriormente (Schmid *et al* 2000). De manera similar, en las células transfectadas con PPAR $\gamma$  WT y RelA la expresión predominante fue nuclear pero también hubo una evidencia muy clara del marcaje citosólico por punción y co-localización de PPAR $\gamma$  y RelA después de la incubación con *B. thetaiotaomicron* (Fig. 5E(f)). Sin embargo, en las células transfectadas con PPAR $\gamma$  DN, RelA estaba ausente del compartimento citosólico (Fig. 5E(i)). Estos resultados indican que la exportación nuclear de PPAR $\gamma$  DN, y la RelA co-asociada, se veían afectadas y se concluye que PPAR $\gamma$  es esencial para la exportación nuclear y la distribución citosólica de RelA inducida en las células intestinales por *B. thetaiotaomicron*. En los experimentos de transfección de células Hela y Caco-2 se observó un pool nuclear significativo de proteína RelA y PPAR $\gamma$  expresada. En este escenario, independientemente del estado de WT o DN, los agregados de PPAR $\gamma$  y RelA fueron claramente visibles en el núcleo de las células cultivadas en presencia de *S. enteritidis* y *B. thetaiotaomicron* (también confirmado por IP, resultados no mostrados) demostrando que la interacción de PPAR $\gamma$  y RelA se produce dentro del compartimento nuclear. Observamos que la distribución de PPAR y RelA dentro del núcleo era similar a la de los factores de empalme que se producen dentro de los empalmosomas o manchas nucleares. En los estudios de co-localización, encontramos esa proteína PPAR $\gamma$  co-localizada con SC35, un factor de empalme del pre-ARNm específico, (Fig. 5E(k)) lo que indica que el complejo PPAR $\gamma$ /RelA también puede ser capaz de interactuar con la maquinaria del ARNm de la célula. La evidencia de la interacción entre los receptores nucleares y los compartimentos de empalme fue publicada durante la preparación de este manuscrito (Zhoa *et al*, 2002). Evidentemente, en las células Caco-2 la presencia de *B. thetaiotaomicron* induce una mayor exportación nuclear de PPAR $\gamma$  y, de una manera "piggy back" la exportación de la RelA transcripcionalmente activa, evitando así la importación nuclear adicional y la transcripción mediada por RelA durante la inflamación sostenida. Mediante este mecanismo *B. thetaiotaomicron* ejerce un potente efecto antiinflamatorio.

La existencia de bacterias dentro del tracto gastrointestinal que suprimen activamente la inflamación parece cierta. Un cambio en el equilibrio entre microorganismos entéricos que suprimen la inflamación y aquellos que apoyan las respuestas inflamatorias pueden ser directamente relevantes para la etiología de las enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal. Por lo tanto es plausible que la enfermedad inflamatoria intestinal se relacione con la pérdida de cepas bacterianas que contribuyen activamente a la homeostasis inmune y esto puede explicar también por qué algunos pacientes responden a la terapia con probióticos (Madsen *et al*, 2001). Del mismo modo, la disfunción de las PPARs, debido a los niveles inadecuados de proteína receptora o debido a la expresión de variantes alélicas específicas que mejoran la susceptibilidad a condiciones inflamatorias del intestino, puede ser muy relevante. Esta

visión es apoyada adicionalmente por los últimos datos publicados que indican que los ratones deficientes en PPAR $\gamma$  heterocigóticos son significativamente más susceptibles a la lesión e inflamación intestinal inducida por isquemia-reperusión (Nakajima *et al.*, 2001).

## MÉTODOS

### 5 Reactivos

Se obtuvieron reactivos de cultivos tisulares de Sigma e Invitrogen. Los anticuerpos se obtuvieron de Santa Cruz, Molecular Probes, New England Biolabs y, los reactivos moleculares se obtuvieron de Promega, Invitrogen y Amersham.

### Modelos de co-cultivos *S. enteritidis*/*B. thetaiotaomicron*

10 Las células Caco-2 y Hela se cultivaron de manera rutinaria en placas de cultivo de 35 mm. Por lo general los experimentos necesitaron la incubación de las células con los siguientes cuatro tratamientos: células en medio solas (1); células incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* (2); células incubadas con  $10^8$  *S. enteritidis* y  $10^9$  *Bacteriodes thetaiotaomicron* (3); y células incubadas con  $10^9$  *B. thetaiotaomicron* (4).

15 Se aplicaron las bacterias durante 2 h ó 4 h y se eliminaron por lavado extensivo. Otras bacterias y ligandos sometidos a ensayo incluían *E. coli* 0157 H7, *B. vulgatus*, PMA, IL-1 $\alpha/\beta$  y TNF $\alpha$ . Todos los experimentos fueron optimizados y los protocolos se basaron en las respuestas a dosis detalladas y en los cursos temporales. La migración transepitelial de las células PMN a través de las monocapas de células Caco-2 se determinó mediante ensayos MPO (Parkos *et al.*, 1991). Las células Caco-2 se incubaron durante 2 h antes de eliminar las bacterias reemplazarlas con medio fresco. Posteriormente las células se incubaron durante 2 h más. A continuación, las células  
20 y el medio derivado del compartimiento apical se solubilizaron en Tritón X-100 al 1% y se determinaron por MPO.

### Análisis de citoquinas

El análisis de citoquinas se llevó a cabo utilizando macromatriz de Clontech, hibridaciones Northern y PCR en tiempo real del ARN aislado de células Caco-2. Se aislaron el ARN y ARNm totales, el ADN producido y las PCRs se llevaron a cabo en condiciones estándares. La concentración de proteína IL-8 se determinó mediante ELISA.

### 25 Análisis EMSA de NF- $\kappa$ B y AP-1

Se incubaron los extractos nucleares con sondas de oligonucleótidos marcados con  $^{32}$ P de hebra simple que contenían las secuencias consenso de unión para NF- $\kappa$ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') o AP-1 (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'), separados por electroforesis y visualizadas por autorradiografía. Los análisis de superretardo EMSA se llevaron a cabo utilizando anticuerpos contra las subunidades de NF- $\kappa$ B  
30 específicos. Los efectos de *B. thetaiotaomicron* en la señalización de NF $\kappa$ B y AP-1 se determinaron mediante EMSA, transferencia Western (proteínas y fosfoproteína), análisis del gen reporter específico de promotor y la expresión génica de dianas (p. ej., *fos* y *jun*).

### Análisis de inmunofluorescencia

35 Después de los tratamientos experimentales las células Caco2 o Hela cultivadas en placas de cultivo de 35mm se fijaron en paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron en Tritón X-100/PBS al 0,2%. Las células se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios ( $\mu$ g/ml) diluidos en PBS que contenía suero al 1% de la especie en la que se creció el anticuerpo secundario.

40 Los anticuerpos secundarios ( $1\mu$ /ml) fueron IgG de burro anti-cabra Alexa Fluor 594 o Ig de cabra anti-conejo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) según resulte apropiado. Las células marcadas se montaron con Vectorshield (Vector) y se examinaron en un microscopio de fluorescencia de campo amplio Zeiss Axioskop 50 o en un microscopio de barrido láser Bio-Rad Radiance2100.

Se importaron imágenes digitales representativas al Adobe Photoshop 6.0 para su arreglo final.

### Construcción de PPAR\* marcado fluorescentemente

45 La secuencia de codificación de PPAR $\gamma$ , y un mutante negativo dominante de PPAR $\gamma$  (Gurnell *et al.*, 2000), se modificaron durante la amplificaciones por PCR para añadir a *Xho I* la secuencia de reconocimiento en el extremo 5' y una secuencia de reconocimiento *Sac II* en el extremo 5' y una secuencia *Sac II* en el extremo 3' de los productos. Las ampliaciones se llevaron a cabo utilizando *Pfu* ADN polimerasa. Los productos se restringieron y clonaron en pECFP-C1 y pEYFP-C1 (Promega). La construcción exitosa se verificó por secuenciación del ADN. La p65 humana clonada en pEYFP-C1 fue como se ha descrito anteriormente (Schmid *et al.*, 2000).

50 Se sembraron células Caco2 o Hela en placas de cultivo de 35mm, se hicieron crecer hasta un 90% de confluencia y se transfectaron utilizando los métodos mediados por lipofectamina estándares (Invitrogen). Después de 48 h, se llevaron a cabo incubaciones bacterianas como se ha descrito anteriormente; se fijaron las células durante 30 min a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% en 0,1M de tampón fosfato de sodio pH 7,4, se lavaron en PBS y

se examinaron en un microscopio de fluorescencia de campo amplio Zeiss Axioskop 50 equipado con filtros personalizados (Omega Optical) para CFP e YFP. Se grabaron imágenes representativas con una cámara digital Zeiss AxioCam, se procesaron con el software Zeiss AxioVision 3.0 y se importaron a Adobe Photoshop 6.0 para su arreglo final. En algunos experimentos las células transfectadas se sometieron a los análisis de inmunofluorescencia descritos anteriormente.

### Ejemplo 6: estudio de rata *in vivo*

El siguiente ejemplo se llevó a cabo para establecer si *B. thetaiotaomicron* podría modificar la función intestinal de ratas libres de patógenos específicos y aumentar su resistencia a una exposición a patógenos. *Bacteroides* aparece generalmente en el intestino delgado en la transición lactancia-destete (Chang *et al*, 1994; Hooper *et al*, 2001). Por tanto, se suministró la bacteria diariamente a ratas Lister Hooded libres de patógenos específicos a partir del destete (19 d) hasta la madurez (34-40 días) para garantizar su presencia en grandes cantidades durante este período de desarrollo inmune e intestinal principal. A los 34 días de edad, las ratas fueron expuestas por vía oral a *Salmonella typhimurium* var. *Enteritidis* S1400.

### MÉTODOS

#### 15 Cultivo de bacterias:

*B. thetaiotaomicron*, de Deutsche Sammlung von Microorganismen und GmBH (Braunschweig, Alemania) se mantuvo congelada en agar anaeróbico Wilkins-Chalgren. Fue subcultivada en caldo anaeróbico Wilkins-Chalgren o medio M10 [10 ml en tubos de Hungate (Bryant, 1972)] y se hicieron crecer a 37°C durante 48 horas. Se transfirió una muestra (0,5 ml) a medio fresco [10 ml en tubos de Hungate] y se hizo crecer a 37°C durante 24 horas. Este cultivo contenía aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>.

Se centrifugaron diez ml de *B. thetaiotaomicron* (2000g, 12 min), se lavó el pellet con 0,05M salino tamponado con fosfato pH 7,2 y a continuación se resuspendieron en gelatina comercial [10 ml, 37°C, preparada en condiciones anaerobias]. Se vertió la gelatina en una placa de Petri estéril bajo CO<sub>2</sub> y se dejó solidificar a 4°C. Aproximadamente 1 hora más tarde, la gelatina se cortó en cantidades ponderadas (0,5g, ~  $10^8$  cfu de *B. thetaiotaomicron*) y se alimentó a las ratas. La bacteria siguió siendo viable durante por lo menos 6 horas en estas condiciones. Sin embargo, generalmente toda la gelatina se comía a los pocos minutos de ser colocada en la jaula.

*Salmonella entérica* serovar Enteritidis S 1400 se aisló originalmente de la infección de las aves de corral y ha sido bien caracterizada (Allen-Vercoe y Woodward, 1999). Las soluciones madre, mantenidas en medio de huevo Dorset a 4°C, se sub-cultivaron en placas de agar Luria-Bertani y se hicieron crecer a 37°C durante toda la noche. Se inocularon cinco-diez colonias de la placa en 10 mls de caldo Luria-Bertani y se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche para dar aproximadamente  $1 \times 10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>.

**Los estudios en animales:** el instituto de investigación Rowett Research Institute opera sujeto a la autorización de la ley UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986. El comité de revisión ética y la unidad de bienestar de los animales del instituto y la inspección gubernamental apropiada supervisan y revisan todos los estudios en animales. Los procedimientos de gestión y experimentales realizados fueron aprobados por el comité de ética y realizados en estricta conformidad con los requisitos de la Ley por personal autorizado para llevar a cabo dichos procedimientos.

Veinticuatro ratas macho Hooded Lister libres de patógenos específicas (40 g), criadas en la pequeña unidad animal del instituto de investigación Rowett Research Institute, fueron destetadas con 19 días y transferidas de inmediato a un centro de Clase II. Fueron alojadas individualmente en jaulas de metabolismo (Techniplast, Kettering, Reino Unido) dentro de aislantes de flexi-película (Moredun, Animal Health, Penicuik, Reino Unido) para la duración del estudio (21 días). Se proporcionaron túneles anidados en cada jaula de metabolismo y las jaulas fueron organizadas en los aislantes para permitir poder ver pero no tener contacto con otros animales. Había agua destilada estéril disponible en todo momento. Las ratas fueron pesadas diariamente y las heces fueron recogidas a lo largo del estudio. Los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces con resultados similares. Los datos son las medias  $\pm$ SD (n=3). Las ratas inicialmente tuvieron acceso libre a una dieta basada en lactoalbúmina semisintética (100 g proteína kg<sup>-1</sup>) de alta calidad (Grant *et al*, 2000). Cuando llegaron aproximadamente a los 80 g (una edad aproximada de 30 días) su ingesta de alimentos se redujo gradualmente durante un período de 3-4 días a 7g rata<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, en forma de dos comidas al día y, a continuación, se mantuvieron a este nivel para el resto del estudio. Esta fue la media diaria de ingesta libre observada para ratas de la misma edad después de la infección oral con *Salmonella enterica* var. Enteritidis y alrededor del 70% de la ingesta libre de esta dieta por animales no infectados. Las ratas fueron alojadas y gestionadas de esta manera a partir del destete para reducir la exposición ambiental a las bacterias y la contaminación cruzada posterior al destete (Grant, 1996).

Doce de las ratas recibieron *B. thetaiotaomicron* (aproximadamente  $10^8$  CFU) una vez al día a partir del destete (19d) durante la realización del estudio. A los 34 días de vida, seis ratas pretratadas con *B. thetaiotaomicron* y seis controles recibieron, por sonda, una sola dosis de 0,8 ml de cultivo de serotipo de Salmonela Enteritidis S1400 (aproximadamente  $10^9$  CFU). Las ratas restantes recibieron la cantidad equivalente del medio de cultivo. Todas las ratas fueron regresadas a sus jaulas y alimentadas con una dieta basada en la lactoalbúmina (7g rata<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) por otros 6 días. En el último día, las ratas fueron alimentadas con 2 g de dieta y murieron por desangramiento y

sobredosis de halotano (Ródano Mérieux, Essex, Reino Unido) exactamente dos horas más tarde. Se les abrió el abdomen y se les extrajo tejidos asépticamente.

5 El estómago y el intestino delgado fueron lavados con salino tamponado con fosfato (PBS, pH 7,2) para eliminar contenidos y bacterias no adherentes. Se eliminaron 10 cm de yeyuno (5-15 cm desde el píloro) y 10 cm del íleon (5-15 cm desde la unión ileocecal). Se procesaron estos y el tejido del estómago, contenidos con intestino ciego, contenidos con colon, los ganglios linfáticos mesentéricos, una proporción representativa del hígado y el bazo (200-400 mg) y un riñón para conteos viables.

10 Se recogieron y se congelaron más trozos de yeyuno e íleon (15-25 cm desde el píloro y 15-25 cm desde la unión ileocecal respectivamente) en nitrógeno líquido para un análisis bioquímico, al igual que el resto de tejido del intestino delgado (~ 40 cm), hígado, bazo, riñones, timo, pulmones, corazón y músculos gemelo de miembros posteriores. Estos fueron pesados, liofilizados y nuevamente pesados.

#### Bacterias viables en tejidos de rata

15 Se pesaron muestras de tejido y a continuación fueron homogeneizadas en diluyente de máxima recuperación (MRD, Fisher Scientific, Reino Unido) utilizando un homogeneizador de tejidos Janke-Kunkel Ultra Turrax T25 a 20.000 rev. min<sup>-1</sup> durante 30 segundos. Hasta seis diluciones secuenciales (1:10 v/v) del principal homogenado fueron realizadas en MRD. Las muestras de cada dilución fueron colocadas en la superficie de placas agar XLD bien secadas (Fisher Scientific, Reino Unido) y placas agar de MacConkey N° 3 (Fisher Scientific, Reino Unido) e incubadas durante la noche a 37°C. El conteo viable fue estimado mediante el método de Miles y Misra (1938) o mediante un método de extensión en placa (Collins y Lyme, 1989).

#### 20 PCR

25 Se extrajo y se purificó ADN utilizando un dispositivo QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, Crawley, Reino Unido). El PCR se basó en el método de Teng *et al* (2000). El par cebador: 5'-TGGAGTTTTACTTTGAATGGAC-3' (BTH-F) y 5'-CTGCCCTTTTACAATGGG-3' (BTH-R), identificado por Teng *et al* (2000), fue comprado en Sigma Genosys Ltd (Cambridge, Reino Unido). La mezcla de reacción (50 µl), basada en reactivos de un dispositivo Taq PCR Core Kit (Qiagen Ltd, Crawley, Reino Unido), contenía 50 pmol de ambos cebadores, mezcla de dNTP 10 nmol, 5 µl de tampón de PCR de Qiagen 10X, 10 µl Q-solución 5X, 10 µl de muestra y 1,25U de Taq ADN Polimerasa. Se utilizó un programa PCR de arranque en caliente. La mezcla de reacción sin Taq ADN Polimerasa se calentó a 94°C durante 15 segundos y a través de 35 ciclos de 94°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos y 74°C durante 1 minuto, seguido de un ciclo de 74°C durante 2 minutos y 45°C durante 2 segundos. Los amplicones fueron separados en un gel de agarosa (10g/l) que contiene bromuro de etidio (gel de 1 µg/ml). Se obtuvo un solo amplicón (721 bp) con el ADN de las heces y *B. thetaiotaomicron*. Las secuencias de estos amplicones se mostraron idénticas entre sí y a la secuencia publicada (Teng *et al*, 2000).

#### MPO

35 Se homogeneizaron muestras de tejido (1:80 p/v) en tampón fosfato de potasio 5mM helado y pH 6,0 utilizando un homogeneizador de tejidos Janke Kunkel Ultra Turrax T25 a 20.000 rev. min<sup>-1</sup> durante 30 segundos y se centrifugaron (3000g x 30 min, 4°C). El pellet (1:20 p/v) fue sonicado (3 x 5 seg) en tampón fosfato de potasio 0,5M y pH 6,0 helado que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB, 5 g/l) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 3,72g/l), dejado en hielo durante 30 min y centrifugado (3000g x 30 min, 4°C) [Stucchi *et al*, 2000]. El sobrenadante fue congelado hasta los ensayos.

40 La actividad mieloperoxidasa (MPO) se determinó mediante monitorización de la oxidación dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB, Dynex Technologies, Ashford, Reino Unido) tampón fosfato de potasio 50M pH 6,0 (Zimmerman y Granger, 1990). Se midió la absorbancia a 450 nm después de la terminación de la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18M.

45 Se utilizó mieloperoxidasa humana (Calbiochem, Reino Unido) como estándar y los valores se expresaron como equivalentes MPO.

Se determinó la MPO inmunoreactiva en el contenido intestinal o las heces mediante un método ELISA competitivo.

50 Las placas de microtitulación (Immulon 4, Dynex Technologies, Ashford, Reino Unido) fueron recubiertas [10ng/pocillo] con mieloperoxidasa humana salino tamponado con fosfato 10mM pH 7,4 [PBS] durante toda la noche a 4°C. Después del lavado [PBS que contenía Tween-20 (1ml/l)], se bloquearon las placas con PBS que contenían seroalbúmina bovina (BSA, 10g/l) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se añadieron las muestras o los estándares [50µl/pocillo] y se realizó una dilución en serie en PBS que contenía BSA (1g/l), Tween-20 (1ml/l) y leupeptina (1mg/l). También se añadió anticuerpo de ratón anti-mieloperoxidasa humana [Calbiochem, Reino Unido, 50µl/pocillo de dilución 1:4000]. Las placas se incubaron durante 1 hora, se lavaron y a continuación se hicieron reaccionar durante 1 hora con IgG anti-ratón biotinizada seguido de Extravidin/peroxidasa (kit EXTRA-3, Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido). Tras el lavado, se añadió reactivo TMB (7µl/pocillo) y se incubó en oscuridad hasta 2 horas. La reacción se paró por adición (50µl/pocillo) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18M y se leyó la absorbancia a 450nm.

Los valores se expresaron como equivalentes de MPO inmunoreactiva.

**IgG**

5 IgG fue determinada por ELISA competitiva. Se recubrieron unas placas de microtitulación [ $\mu\text{g}/\text{pacillo}$ ] con IgG de ratas (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) en PBS durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después del bloqueo y el lavado de las placas, se añadieron muestras o cantidades estándar de IgG de rata [ $50\mu\text{l}/\text{pacillo}$ ] y se diluyeron en serie en PBS que contiene BSA (1g/l) y Tween-20 (1 ml/l). También se añadieron anticuerpos IgG de anti-rata biotinilados (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido;  $50\mu\text{l}/\text{pacillo}$  de dilución 1:1000) y las placas se incubaron durante 1 hora. Las placas fueron a continuación reaccionadas con Extravidin/peroxidasa y reactivo TMB como por inmunoensayo MPO. Los valores se expresaron como equivalentes de IgG.

**IgA**

10 IgA fue determinada por ELISA de captura. Se recubrieron unas placas de microtitulación con IgA anti-rata de cabra (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido;  $100\mu\text{l}/\text{pacillo}$  de una dilución 1:100 en PBS) durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después del bloqueo y el lavado de las placas, se añadieron muestras o cantidades estándar [ $100\mu\text{l}/\text{pacillo}$ ], se diluyeron en PBS que contiene la BSA (1g/l), Tween-20 (1ml/l) y leupeptin (1 mg/l) y se incubaron durante 1 hora. Tras el lavado, las placas fueron incubadas con anticuerpos IgA anti-rata de ratón (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido; dilución 1:500) durante 1 hora, se volvieron a lavar y se incubaron con anticuerpos IgG anti-ratón bitinilados (dilución 1: 1000) durante 1 hora más. Las placas fueron a continuación procesadas por inmunoensayo MPO. Los valores se expresaron como equivalentes de IgA.

**IgG e IgA específicas de LPS**

20 Se recubrieron unas placas de microtitulación con lipopolisacárido (LPS;  $10\mu\text{g}/\text{pacillo}$ ) de *Salmonella enteritidis* (Sigma Aldrich, Poole, Dorset). Después del bloqueo y el lavado, se añadieron muestras o cantidades estándar [ $100\mu\text{l}/\text{pacillo}$ ]. Las placas fueron lavadas una hora más tarde, se añadió IgG anti-rata o IgA anti-rata biotinilada, y las placas fueron a continuación procesadas como se ha indicado anteriormente. Una unidad de anticuerpos específicos de LPS fue definida como la que figura en el volumen ( $\mu\text{l}$ ) dando una absorbancia de por lo menos 0,2 en la prueba ELISA. El control positivo fue recogido con sueros de ratas 22 días después de su infección con SE: LPS-IgA,  $3,2 \times 10^4$  unidades/ml; LPS-IgG,  $1,7 \times 10^5$  units/ml.

**Elastasa**

Se extrajeron heces o contenido intestinal secados por liofilización (1:10 w/v) en fosfato de potasio 0,5 M y pH 6,0 helado que contiene HETAB, EDTA y  $\text{NaN}_3$  (1g/l), se dejaron en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron (3000g, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) y se congelaron los sobrenadantes.

30 La muestra o elastasa leucocítica (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) fue diluida en serie en Tris HCl 0,2 M y pH 8,0 que contiene 1 M NaCl y leupeptin (1 mg/l) en una placa de microtitulación. Se añadió sustrato (N-succinil-ala-ala-val-p-nitroanilida, 0,2 g/l, Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) y se monitorizó inmediatamente la absorbancia a 405 nm y a intervalos de hasta 20 horas durante la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los valores se expresaron como equivalentes de elastasa leucocítica.

**ADN, ARN, proteína**

Se determinaron ADN, ARY y proteína como se ha indicado anteriormente por los métodos de difenilamina, orcinol y Lowry modificado (Grant *et al*, 2000). Se utilizaron el ADN de testículos de salmón, ARN de levadura y albúmina de suero bovino como estándares.

**Análisis estadístico**

40 Los datos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) en combinación con el ensayo de comparación múltiple de Tukey utilizando el paquete estadístico InStat Statistical Package (GraphPad Software Inc., San Diego, Estados Unidos).

**RESULTADOS**

45 Se detectó *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) en muestras de heces recogidas de ratas tratadas con BT. También se encontró BT en las heces de ratas de control. Sin embargo, los niveles (equivalente a aproximadamente  $10^4$  CFU/g de heces) estaban por debajo de los que se encuentran en las heces de ratas tratadas diariamente con BT (equivalente a aproximadamente  $10^6$  CFU/g de heces).

50 Las ganancias de peso corporal, los pesos de los órganos principales y las composiciones del intestino delgado y del hígado para ratas con BT fueron similares a los de los controles (Tablas 1-4). La distribución general de fermentadores de lactosa y no lactosa en el tracto gastrointestinal parecía no verse afectada y, como ocurre con los controles, no se detectaron bacterias de fermentadores de lactosa ni de no lactosa en muestras de ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, bazo o riñones. Además, los niveles de IgA inespecífica, elastasa y MPO inmunoreactiva en contenido intestinal y heces, MPO en tejido intestinal e IgG e IgA no específicos en suero eran comparables a las muestras recogidas de los animales de control.

Tabla 1. Cantidades bacterianas ( $\text{Log}_{10}$  CFU/g) asociadas con tejidos tomados de ratas de control o ratas tratadas por vía oral con *Bacteroides thetaiotaomicron* [BT], *Salmonella enterica* var. *enteritidis* [SE] o *S. enteritidis* más *B. thetaiotaomicron* [SE+BT].

	Estómago	Yeyuno	Íleon	Intestino ciego	Colon	MLN	Hígado	Bazo	Riñones
<b>Salmonella</b>									
SE	4,90±0,27	5,04±0,54	5,87±0,90	6,84±0,78	6,45±1,03	5,43±0,21	3,08±0,46	3,77±0,25	ND
SE+BT	5,06±0,33	5,15±0,54	6,23±0,12	8,06±0,81*	7,04±0,87	5,24±0,44	2,34±0,36*	3,04±0,32*	ND
<b>Fermentadores de lactosa</b>									
Control	4,97±1,18	3,27±0,66	4,90±0,97	8,08±0,63	7,68±0,58	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND
BT	3,90±0,84	2,78±0,19	4,15±1,13	7,14±1,40	7,15±1,14	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND
SE	3,88±0,69	3,13±0,55	4,01±1,00	7,26±0,64	6,71±0,35	3,49±0,91 <sup>b</sup>	1,85±0,85 <sup>b</sup>	1,96±1,07 <sup>b</sup>	ND
SE+BT	4,16±0,66	3,11±0,63	4,39±1,34	8,32±0,68	7,42±0,95	3,73±0,90 <sup>b</sup>	1,41±0,20 <sup>b</sup>	1,83±0,56 <sup>b</sup>	ND
<b>Fermentadores de no lactosa</b>									
Control	3,92±1,12 <sup>a</sup>	3,15±0,57 <sup>a</sup>	3,88±0,98 <sup>a</sup>	6,73±1,06	6,54±0,74	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND
BT	3,80±0,20 <sup>a</sup>	2,82±0,29 <sup>a</sup>	4,46±0,85 <sup>a</sup>	6,69±0,95	6,63±0,66	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND
SE	5,02±0,42 <sup>b</sup>	4,73±0,59 <sup>b</sup>	6,21±0,36 <sup>b</sup>	7,10±0,56	6,48±0,66	5,22±0,30 <sup>b</sup>	3,16±0,58 <sup>b</sup>	3,81±0,22 <sup>b</sup>	ND
SE+BT	5,12±0,23 <sup>b</sup>	4,98±0,72 <sup>b</sup>	6,24±0,85 <sup>b</sup>	8,01±0,62*	7,26±0,95	5,41±0,29 <sup>b</sup>	2,47±0,23 <sup>c*</sup>	3,27±0,23 <sup>c*</sup>	ND

Medias  $\pm$ SD, n = 6, muestras recogidas 6d después de la infección con *S. enteritidis*. \*SE+BT difiere significativamente de SE ( $p \leq 0,05$ ). Los valores de los fermentadores de lactosa y de no lactosa en una columna con distintos superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). ND, no detectado. El límite de detección era de 2,7 excepto para bazo hepático y riñones para los que era de 1,3. <sup>1</sup>No salmonella, fermentadores de lactosa o de no lactosa fueron detectados en el MLN, hígado, bazo o riñones de control o ratas con BT.

5 Se encontró *S. enteritidis* [SE] en el tracto gastrointestinal seis días después de la exposición oral (Tabla 1). Además, fueron detectables en los ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo. Los fermentadores de no lactosa totales tenían una distribución del tejido similar en estas ratas (Tabla 1). Las cantidades de fermentadores de lactosa en el intestino no parecían estar afectadas por la infección por salmonella. Sin embargo, aparecieron unas cantidades significativas de fermentadores de lactosa en los ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo de ratas infectadas con SE (Tabla 1).

10 Las cantidades de salmonella viable detectadas en el hígado y el bazo después de la exposición a salmonella se reducían considerablemente si las ratas también habían sido tratadas con *B. thetaiotaomicron* [SE + BT] (Tabla 1). También se redujeron los fermentadores de no lactosa totales en estos tejidos pero no cambiaron las cantidades de fermentador de lactosa. Los niveles de la salmonella, fermentadores de no lactosa totales y fermentadores de lactosa en el tracto gastrointestinal y en los ganglios linfáticos mesentéricos fueron similares para SE+BT y SE (Tabla 1). Además, la excreción fecal de salmonella en el experimento de 6 días se produjo a las tasas comparables en ratas infectadas por el patógeno (SE+BT,  $7,0 \pm 0,8 \text{ Log}_{10}\text{CFU/g d}^{-1}$ , SE,  $6,2 \pm 0,6 \text{ Log}_{10}\text{CFU/g d}^{-1}$ ).

15 Tabla 2. Pesos (mg de peso húmedo/100g peso corporal fresco) de tejidos tomados de ratas de control o ratas tratadas por vía oral con *Bacteroides thetaiotaomicron* [BT], *Salmonella enterica* var. *enteritidis* [SE] o *S. enteritidis* más *B. thetaiotaomicron* [SE+BT].

	Control	BT	SE	SE+BT
Ingesta (g/d)	7,0	7,0	7,0	7,0
Peso inicial (g)	83±2	83±3	86±3	88±2
Peso final (g)	93±3	94±2	98±4	100±3
Estómago	887±54	831±82	965±74	846±149
Yeyuno (20 cm)	705±133 <sup>a</sup>	759±78 <sup>a</sup>	1035±224 <sup>b</sup>	966±121 <sup>b</sup>
Íleon (20 cm)	540±46 <sup>a</sup>	576±66 <sup>a</sup>	1139±251 <sup>b</sup>	999±168 <sup>b</sup>
Intestino	2979±255 <sup>a</sup>	3074±282 <sup>a</sup>	5021±420 <sup>b</sup>	4425±415 <sup>c</sup>
MLN	105±48 <sup>a</sup>	100±40 <sup>a</sup>	484±153 <sup>b</sup>	325±73 <sup>b</sup>
Bazo	273±38 <sup>a</sup>	228±31 <sup>a</sup>	315±26 <sup>b</sup>	325±50 <sup>b</sup>
Hígado	3773±72 <sup>a</sup>	3778±239 <sup>a</sup>	4409±266 <sup>b</sup>	4353±166 <sup>b</sup>
Riñones	886±35	906±28	875±29	926±62
Timo	337±32	324±39	355±63	339±29
Pulmones	744±43	698±97	767±65	756±82
Corazón	482±73	442±18	437±27	450±44
Músculos gemelos	814±24 <sup>a</sup>	834±22 <sup>a</sup>	753±35 <sup>b</sup>	838±47 <sup>a</sup>

Medias ±SD, n=6, muestras recogidas 6d después de la infección con *S. enteritidis*. MLN, ganglios linfáticos mesentéricos. Los valores de una fila con distintos superíndices difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). \*SE+BT difiere significativamente de SE ( $p \leq 0,05$ ).

20 Tabla 3 Peso y composición (mg) de tejidos tomados de ratas de control o ratas oralmente tratados con *Bacteroides thetaiotaomicron* [BT], *Salmonella typhimurium* var. *enteritidis* [SE] o *S. enteritidis* más *B. thetaiotaomicron* [SE+BT].

	Control	BT	SE	SE+BT
<b>Yeyuno (20 cm)</b>				
Peso húmedo	650±99 <sup>a</sup>	712±68 <sup>a</sup>	1006±198 <sup>b</sup>	956±89 <sup>b</sup>
Agua	526±76 <sup>a</sup>	588±66 <sup>a</sup>	824±178 <sup>b</sup>	748±86 <sup>b</sup>
Peso seco	124±34 <sup>a</sup>	136±24 <sup>a</sup>	182±24 <sup>b</sup>	208±32 <sup>b</sup>
MPO (µg)	20,7±5,8	29,3±5,2	24,7±9,4	34,4±10,9

**Íleon (20 cm)**

Peso húmedo	500±47 <sup>a</sup>	540±51 <sup>a</sup>	1104±196 <sup>b</sup>	991±159 <sup>b</sup>
Agua	425±57 <sup>a</sup>	458±83 <sup>a</sup>	903±74 <sup>b</sup>	785±70 <sup>c</sup>
Peso seco	74±26 <sup>a</sup>	82±42 <sup>a</sup>	201±26 <sup>b</sup>	206±45 <sup>b</sup>
MPO (µg)	24,7±4,2 <sup>a</sup>	33,1±6,2 <sup>a</sup>	94,4±9,5 <sup>b</sup>	48,7±14,9 <sup>c</sup>

**Intestino delgado total**

Peso húmedo	2756±139 <sup>a</sup>	2883±89 <sup>a</sup>	4885±309 <sup>b</sup>	4391±389 <sup>b</sup>
Agua	2098±121 <sup>a</sup>	2150±129 <sup>a</sup>	3884±212 <sup>b</sup>	3273±350 <sup>c</sup>
Peso seco	658±29 <sup>a</sup>	734±50 <sup>a</sup>	1002±79 <sup>b</sup>	1117±76 <sup>b</sup>
ADN	3,4±0,8 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>a</sup>	5,5±0,5 <sup>b</sup>	6,5±0,9 <sup>b</sup>
ARN	17,8±2,1 <sup>a</sup>	23,6±3,7 <sup>a</sup>	30,9±1,2 <sup>b</sup>	35,7±5,8 <sup>b</sup>
Proteína	268±29 <sup>a</sup>	293±59 <sup>a</sup>	480±56 <sup>b</sup>	530±84 <sup>b</sup>

**Hígado**

Peso húmedo	3520±107 <sup>a</sup>	3546±269 <sup>a</sup>	4295±268 <sup>b</sup>	4344±284 <sup>b</sup>
Peso seco	1022±59 <sup>a</sup>	992±78 <sup>a</sup>	1117±94 <sup>a</sup>	1078±89 <sup>a</sup>

**Bazo**

Peso húmedo	223±33 <sup>a</sup>	207±6 <sup>a</sup>	311±35 <sup>b</sup>	299±39 <sup>b</sup>
Peso seco	68±23 <sup>a</sup>	59±11 <sup>a</sup>	63±14 <sup>a</sup>	74±17 <sup>a</sup>

**Ganglios linfáticos mesentéricos**

Peso húmedo	99,0±47,84 <sup>a</sup>	93,5±37,1 <sup>a</sup>	476,2±165,5 <sup>b</sup>	323,4±68,9 <sup>b</sup>
Agua	63,5±21,6 <sup>a</sup>	66,5±26,0 <sup>a</sup>	304,1±115,2 <sup>b</sup>	208,5±40,0 <sup>b</sup>
Peso seco	35,5±29,3 <sup>a</sup>	27,0±16,6 <sup>a</sup>	72,1±72,7 <sup>b</sup>	114,9±34,0 <sup>b</sup>

Medias ±SD, n=6, muestras recogidas 6d después de la infección con *S. enteritidis*. Los valores de una fila con distintos superíndices difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). \* difiere significativamente de SE ( $p \leq 0,05$ ). ND, no detectado.

- 5 El peso del intestino delgado aumentó como resultado de una infección por salmonella (Tablas 2,3). Esto fue más marcado en el tejido ileal y parecía ser debido a la acumulación de agua y aumentos en el contenido de proteína, ARN y ADN del tejido (Tabla 3). El tratamiento con BT modificó ligeramente la respuesta a la infección. Así, el contenido de agua del intestino delgado de SE+BT [748±22 mg/g] fue considerablemente menor que en el tejido de ratas con SE [799±17 mg/g]. De hecho, era similar a los niveles en el tejido de ratas no infectadas [BT, 745±24 mg/g controles, 760±10 mg/g]. Por el contrario, no hubo ninguna diferencia significativa entre las ratas con SE y con SE+BT en sus pesos secos o contenidos de ADN, ARN y proteína del intestino delgado

Tabla 4. Composición de suero, contenido del intestino o heces recogidas de ratas de control o ratas tratadas por vía oral con *Bacteroides thetaiotaomicron* [BT], *Salmonella enterica* var *enteritidis* [SE] o *S. enteritidis* más *B. thetaiotaomicron* [SE+BT].

	Control	BT	SE	SE+BT
<b>Suero</b>				
IgA (mg/ml)	0,19±0,02 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>a</sup>	0,35±0,06 <sup>b</sup>	0,28±0,04 <sup>b</sup>
IgG (mg/ml)	0,91±0,13	0,83±0,17	0,97±0,10	0,89±0,17
LPS-IgA (unidades/ml)	ND	ND	ND-800	ND-800
LPS-IgG (unidades/ml)	ND	ND	ND	ND
<b>Contenido intestinal</b>				
Proteína (mg)	7,01±1,75 <sup>a</sup>	5,32±1,50 <sup>a</sup>	11,61±3,15 <sup>b</sup>	12,89±3,03 <sup>b</sup>
IgA (mg)	0,38±0,18 <sup>a</sup>	0,23±0,14 <sup>a</sup>	1,19±0,41 <sup>b</sup>	1,42±0,53 <sup>a</sup>
LPS-IgA (unidades)	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	162±58 <sup>b</sup>	221±35 <sup>b</sup>
Elastasa (µg)	1,43±0,29 <sup>a</sup>	210±0,38 <sup>a</sup>	4,20±0,73 <sup>b</sup>	3,10±0,59 <sup>c</sup>
MPO (µg)	1,86±1,31 <sup>a</sup>	270±1,29 <sup>a</sup>	6,56±2,20 <sup>b</sup>	3,91±1,40 <sup>a</sup>
<b>Heces</b>				
Materia seca (mg/d)	369±37 <sup>a</sup>	359±37 <sup>a</sup>	532±44 <sup>b</sup>	553±46 <sup>b</sup>
Agua (mg/d)	183±46 <sup>a</sup>	213±41 <sup>a</sup>	416±119 <sup>b</sup>	412±84 <sup>b</sup>
Proteína (mg/d)	85±15 <sup>a</sup>	97±12 <sup>a</sup>	162±27 <sup>b</sup>	179±17 <sup>b</sup>
IgA (µg/d)	505±202	475±168	1412±773	1022±638
Elastasa (µg/d)	6,4±0,9 <sup>a</sup>	5,7±1,0 <sup>a</sup>	12,5±1,5 <sup>b</sup>	8,9±1,1 <sup>c</sup>
MPO (µg/d)	2,5±1,2 <sup>a</sup>	2,6±1,0 <sup>a</sup>	5,5±1,6 <sup>b</sup>	2,9±1,0 <sup>a</sup>

5 Medias ±SD, n=6, muestras durante una postinfección de 6d con *S. enteritidis*. Los valores de una fila con distintos superíndices difieren significativamente (p≤0,05) ND, no detectado.

10 La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) aumentó significativamente en el tejido ileal procedente de ratas con SE (Tabla 4). Además, la actividad de MPO inmunoreactiva y elastasa en contenidos intestinales y heces también aumentó significativamente (Tabla 4). Por el contrario, los niveles de estas enzimas en muestras equivalentes de ratas con SE+BT fueron similares a o sólo ligeramente superiores a muestras de control.

15 La IgA no específica inmunoreactiva en contenidos intestinales, heces y suero aumentó como resultado de una infección por salmonella (Tabla 4). Sin embargo, no hubo diferencias entre SE+BT y SE en estas respuestas de IgA. También se detectaron pequeñas cantidades de IgA específica a LPS en la sangre y contenidos intestinales. Una vez más, no hubo diferencias significativas entre SE+BT y SE, aunque hubo una tendencia a que los niveles de IgA específica a LPS en el intestino fueran superiores para las ratas SE+BT.

20 Los pesos de músculos de miembros posteriores fueron considerablemente inferiores en ratas con SE que en los controles (Tabla 2). Esto no fue evidente en las ratas con SE+BT y parecía ser el resultado de una acreción muscular reducida. Las ratas con SE depositan aproximadamente 6,6±5,7 mg de peso húmedo [1,4±1,2 mg de peso seco] del músculo gemelo por día, mientras que con SE+BT la tasa de acreción era de 17,1±4,1 mg de peso húmedo [4,2±1,0 mg de peso seco] por día. La deposición de este músculo en controles fue de 15,5±2,9 mg de peso húmedo [3,8±0,7

mg de peso seco] por día y 17,0±4,2 mg de peso húmedo [4,2±1,0 mg de peso seco] por día en ratas con BT. Esto sugiere que las ratas con SE depositaron un promedio de músculo esquelético total de 0,3 g (peso húmedo) por día mientras que con ratas con SE+BT, BT o ratas de control los niveles fueron alrededor de 0,7-0,8 g por día (Figura 6).

5 Los pesos húmedos del hígado, el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos aumentaron significativamente en tasas infectadas por salmonella (Tabla 3). Esto fue debido principalmente a la acumulación de agua en el hígado y el bazo y a un aumento tanto en agua como materia seca en los ganglios linfáticos mesentéricos (Tabla 4). La actividad de peroxidasa en los ganglios linfáticos mesentéricos de ratas infectadas también aumentó [SE, 31,0±25,0; SE+BT, 37,7±23,8; BT, 0,9±0,9; control, 0,4±0,3 µg]. No hubo sin embargo diferencias significativas entre los grupos SE y SE+BT en estos parámetros de tejido.

## 10 DISCUSIÓN

**Salmonelosis:** La *Salmonella enterica* var Enteritidis S1400 colonizó todo el tracto gastrointestinal de las ratas y se translocó a los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo. Además, el peso húmedo y seco del intestino delgado aumentó considerablemente como resultado de una infección. Esto fue más marcado en el íleon y estaba vinculado a la acumulación de agua y mayores niveles de proteínas, ARN y el ADN en el tejido. Las características básicas de la infección, por lo tanto, eran similares a las de otras cepas de Enteritidis o *S. enterica* var. Typhimurium en los modelos de rata (Naughton *et al.*, 1996; 2001; Ewen *et al.*, 1997; Bovee-Oudenhoven *et al.*, 1999; Islam *et al.*, 2000; 2000; Havelaar *et al.*, 2001).

20 Enteritidis y Typhimurium causan una infección autolimitante en las ratas, que está localizada principalmente en el tracto gastrointestinal con una invasión que se produce a través del íleon y evidenciándose sólo una propagación sistémica limitada (Naughton *et al.*, 1996; Bovee-Oudenhoven *et al.*, 1997; 1999; Islam *et al.*, 2000). Además, la bacteremia grave y la muerte son raras, a menos que el estado de salud o la integridad del intestino de las ratas se hayan visto comprometidas por otros factores anteriores a la infección. Esto contrasta marcadamente con la salmonelosis en algunos modelos de ratón en los que estas cepas provocan una enfermedad grave, parecida a la fiebre tifoidea, con una alta incidencia de mortalidad (Lu *et al.*, 1999; Kingsley and Baumler, 2000; Schechter and Lee, 25 2000). Así, la salmonelosis en la rata tiene características muy similares a las infecciones autolimitantes del tipo de la gastroenteritis común en los seres humanos y animales domésticos infectados por Enteritidis o Typhimurium.

En el presente estudio, se descubrió que la infección por salmonella provoca una fuerte respuesta inflamatoria en el intestino delgado distal pero no proximal. Por lo tanto, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO, un marcador neutrófilo) en el tejido ileal aumentó significativamente. Además, aumentaron los niveles de actividad de MPO 30 inmunoreactiva y elastasa leucocítica en contenidos intestinales y heces. Esto es compatible con la infiltración de los leucocitos polimorfonucleares y otras células inflamatorias en tejido ileal y la exvasión de las células inflamatorias en el lumen intestinal, como ya se observó en modelos animales de la salmonelosis (Naughton *et al.*, 1995; 1996; Vassiloyanakopoulos *et al.*, 1998; Darwin and Miller, 1999; Henderson *et al.*, 1999). Además, es coherente con el hecho de que el íleon sea el principal sitio de colonización e invasión por salmonella (Carter and Collins, 1974; 35 Naughton *et al.*, 1996).

La IgA inespecífica en suero, el contenido del intestino y las heces aumentaron considerablemente como resultado de una infección por salmonella. Además, hubo indicios de desarrollo de una respuesta de IgA específica a LPS por una postinfección de 6 días. Además, aumentaron las salidas de materia seca fecal, agua y proteínas, así como los niveles de proteína en el contenido intestinal. También aumentaron los pesos del hígado y del bazo debido a la 40 infección.

También se descubrió que la salmonelosis perjudica al metabolismo del músculo esquelético en ratas. Los animales infectados siguieron depositando músculo esquelético pero las tasas de acreción diaria eran en torno al 40-50% de las observadas en controles, a pesar de que los dos grupos de ratas tuvieran la misma ingesta de materia seca (7 g/rata d<sup>-1</sup>) y proteínas (0,7 g/rata d<sup>-1</sup>). Esto puede haber sido debido a la desviación y a la utilización de nutrientes 45 para apoyar las respuestas defensivas contra la infección (Klasing and Calvert, 1999) y/o a las acciones de endotoxinas u otros factores bacterianos en la síntesis proteica del músculo (Friman *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 2000).

**B. thetaiotaomicron:** en el presente estudio, las ratas fueron expuestas a altos niveles de *B. thetaiotaomicron* exógena a lo largo de un periodo de rápido crecimiento y maduración del intestino y desarrollo del sistema inmunológico. Algunas cepas de *Bacteroides* son patógenos oportunistas y podrían tener efectos nocivos durante 50 este periodo de desarrollo. Sin embargo, como en estudios con animales maduros libres de gérmenes ex monocontaminados con *B. thetaiotaomicron* (Hooper *et al.*, 1999, 2001; Noack *et al.*, 2000), no había indicios de que *B. thetaiotaomicron* perjudicara de manera adversa al intestino o al metabolismo sistémico de las ratas específicas libres de patógenos. De hecho, todos los parámetros de seguimiento en ratas tratadas solamente con *B. thetaiotaomicron*, incluyendo marcadores inflamatorios y niveles de inmunoglobulina, fueron similares a los obtenidos 55 para los controles.

**B. thetaiotaomicron y salmonelosis:** *B. thetaiotaomicron* modificó la naturaleza de la infección causada por Enteritidis S 1400 en ratas y redujo su gravedad general. En particular, las respuestas inflamatorias en el intestino delgado fueron limitadas, las cantidades de salmonella viable encontradas en el hígado y el bazo se redujeron

significativamente y las tasas de acreción del músculo esquelético fueron restauradas a alrededor de los niveles de control. Por tanto *B. thetaiotaomicron* tuvo efectos tanto localmente en el intestino como en tejidos sistémicos remotos.

5 Sin embargo, algunos aspectos de salmonelosis no fueron afectados por *B. thetaiotaomicron*. Las cantidades de Enteritidis en el tracto gastrointestinal y los ganglios linfáticos mesentéricos y la excreción fecal del patógeno no resultaron alterados. Además, la ampliación del intestino delgado (aumento de peso en seco y contenido de ADN, ARN y proteínas) asociada a la infección por Enteritidis también fue evidente en ratas a las que se había proporcionado *B. thetaiotaomicron* y Enteritidis. Esto sugiere que *B. thetaiotaomicron* no interfiere directamente en la salmonella en sí o que no bloquea sus efectos generales sobre el metabolismo hospedador. En cambio, la bacteria  
10 puede selectivamente modular las respuestas hospedador contra la infección, posiblemente dirigiéndose a aquellos que son potencialmente perjudiciales para la integridad del intestino.

15 Un número de cepas de bacterias ha demostrado recientemente dar protección parcial contra la infección por Enteritidis o Typhimurium. Algunas vierten el patógeno para sitios de anclaje o nutrientes en el intestino o producen compuestos bactericidas. Como resultado, reducen la cantidad de salmonella encontrada en el intestino y que llega a los ganglios linfáticos mesentéricos, hígado y bazo (Bernet Camard *et al.*, 1997; Hudault *et al.*, 1997; 2001; Hendriksson and Conway, 2001). Por el contrario, muchas tienen poco o ningún efecto sobre las cantidades de salmonella en el intestino. Sin embargo, como con *B. thetaiotaomicron*, todavía mejoran significativamente la infección patógena (Silva *et al.*, 1999; Lima Filho *et al.*, 2000; Schu *et al.*, 2000; Hendriksson and Conway, 2001; Maia *et al.*, 2001). Por tanto la protección proporcionada por estas últimas cepas es por mecanismos distintos a la  
20 exclusión competitiva o la secreción de compuestos bactericidas.

25 La Salmonella abre una brecha en el epitelio intestinal interfiriendo con el metabolismo celular, interacciones célula-célula y mecanismos de respuesta del hospedador (Darwin and Miller, 1999; Netea *et al.*, 2000; Eaves-Pyles, 2001; Gewirtz *et al.*, 2001; Lu and Walker, 2001; OHL and Miller, 2001). En particular, desencadenan una infiltración rápida de leucocitos polimorfonucleares en el tejido y provocan una inflamación aguda y una alteración severa del intestino (Madara, 1997; OHL and Miller, 2001). La infiltración neutrófila en el intestino es mediada por las quimiocinas quimiotácticas, como IL-8, que es secretada por las células epiteliales en respuesta a la infección patógena (McCormick *et al.*, 1995; Madara, 1997; Darwin and Miller, 1999; Fleckstein and Kopecko, 2001). La liberación de este quimiotáctico era elevado si las células epiteliales eran cultivadas con salmonella *in vitro* (McCormick *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2001). Por el contrario, su producción se reducía considerablemente si las células epiteliales  
30 eran cultivadas con salmonella y *B. thetaiotaomicron* en combinación (Campbell *et al.*, 2001).

35 Los niveles de Mieloperoxidasa en el tejido ileal y el contenido del intestino de las ratas a las que se proporcionó *B. thetaiotaomicron* y Enteritidis eran mucho más bajos que en muestras comparables de animales dosificados solamente con salmonella. Por lo tanto, las respuestas inflamatorias por lo general desencadenadas en el intestino por salmonella, aparentemente eran atenuadas si los animales también habían sido tratados con *B. thetaiotaomicron*. La bacteria puede, como se encuentra *in vitro* (Campbell *et al.*, 2001), bloquear la producción vinculada a salmonella de quimiocinas quimiotácticas por enterocitos epiteliales y así evitar el reclutamiento de neutrófilos en el tejido. Modulando esta respuesta a hospedador *in vivo*, *B. thetaiotaomicron* puede limitar el grado de inflamación intestinal y el daño que se produce como resultado de una infección y así preservar la integridad del  
40 intestino. Esto reduciría también la solicitud del intestino de nutrientes para apoyar la reparación (Klasing and Calvert, 1999) y permitir más ir a otros tejidos, tales como el músculo esquelético.

45 La salmonella drena hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, una vez que ha pasado por el epitelio intestinal (Kingsley and Baulmer, 2000). Entonces puede desaparecer de allí por los macrófagos o de manera alternativa irse de los ganglios linfáticos mesentéricos y extenderse a la sangre, el hígado y el bazo (Kingsley and Baulmer, 2000; Lu and Walker, 2001). Se detectó una cantidad significativa de Enteritidis en los ganglios linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo de ratas infectadas. El tratamiento de animales con *B. thetaiotaomicron* redujo considerablemente los niveles de patógeno viable encontrado en el hígado y el bazo. Sin embargo, no afectó a la cantidad de Enteritidis en los ganglios linfáticos mesentéricos. Por lo tanto, *B. thetaiotaomicron* no parece limitar la invasión y el drenaje de salmonella a este sitio, a pesar de su gran efecto en el metabolismo intestinal. Puesto que los niveles patógenos se redujeron en los tejidos sistémicos, esto puede indicar que el principal efecto protector de *B. thetaiotaomicron* surge a  
50 través de cambios en el metabolismo sistémico.

55 Las bacterias comensales son potentes inmuno-moduladores (Herias *et al.*, 1999; Talham *et al.*, 1999; Scharek *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*, 2001; Lu and Walker, 2001). En particular, el tratamiento de ratones con *Bifidobacterium lactis* parece mejorar su función inmunológica y capacidad de respuesta contra la salmonella (Schu *et al.*, 2000). La actividad fagocítica en sangre y células peritoneal, la capacidad de respuesta mitogénica de los linfocitos y la secreción de anticuerpos específicos de Typhimurium fueron elevadas. *B. thetaiotaomicron* puede tener efectos similares en el metabolismo sistémico. Cantidades más bajas de salmonella en el hígado y el bazo de ratas tratadas con *B. thetaiotaomicron* podría, por lo tanto, ser el resultado de una eliminación mejorada del patógeno de la sangre y los órganos internos.

60 También se encontraron fermentadores de lactosa (*E. coli*), aunque en cantidades bajas, en el hígado y el bazo de ratas infectadas con Enteritidis. Sin embargo, a diferencia de la salmonella, los niveles de estas bacterias no fueron

afectados por *B. thetaiotaomicron*. Por lo tanto, puede haber alguna selectividad en la eliminación bacteriana promovida por *B. thetaiotaomicron*. De manera alternativa, porque la *E. coli* se deriva de la flora normal de las ratas, puede no ser fácilmente reconocida como potencialmente perjudicial, aunque esté presente en sitios de tejido inadecuado.

- 5 *B. thetaiotaomicron* puede sin embargo reducir la propagación sistémica de salmonella actuando localmente en el intestino. Es generalmente aceptado que la salmonella se ancla al epitelio intestinal, invade a través del tejido, drena a los ganglios linfáticos mesentéricos y puede a continuación extenderse al hígado y al bazo (Kingsley and Baulmer, 2000). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que la propagación sistémica del patógeno puede producirse por una ruta alternativa. Los patógenos muestreados luminalmente por células dendríticas o en el subepitelio fagocitos
- 10 que expresan CD18 pueden transferirse directamente al hígado y al bazo, sin drenar a través del sistema linfático (Varquez-Torres *et al.*, 1999; Isberg and Barnes, 2000; Rescigno *et al.*, 2001). Como resultado, la salmonella encontrada en el hígado y el bazo es probable que derive de las dos rutas de absorción.

15 El reclutamiento de estos fagocitos probablemente será mediada por quimiocinas quimiotácticas producidas por las células epiteliales (Izadpanah *et al.*, 2001; Kellennan and McEvoy, 2001). Puesto que *B. thetaiotaomicron* parece limitar el reclutamiento de neutrófilos y la inflamación en el intestino impidiendo la secreción de las quimiocinas quimiotácticas necesarias (Campbell *et al.*, 2001), también puede eliminar las quimiocinas necesarias para reclutar células dendríticas o fagocitos que expresan CD18 y como resultado evitar o limitar la absorción de salmonella por este sistema.

### Resumen

- 20 *B. thetaiotaomicron* administrada por vía oral redujo la gravedad de la Enteritidis en ratas.

Se redujo considerablemente la cantidad de salmonella viable en el hígado y el bazo, las tasas de acreción del músculo esquelético fueron restauradas a valores normales y fueron atenuadas las respuestas inflamatorias en el intestino delgado. Esto fue debido posiblemente a la mayor capacidad de respuesta inmune y a la rápida eliminación de la salmonella en sitios remotos, como el hígado y el bazo. Sin embargo, también fue, por lo menos en parte,

25 consecuencia de los efectos locales de la bacteria en el intestino. El reclutamiento de neutrófilos y la inflamación en el intestino fue impedido o retrasado por la acción de *B. thetaiotaomicron*. Puede también haber bloqueado la absorción directa de salmonella en los fagocitos al hígado y al bazo.

### Referencias

1. E. Cario *et al.* J Immunol. 164, 966 (2000).
- 30 2. A. T. Gewirtz, T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, J. L. Madara, J". Immunol. 167, 1882 (2001).
3. B. A. McCormick, S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller, J. L. Madara, J. Cell Biol. 123, 895 (1993).
4. L. Hang *et al.*, J. Immunol. 162, 3037 (1999).
5. S. Ghosh, M.J. May, E. B. Kopp Annu. Rev. Immunol. 16, 225-260 (1998).
6. M.J. May, S. Ghosh. Immunol. Today (1998).
- 35 7. Q. Cheng *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 13551 (1994).
8. P.J. Chiao, S. Miyamoto, I.M. Verma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 28-32. (1994).
9. P. Renard *et al.* J. Biol. Chem. 275, 15193 (2000).
10. A. S. Neish *et al.*, Science 289, 1560 (2000).
11. T. Meyer-ter-Vehn, A. Covacci, M. Kist, H. L. Pahl, J. Biol. Chem. 275, 16064 (2000).
- 40 12. J. Raingeaud *et al.*, J. Biol. Chem. 270, 7420 (1995).
13. Nakajima *et al.* Gastroenterology 120, 460 2001.
14. E.D. Rosen, B.M. Spiegelman. J". Biol. Chem. 276, 37731-37734 (2001).
15. C. G. Su *et al.*, J. Clin. Invest. 104, 383 (1999).
16. C. F. Bunn *et al.*, Mol. Endocrinol. 15, 512 (2001).
- 45 17. M. Ricote, J. T. Huang, J. S. Welch, C. K. Glass, J. Leukoc. Biol. 66, 733 (1999).
18. P. Delerive *et al.*, J. Biol. Chem. 274, 32048 (1999).

19. M. Gurnell *et al.*, J. Biol. Chem. 275, 5754 (2000).
20. S. D. Savkovic, A. Koutsouris, G. Wu, G. Hecht, Biotechniques 29, 514 (2000).
21. A. Birbach *et al.* J. Biol. Chem. 277, 10842 (2002).
22. J. Schmid *et al.* J. Biol. Chem. 275, 17035 (2002).
- 5 23. Y. Zhao *et al.*, J Biol. Chem. 277, 30031-30039 (2002).
24. K. Madsen *et al.*, Gastroenterology 121, 580 (2001).
25. CA. Parkos *et al.*, J. Clin. Invest. 88, 1605 (1991).
26. Allen-Vercoe *et al.*, J Med Microbiol 48, 771-780 (1999).
27. Bardocz, S. *et al.*, Br J Nutr 76, 613-626 (1996).
- 10 28. Bernet-Camard *et al.*, Appl Environ Microbiol 63, 2747-2753 (1997).
29. Bovee-Oudenhoven *et al.*, Gastroenterology 113, 550-557 (1997).
30. Bovee-Oudenhoven *et al.*, J Nutr 129, 607-612 (1999).
31. Bry, L *et al.*, Science 273, 1380-1383 (1996).
32. Bryant, M.P. Am J Clin Nutr 25, 1324-1328 (1972).
- 15 33. Carter, J Exp Med 139, 1189-1203 (1974).
34. Cebra, J. J., Am J Cl in Nu tr 69, 1046S-1051S (1999).
35. Chang, J. *et al.*, J" Appl Bacteriol 77, 709-718 (1994).
36. Collins, C.H.L.P.M. (1989) Microbiological Methods Butterworths, London.
37. Darwin, K.H. *et al.*, Clin Microbiol Rev 12, 405- 428 (1999).
- 20 38. Eaves-Pyles, T. *et al.*, J Immunol 166, 1248-1260 (2001).
39. Ewen, S.W. *et al.*, FEMS Immunol Med Microbiol 18, 185-192 (1997).
40. Filho-Lima, J.V. *et al.*, J Appl Microbiol 88, 365-370 (2000).
41. Fleckenstein, J.M. *et al.*, J" Clin Invest 107, 27-30 (2001).
42. Friman, G. *et al.*, Scand J Infect Dis 16, 111- 119 (1984).
- 25 43. Gewirtz, A.T. *et al.*, J Immunol 167, 1882-1885 (2001).
44. Grant, G. (1996) Management of Animal Experiments. COST 98. Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets (Bardocz, S; Pusztai.A., ed) pp. 44-51, European Commission, Brussels.
45. Grant, G. *et al.*, Pancreas 20, 305-312 (2000).
46. Havelaar, A.H. *et al.*, J Appl Microbiol 91, 442- 452 (2001).
- 30 47. Henderson, S.C. *et al.*, Infect Immun 67, 3580- 3586 (1999).
48. Henriksson *et al.*, J Appl Microbiol 90, 223-228 (2001).
49. Herias *et al.*, Scand J Immunol 48, 277-282 (1998).
50. Herias, M.V. *et al.*, Clin Exp Immunol 116, 283- 290 (1999).
51. Hooper, L.V. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 9833-9838 (1999).
- 35 52. Hooper, L.V. *et al.*, Curr Opin Microbiol 3, 79- 85 (2000).
53. Hooper, L.V. *et al.*, Glycobiology 11, 1R-10R (2001).
54. Hooper, L.V. *et al.*, Science 291, 881-884 (2001).

55. Hudault, S. *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 63, 513-518 (1997).
56. Hudault, S. *et al.*, *Gut* 49, 47-55 (2001).
57. Isberg, R.R. *et al.*, *Trends Microbiol* 8, 291-293 (2000).
58. Islam, A.F. *et al.*, *Infect Immun* 68, 1-5 (2000).
- 5 59. Isolauri, E. *et al.*, *Am J Clin Nutr* 73, 444S- 450S (2001).
60. Izadpanah, A. *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G710-G719 (2001).
61. Kellermann, S.A. *et al.*, *J Immunol* 167, 682-690 (2001).
62. Kingsley, R.A *et al.*, *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells* (Oelschlaeger, T.A. and Hacker, J., eds) pp. 321-342, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2000).
- 10 63. Klasing, K.C.C.C. *Protein Metabolism and Nutrition* (Lobely, G.E; White, A. and MacRae, J.C., eds) pp. 253-264, Wageningen Pers, Wageningen (1999).
64. Lang, CH. *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E1133-E1143 (2000).
65. Lopez-Boado, Y. S. *et al.*, *J Cell Biol* 148, 1305- 1315 (2000).
66. Lu, L. *et al.*, *Am J Clin Nutr* 73, 1124S-1130S (2001).
- 15 67. Lu, S. *et al.*, *Infect Immun* 67, 5651-5657 (1999).
68. Madara, J.L. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 3, 57-62 (1997).
69. Maia, O.B. *et al.*, *Vet Microbiol* 79, 183-189 (2001).
70. McCormick, B.A. *et al.*, *J Cell Biol* 131, 1599- 1608 (1995).
71. Miles, A. A. *et al.*, *J Hyg* 38, 749 (1993).
- 20 72. Naughton, P.J. *et al.*, *FEMS Immunol Med Microbiol* 12, 251-258 (1995).
73. Naughton, P.J. *et al.*, *J Appl Bacteriol* 81, 651- 656 (1996).
74. Naughton, P.J. *et al.*, *J Med Microbiol* 50, 191- 197 (2001).
75. Netea, M.G. *et al.*, *J Immunol* 164, 2644-2649 (2000).
76. Noack, J. *et al.*, *J Nutr* 130, 1225-1231 (2000).
- 25 77. Pier, G.B. *et al.*, *Infect Immun* 60, 4768-4776 (1992).
78. Rescigno, M. *et al.*, *Nat Immunol* 2, 361-367 (2001).
79. Salminen, S. *et al.*, *Br J Nutr* 80 Suppl 1, S147- S171 (1998).
80. Scharek, L. *et al.*, *Immunobiology* 202, 429-441 (2000).
- 30 81. Schechter, L.M. *et al.*, *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells*. (Oelschlaeger, T.A.H.J., ed) pp. 289-320, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2000).
82. Shu, Q. *et al.*, *Med Microbiol Immunol (Berl)* 189, 147-152 (2001).
83. Silva, A.M. *et al.*, *J Appl Microbiol* 86, 331-336 (1999).
84. Snel, J. *et al.*, *Can J Microbiol* 44, 1177-1182 (1998).
85. Tuccilli, A.F. *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G1298-G1306 (2000).
- 35 86. Talham, G.L. *et al.*, *Infect Immun* 67, 1992-2000 (1999).
87. Teng, L.J. *et al.*, *J Clin Microbiol* 38, 1672- 1675 (2000).
88. Van Der Waaij, D. *The Germ-free Animal in Biomedical Research* (Coates, M.E.Gustafsson, B.E., ed) pp. 155-165, Laboratory Animals Ltd, London (1984).

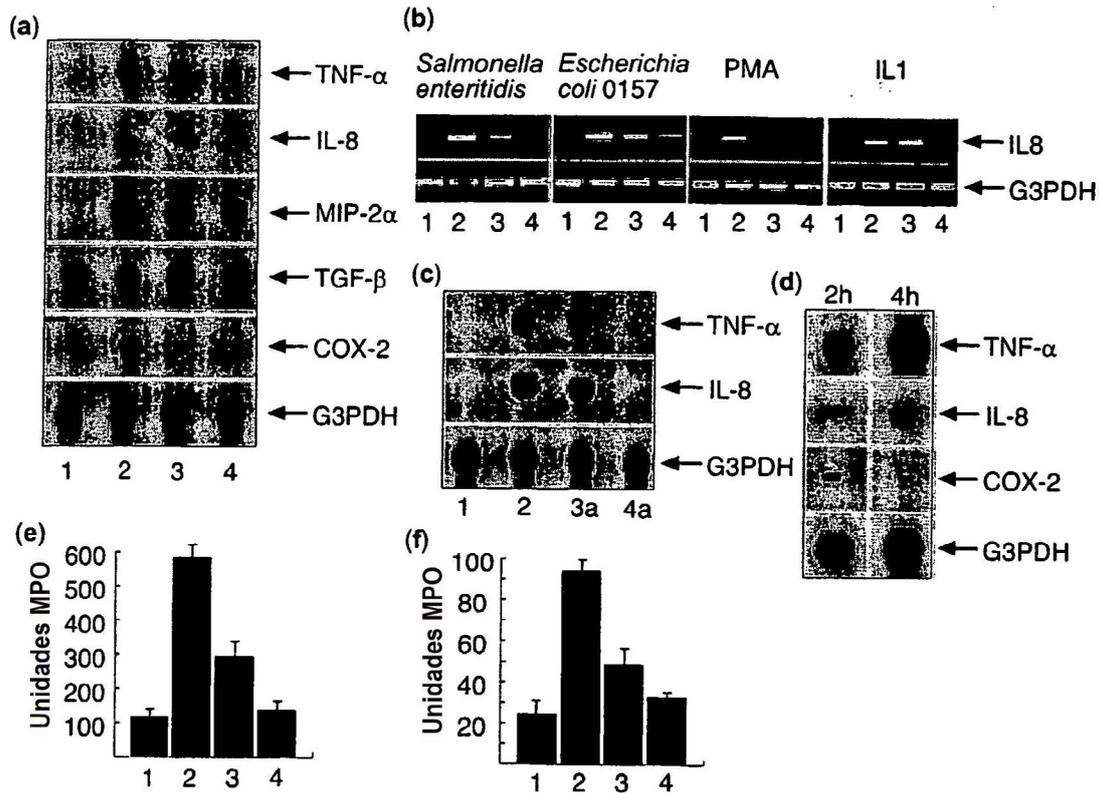
89. Vassiloyanakopoulos, A. P. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7676-7681 (1998).
90. Vazquez-Torres, A. *et al.*, Nature 401, 804-808 (1999).
91. Yurdusev, N. *et al.*, Can J Microbiol 33, 226-231 (1987).
92. Yurdusev, N. *et al.*, Infect Immun 57, 724-731 (1989).
- 5 93. Zimmerman, B.J. *et al.*, Am J Physiol 259, H390- H394 (1990).

## REIVINDICACIONES

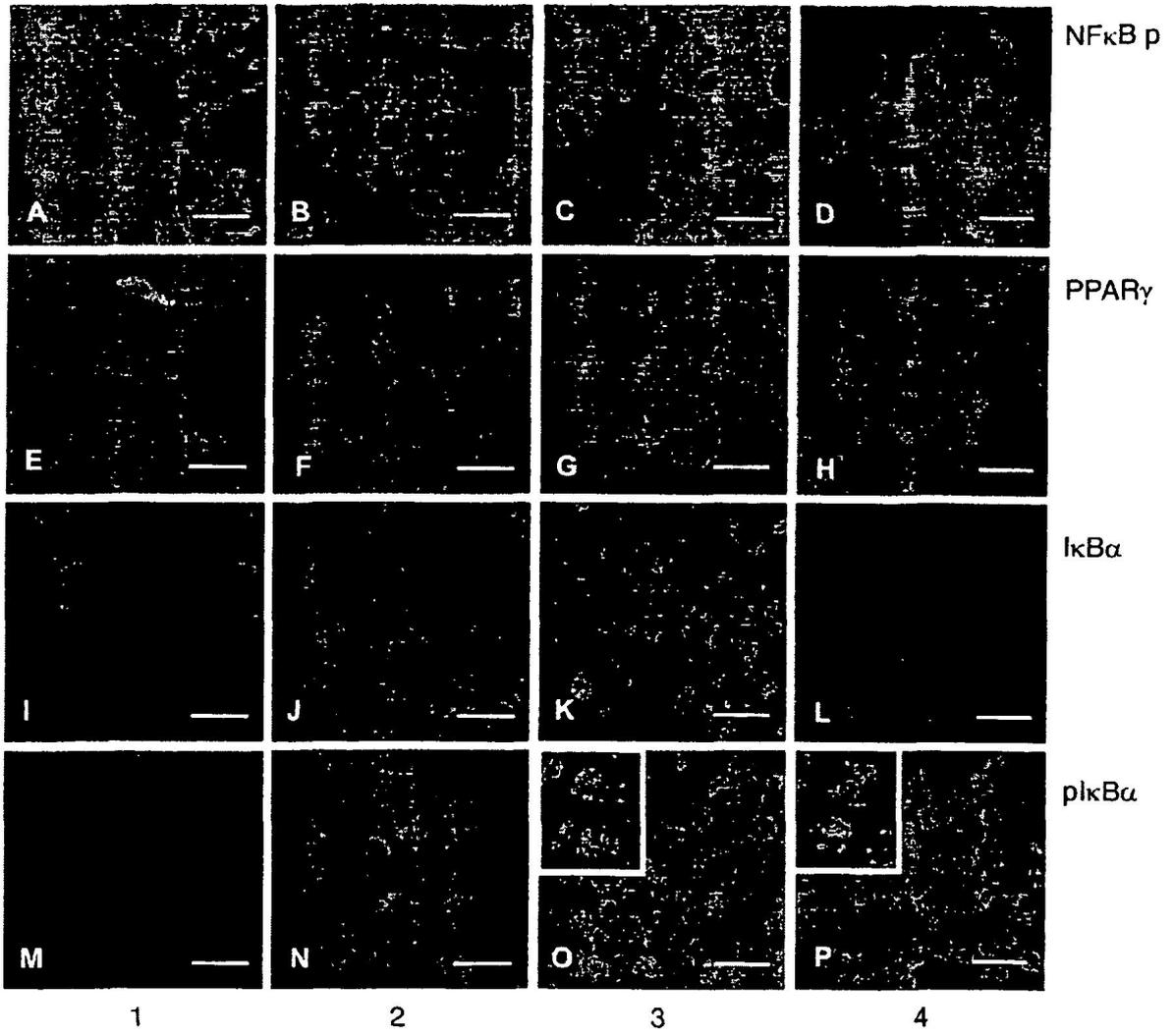
1. Un ensayo para seleccionar un medicamento candidato para el tratamiento de enfermedades inflamatorias debido a la producción de citocinas, dicho ensayo comprendiendo:
- 5 a) exponer dicho medicamento candidato a células intestinales; y
- b) analizar el efecto de dicho medicamento candidato, siendo dicho efecto seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 -la variación de la importación o exportación nuclear de factores de transcripción de la familia NF-kB;
- la alteración de la actividad de transcripción de factores de transcripción de la familia NF-kB;
- 10 -la acetilación de histonas diferencial de p65 (RelA);
- la variación de la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de las células; y
- destrucción nucleoplasmática de PPAR $\gamma$ .
2. El ensayo de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de la selección de un medicamento candidato que demuestra por lo menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 -el aumento de la exportación nuclear o la disminución de la importación nuclear de factores de transcripción de la familia NF-kB;
- la alteración de la actividad de transcripción de factores de transcripción de la familia NF-kB;
- la acetilación de histonas diferencial de p65 (RelA);
- el aumento de la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de las células; y
- 20 -destrucción nucleoplasmática de PPAR $\gamma$ .
3. El ensayo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el efecto del medicamento candidato analizado es la exportación nuclear del factor de transcripción de la familia NF-kB.
4. El ensayo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el efecto del medicamento candidato analizado es la variación de la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de las células.
- 25 5. El ensayo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de analizar el efecto del medicamento candidato en el nivel de uno o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en TNF- $\alpha$  IL-8, MIP-2 $\alpha$  y Cox-2.
6. El ensayo de la reivindicación 5, en el que el efecto del medicamento candidato analizado es la variación del nivel de IL-8 y/o MIP-2 $\alpha$ .
- 30 7. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células intestinales se obtienen de una línea celular mantenida en cultivo celular.
8. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha línea celular es una línea celular Caco-2.
9. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho ensayo se realiza *in vivo* en un animal.
10. El ensayo de la reivindicación 9, en el que dicho animal es un mamífero.
- 35 11. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ensayo se lleva a cabo en presencia de bacterias patógenas conocidas.
12. El ensayo de la reivindicación 11, en el que dichas bacterias patógenas conocidas son *Salmonella sp.*
13. El uso de *Bacteroides thetaiotaomicron* para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria causada, por lo menos en parte, por una respuesta inflamatoria de células intestinales.
- 40 14. Una composición como la que se reivindica en la reivindicación 13, en la que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad de Crohn; Síndrome del Intestino Irritable; artritis reumatoidea; síndrome de inmunodeficiencia; caquexia; esclerosis múltiple y proliferación de queratinocitos.
15. Una composición como la que se reivindica en la reivindicación 14, en la que la enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

16. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que la composición se prepara para su administración a un paciente por medio de un producto alimentario o un supositorio.
17. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que la composición se prepara para su administración oral.
- 5 18. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en la que *Bacteroides thetaiotaomicron* está viva.
19. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, que es capaz de alterar la actividad de transcripción de NF- $\kappa$ B.
- 10 20. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, que es capaz de aumentar la cantidad de complejos PPAR $\gamma$ /RelA en el citoplasma de las células.
21. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en la que la composición es capaz de devolver el sistema inmune de un mamífero a la homeostasis y de mantenerla.
22. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en la que *Bacteroides thetaiotaomicron* se selecciona según el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 15 23. Una composición como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en la que la enfermedad inflamatoria se asocia a la producción de una citocina inflamatoria.
24. Uso de *Bacteroides thetaiotaomicron* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria causada, por lo menos en parte, por una respuesta inflamatoria de células intestinales.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



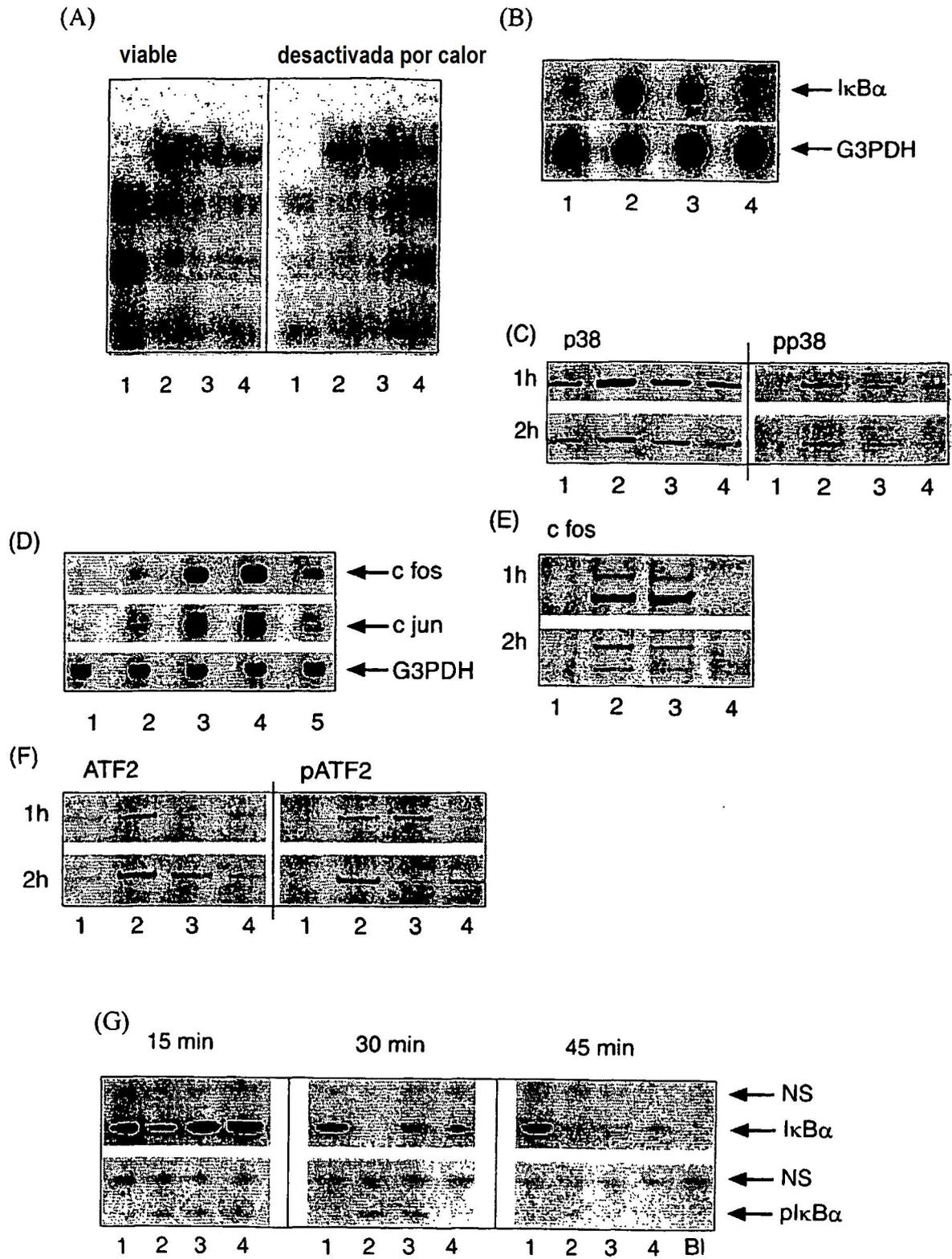


Fig. 3

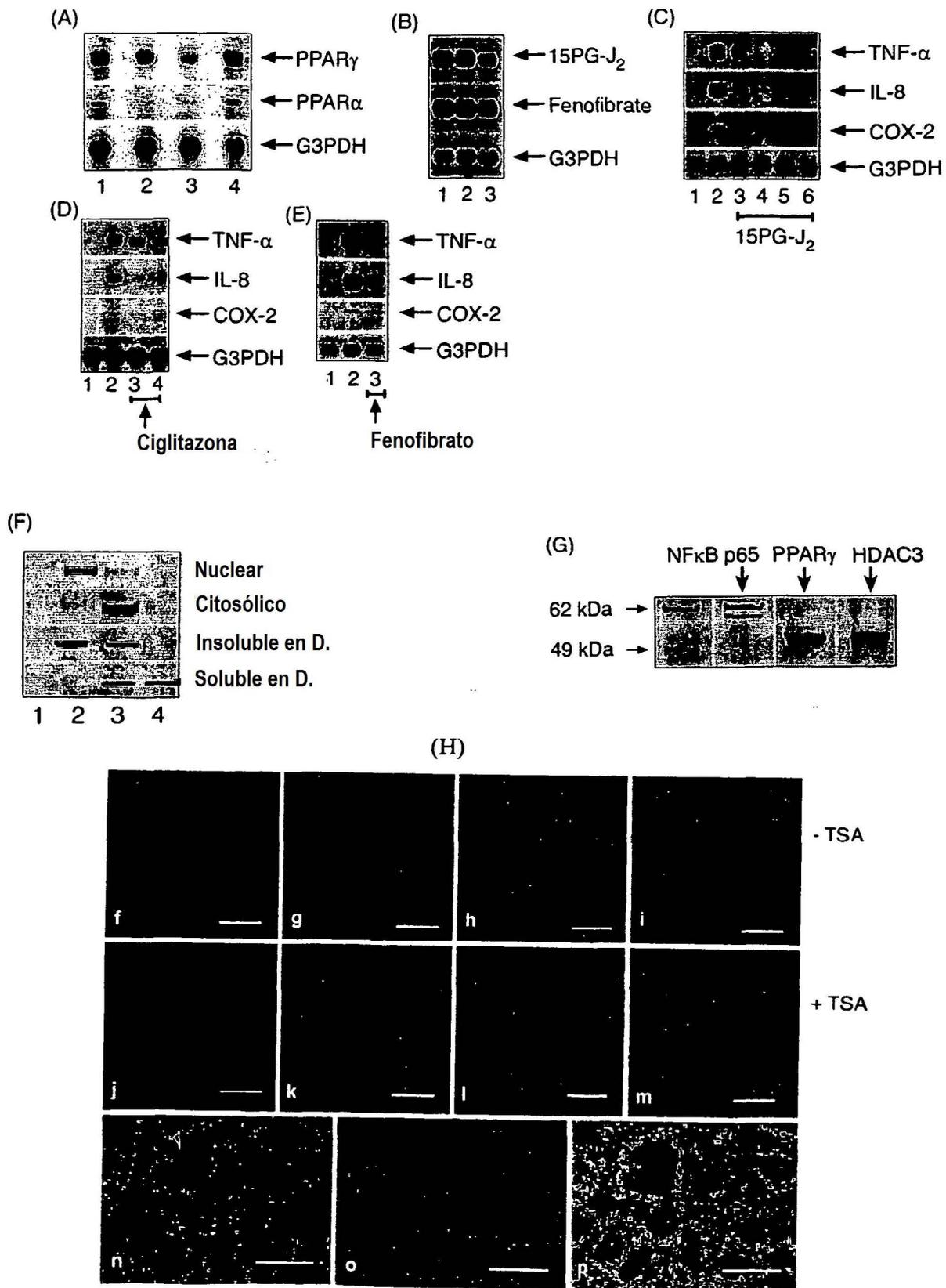
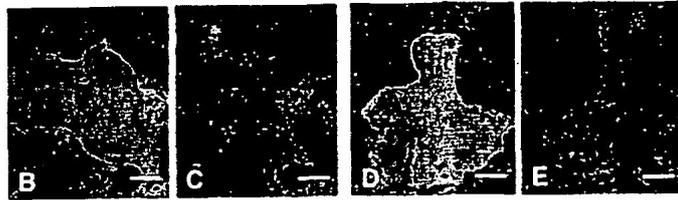


Fig. 4

(D)



(E)

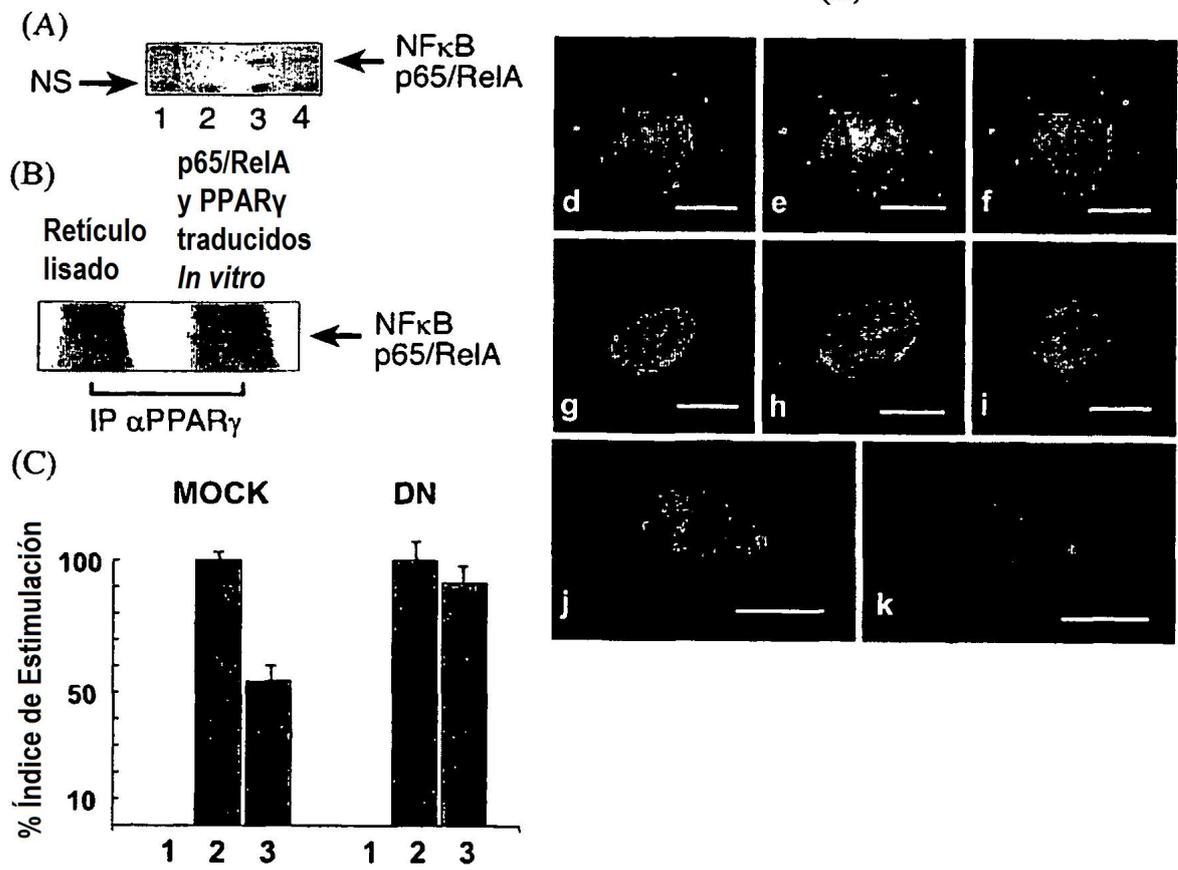
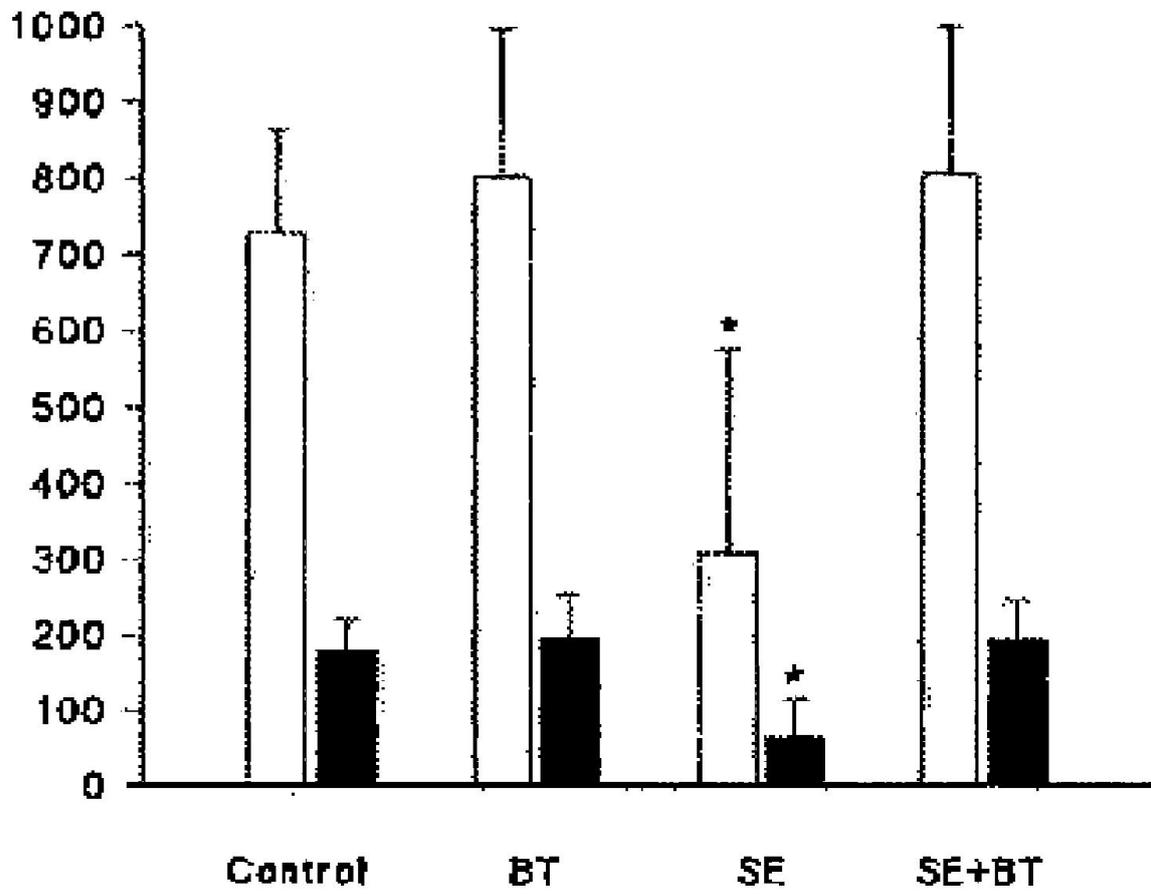
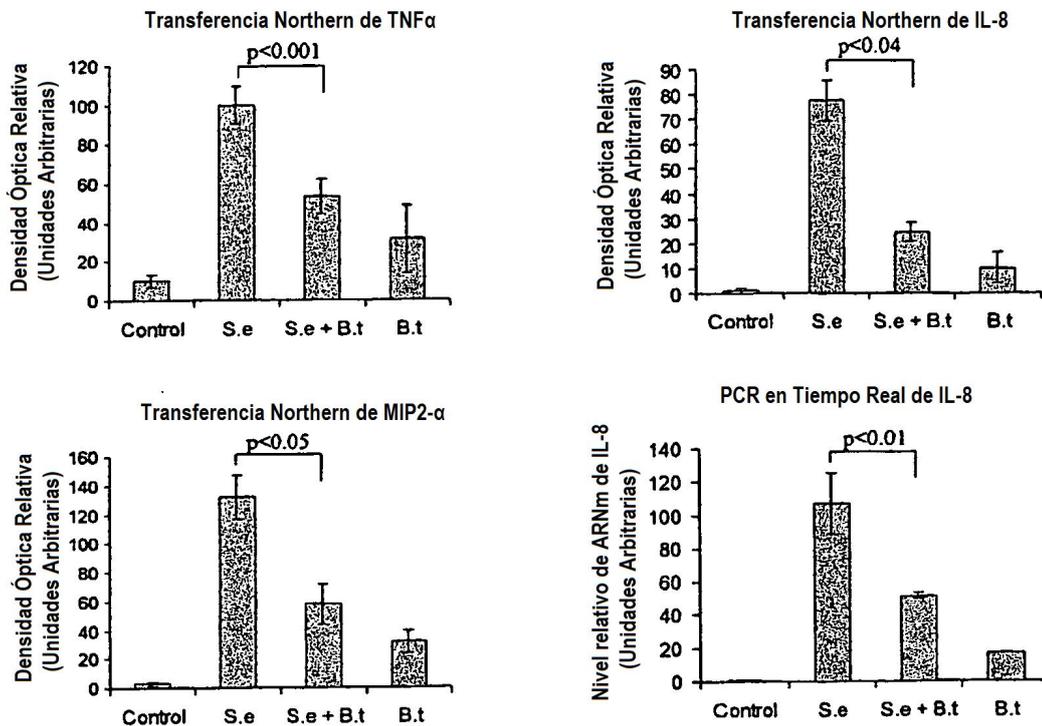


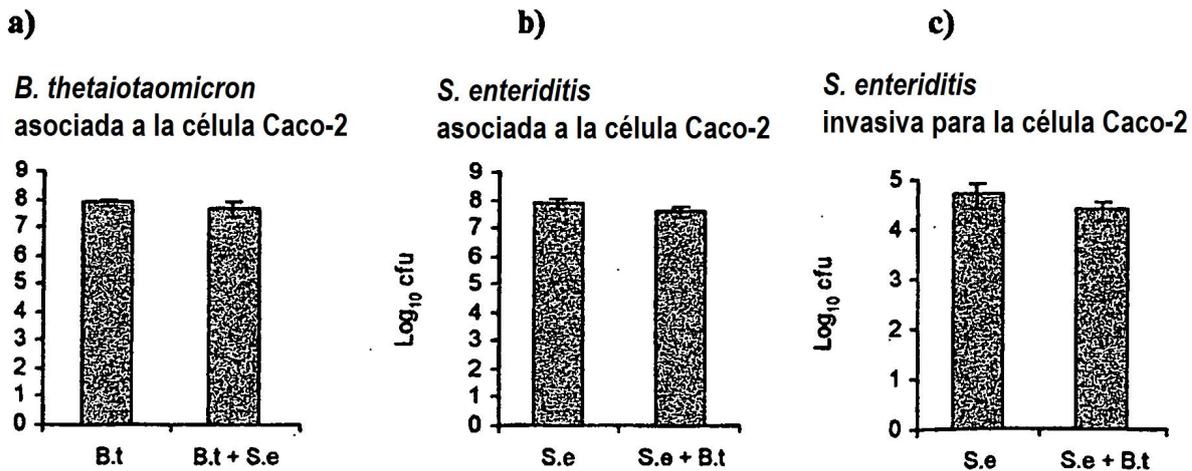
Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

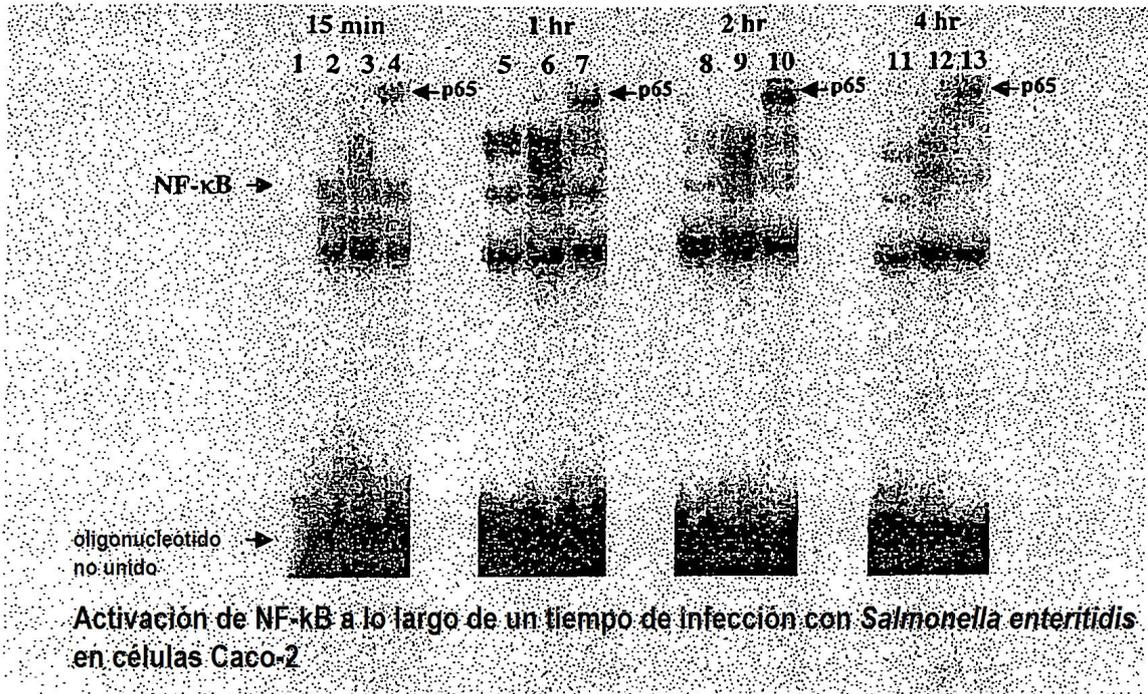


Fig. 9A

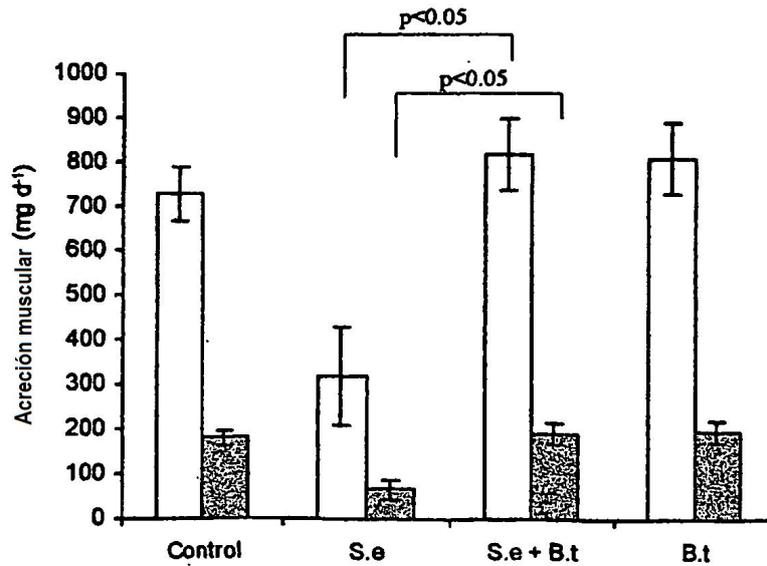
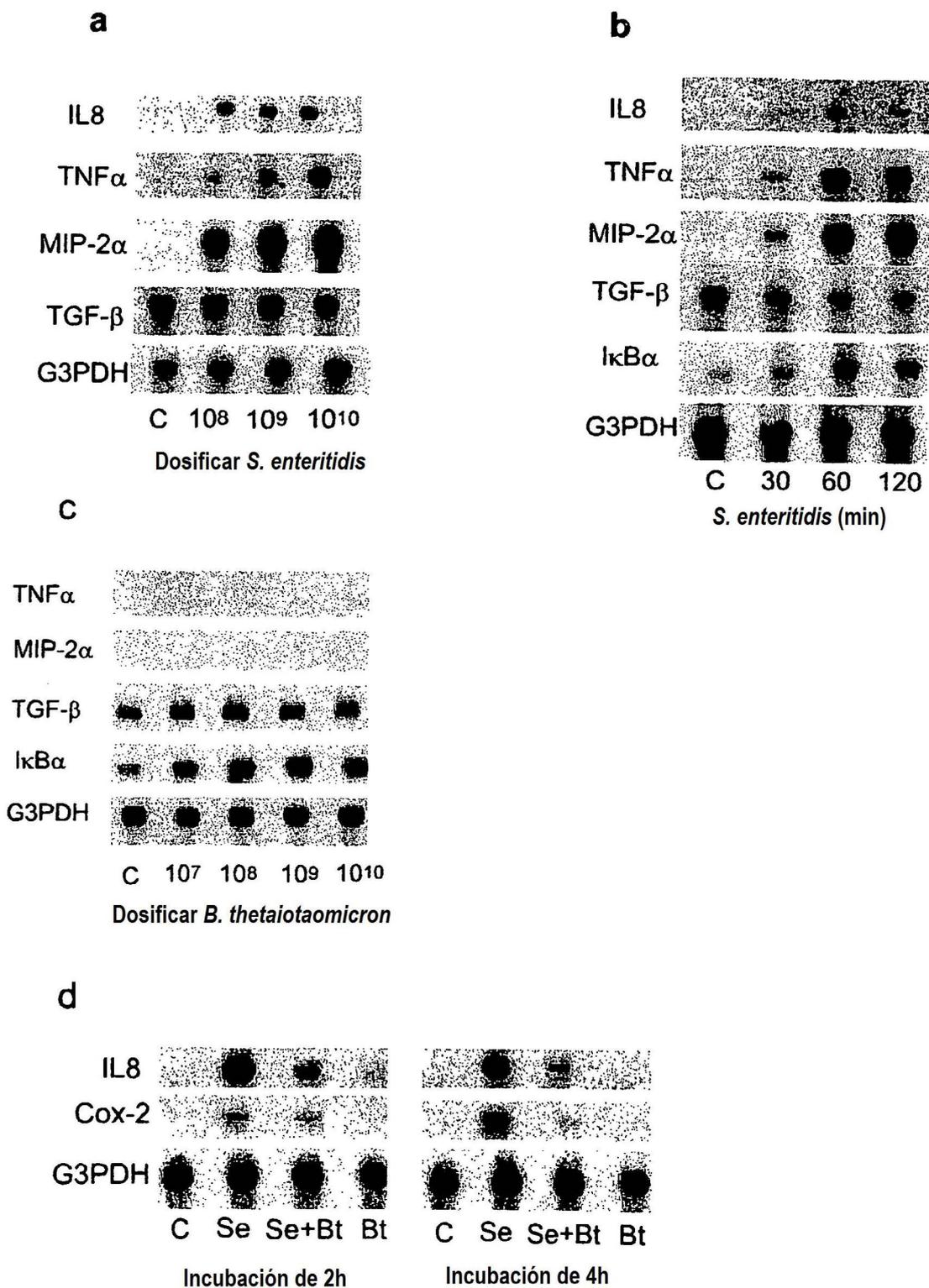


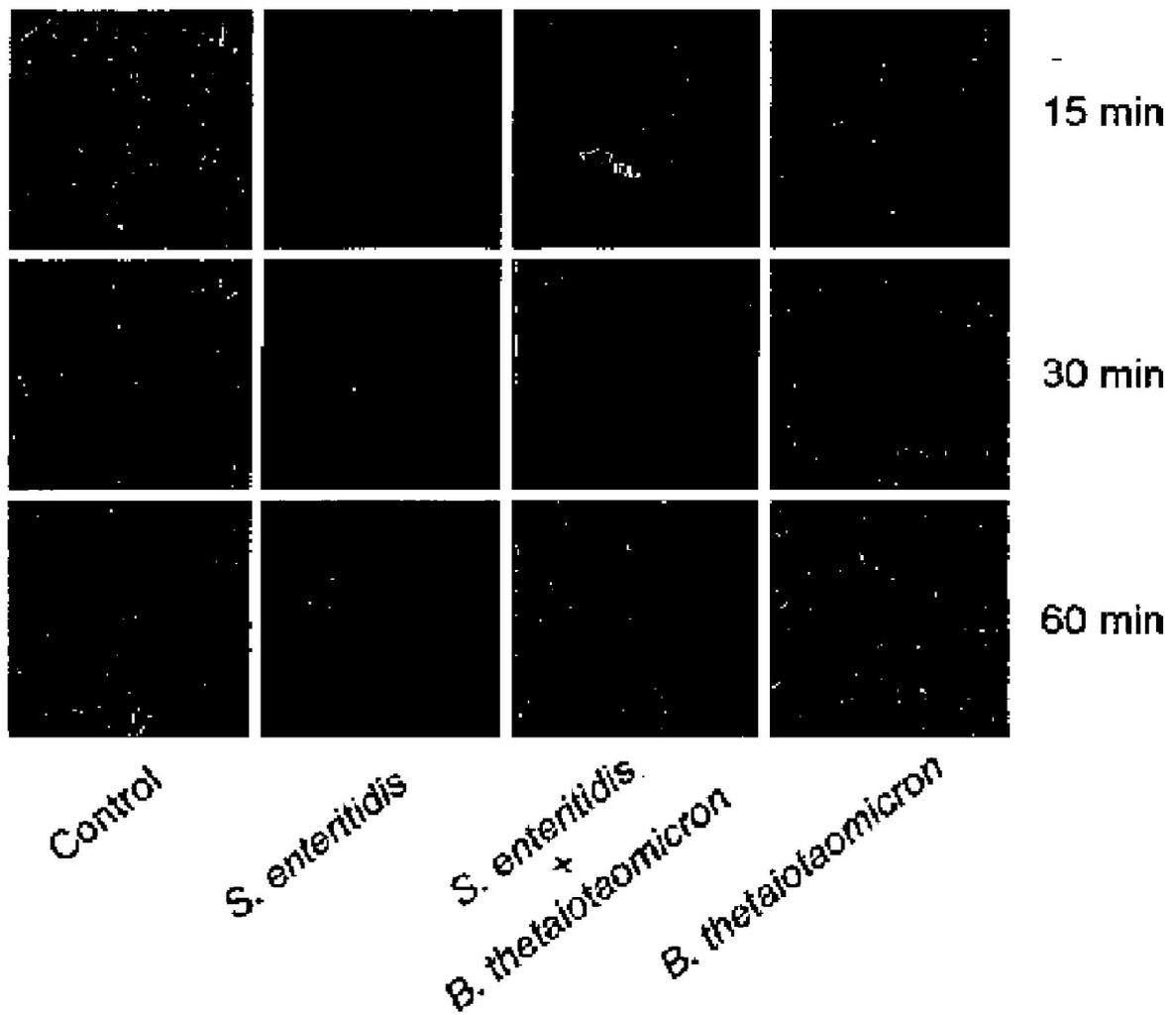
Fig. 10

**Fig. 9B**                      **Transferencias Northern**  
 (dosis de ejemplo y datos de un periodo de tiempo)



**Fig. 9C**

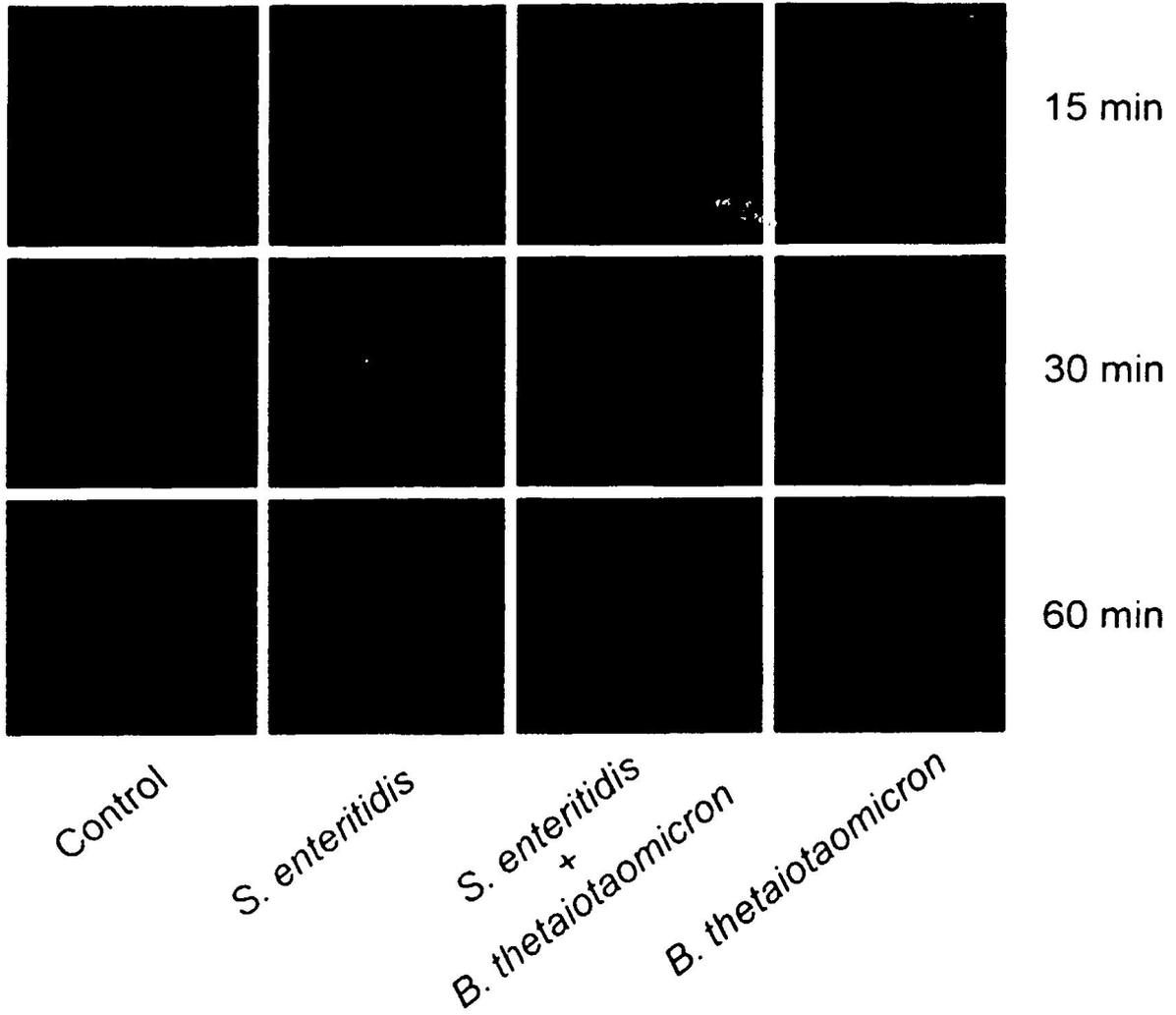
**NF $\kappa$ B p65**



**Nota: datos de 2 horas ilustrados en forma de manuscrito**

Fig. 9D

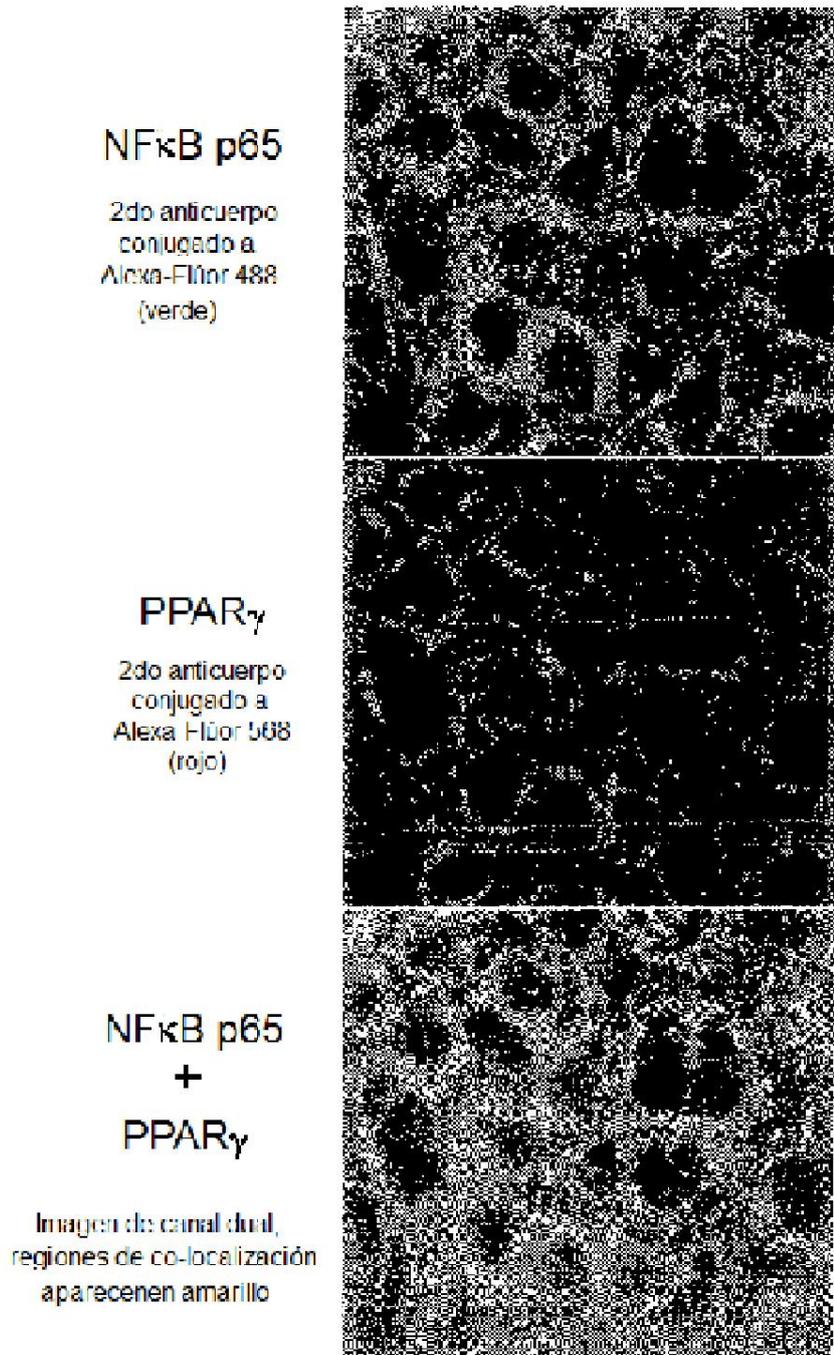
PPAR $\gamma$

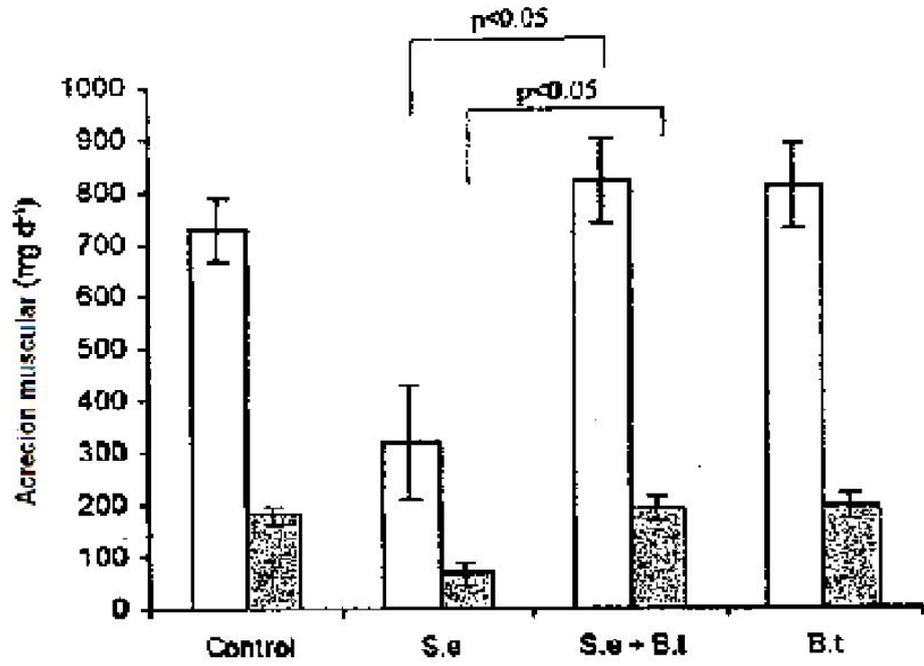


Nota: datos de 2 horas ilustrados en forma de manuscrito

Fig. 9F

Co-etiquetado de NF $\kappa$ B p65 y PPAR $\gamma$  en células Caco2 seguidas de 2h de exposición a B.tetaiotamicron y S. enteritidis





**Fig. 10**



**Fig. 11**