

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

**Programa Oficial de Posgrado en Medicina Clínica Y Salud
Pública**



**Obesidad, hiperleptinemia e inflamación intestinal:
estudios en modelos animales.**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

Belén Rivero Gutiérrez

Bajo la dirección de los Doctores

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

Antonio Zarzuelo Zurita

Granada, 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis doctorales

Autora: Belén Rivero Gutiérrez

ISBN: 978-84-9125-590-1

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42974>

D. Julio J. Gálvez Peralta, Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, certifica que la tesis doctoral titulada: "Obesidad, hiperleptinemia e inflamación intestinal: estudios en modelos animales", ha sido realizada por la Lda. en Farmacia Belén Rivero Gutiérrez.

Y a los efectos legales que correspondan se firma la siguiente constancia en Granada a

Dr. Julio J. Gálvez Peralta

La doctoranda Belén Rivero Gutiérrez y los directores de la tesis, Fermín Sánchez de Medina López-Huertas y Olga Martínez Augustin. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 14 de diciembre de 2015

Director/es de la Tesis

Fdo.: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Fdo.: Olga Martínez Augustin

Doctoranda.

Fdo.: Belén Rivero Gutiérrez

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	9
SUMMARY.....	15
1. INTRODUCTION.....	17
2. AIMS	19
3. METHODS	19
4. RESULTS AND DISCUSSION	19
5. CONCLUSIONS	21
INTRODUCCION.....	23
1. OBESIDAD	25
1.1 Generalidades.....	25
1.2 Etiología.....	26
1.3. Comorbilidades.....	28
1.4 El tejido adiposo como órgano endocrino.....	30
1.5. Inmunología de la obesidad	38
2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	47
2.1. Generalidades.....	47
2.2. Etiología.....	52
2.3. Inmunología de la EII.....	61
3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD EN LA EII.....	73
3.1. Introducción.....	73
3.2. Salud intestinal y obesidad.....	74
3.3. Tejido adiposo mesentérico en la EII	80
3.4 Acciones de la leptina en el tracto gastrointestinal	87

OBJETIVOS.....	97
MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
1. REACTIVOS.....	103
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS ANIMALES	103
2.1. Inducción de colitis aguda en ratas Zucker por ácido trinitrobenzeno sulfónico o TNBS.	103
2.2. Estudio del efecto de la administración de leptina en un modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J inducido por sulfato de dextrano sódico (DSS)...	104
3. ESTUDIO DEL ESTATUS INFLAMATORIO.	106
3.1 Estudio del estado inflamatorio en general.	106
3.1.2.1. Determinación de nitratos y nitritos en plasma.	107
3.2 Evaluación del daño y la inflamación intestinal	107
3.3 Experimentos ex vivo.....	115
4. EVALUACIÓN DEL ESTADO METABÓLICO	118
4.1. Hemograma y estudio hematológico.....	118
4.2. Citometría de flujo.....	118
4.3. Evaluación de parámetros plasmáticos.	119
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	120
RESULTADOS	123
1. Inducción de colitis aguda en ratas Zucker por TNBS.	125
2. Estudio del efecto de la administración de leptina en el modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J por DSS.	141
DISCUSIÓN	165
CONCLUSIONES.....	183
CONCLUSIONS	187

ANEXOS	191
INDICE DE ABREVIATURAS	193
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Overweight and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that may impair health. WHO describes obesity as one of the most blatantly visible, yet most neglected, public-health problems that threatens to overwhelm both more and less developed countries. Overall, about 13% of the world's adult population (11% of men and 15% of women) were obese in 2014, and 39% of adults aged 18 years and over (38% of men and 40% of women) were overweight.

In the last decades, obesity and autoimmune diseases, including inflammatory bowel disease (IBD), have experienced a dramatic increase in Western countries, following the same outbreak. The involvement of environmental factors is strongly suspected to explain this rise. Since the exciting discovery of the secretory properties of adipose tissue, the relationship between obesity and autoimmunity and the understanding of the underlying mechanisms have become of major interest. Indeed, the fat tissue has been found to produce a wide variety of "adipokines", involved in the regulation of numerous physiological functions, including the immune response.

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two idiopathic and major inflammatory diseases: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis. Both forms of IBD significantly impair quality of life, and require prolonged medical and/or surgical interventions. What makes it particularly challenging is its still unknown cause, its unpredictable presentations and symptoms, the less than optimal treatments, and a rise in its incidence and prevalence in many areas of the world.

Obesity has previously been considered to be uncommon in IBD. As the prevalence of obesity has increased worldwide, this epidemic has also influenced the IBD patients population. Moreover, mesenteric adipose depots, so-called "creeping fat" have long been recognized as hallmarks of CD, its extent being correlated with the severity of intestinal inflammation. Due to the pro-inflammatory state induced by the adipose tissue, it is necessary to clarify its impact on disease progression. Studies on this topic are unfortunately rare.

Recently, increased attention has been paid to the link between gut microbial composition, intestinal permeability and obesity. Gut microbiota is a source of endotoxins whose increase in plasma is related to obesity and insulin

resistance through increased intestinal permeability in animal models. The proper functioning of the intestinal barrier is essential to avoid the excessive translocation of inflammatory molecules (eg, LPS) to the circulation. It is reported that microbiota can influence the integrity of intestinal epithelium and the tonus of mucosal inflammation, which, in turn, can affect intestinal permeability properties that are used to evaluate dysfunctions of the gastrointestinal barrier.

Leptin, a molecule that is critical in the regulation of energy balance, body weight, and reproductive function, is a strong regulator of T cell function. As part of its immune-modulating function, it is able to increase activation and proliferation of monocytes and T-cells and mediates homeostasis in a variety of immune cells. This is one of many examples of redundancy and of the overlapping roles of molecules within the neuroendocrine and immune systems. Leptin is part of the helical cytokine family along with interleukin (IL-) 6, IL-12, and IL-15, its receptor (LepR) belonging to the group of class I cytokine receptors, which includes gp-130, the common signal transducing component for the IL-6 related family of cytokines. The long form of the receptor (LepRb) contains all canonical signaling sites, whereas the short forms lack much of the intracellular domain and capacity to signal. LepRb is expressed in numerous cell types, including neurons, intestinal epithelial cells (IECs), and immune cells, such as macrophages, T cells, natural killer cells and polymorphonuclear cells. Leptin is expressed particularly in adipose tissue and to a lesser extent in other tissues such as muscle, stomach, and placenta. Recent reports have shown that leptin secreted by the gastric mucosa is not fully degraded by proteolysis and can reach the intestine in an active form able to control the expression of sodium/glucose and peptide transporters on intestinal epithelial cells and also may stimulate gut mucosal cell proliferation. Therefore, it may be speculated that leptin displays a dual nature: as a growth factor for the intestine, involved in the absorption of carbohydrates and proteins and cell proliferation on the one hand, and as a mediator of the intestinal inflammation induced by T lymphocytes on the other.

Thus, further research into the cellular targets of leptin and the downstream effector functions mediated through LepR are critical in understanding how leptin functions outside of the neuroendocrine axis and affects host' susceptibility to disease.

2. AIMS

Based on all the above, we proposed 3 main objectives in this doctoral thesis:

1. To assess the burden of obesity in the development of acute experimental colitis in the Zucker rat model, which is characterized by its leptin resistance.
2. To describe the role of leptin in intestinal inflammation in mice with a non-altered leptin signaling.
3. To set up a more suitable approach to evaluate protein loading control in Western blotting as alternative to housekeeping protein when pathological conditions such as obesity or inflammation can disrupt the normal amount of housekeeping reference.

3. METHODS

To carry out these objectives, we use a number of techniques, including tissue culture techniques, real time PCR, histology techniques, flow cytometry, Ussing chambers, Western Blot, ELISA as well as experimental models of colitis (TNBS, DSS) and obesity (Zucker rat).

4. RESULTS AND DISCUSSION

The obese Zucker rat, which is commonly used as genetic model of obesity because of its leptin resistance, was selected to assess obesity consequences in the development of TNBS-induced acute model of colitis. Overall, obese Zucker rats seemed to be less inflamed than lean rats, showing lower levels of colonic myeloperoxidase (MPO) activity, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), as well as downward trend in gamma interferon (IFN γ), IL-1 β and IL-17A colonic expression and less phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-(STAT-) 3. Surprisingly, the increase of forkhead box P3 (Foxp3) expression was not correlated with IL-10 expression levels in colonic tissue. Obese Zucker rats showed less pronounced weight loss but it must be taken into account that energy expenditure is reduced in this model. Actually, caloric intake was the same in lean and obese Zucker rats, and absolute weight loss was also identical (34 g). However, all of this was accompanied by an increase of colonic thickening and intestinal permeability.

Besides, the overall appearance of obese rats was worse than that exhibited by the lean group. Therefore, although it may globally be considered that obese Zucker rats are relatively resistant to TNBS-induced colitis, it is equally true that the absence of leptin signaling appears to have some detrimental consequences. There was no change between colitic groups on cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-10 and Reg3 γ mRNA levels either on alkaline phosphatase (AP) activity, however, *in vitro* sensitivity of AP to the inhibitor levamisole was reduced in the obese group as well as TNAP mRNA expression in colonic tissue. Plasmatic leptin was reduced in the lean colitic group but not in obese rats. Mesenteric adipose tissue (MAT) of colitic rats showed a significantly decrease in leptin mRNA expression as well as adiponectin, resistin and ghrelin, indicating that MAT is involved in the inflammatory process, which is in line with the induction of TNF α and IL-1 β (but not iNOS), assessed by RT-PCR. TNBS-induced colitis increased bacterial translocation from gut to liver and mesenteric lymph nodes (MLN), portal plasma levels of LPS and augmented intestinal permeability to FITC-dextran assessed *in vitro*. Data were always higher in obese rats, but differences never became significant. Altogether, these results suggest that mucosal barrier function (MBF) was impaired in obese Zucker rats.

To describe the role of leptin in intestinal inflammation we carried out a second experiment giving pegylated-leptin to C57BL6/J mice. After a week, experimental DSS-induced colitic model was performed. Inflammatory response was attenuated in leptin-treated mice, showing less colonic thickness, histological damage, AP activity and fecal blood, recovery from anemia, lower IFN γ , IL-6 (not significant), IL-1 β , IL-27, Reg3 γ , STAT3 activation, CD4⁺ IFN- γ ⁺ T cells relative presence in MLN, etc. Besides, TNF α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17A, IL-12 p70 secretion was reduced in colonic explant cultures of leptin-treated mice. Zonula occludens 1, claudins 4 and 5 mRNA expression was induced by leptin both colitic and non-colitic mice; cyclin D1, Myc and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was increased in non colitic leptin-treated mice. Moreover, alcian blue staining showed a significant mucus production in leptin-treated colitic mice. Altogether, these data suggest that leptin treatment reinforces MBF, giving protection to DSS-induced colitis.

Western blot analysis was widely used in this doctoral thesis. It is currently a routine practice to require a measurement of a housekeeping reference protein, including actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and β -tubulin, among others, in Western blots, as it is the rule in RNA blots. In some cases, such

as obesity or inflammation, these proteins are indeed affected by the experimental conditions. In trying to improve this approach, we have tested a new technique, with the Stain-Free gels from Bio-Rad, against both Ponceau staining and housekeeping protein immunodetection under different conditions. Our results show that Stain-Free gels outperform Ponceau staining and that both are more consistent than housekeeping proteins as a loading control.

5. CONCLUSIONS

1. Stain-Free gels outperform Ponceau reversible staining, and both are more consistent than the immunodetection of housekeeping proteins as a loading control for Western blotting.
2. In the Zucker rat, a well-established model of genetic obesity featured by leptin resistance, the TNBS-induced inflammatory response is notably reduced, but this correlates with an enhanced epithelial damage. Besides, exogenous leptin administration to healthy mice has beneficial effects on the subsequently induced DSS model of colitis, due to an improved intestinal barrier function.
3. Leptin plays a complex role on the experimental colitis, given that its effects are both protective or harmful depending on the context. Our results are in good agreement with those published by other authors making use of animals with an impaired leptin signaling (ob/ob mice and db/db mice), rats treated with exogenous leptin, mice exposed to leptin antagonists, and others.

INTRODUCCION

1. OBESIDAD

1.1 Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Desde 2005, la obesidad se ha establecido como la principal causa prevenible de enfermedad y muerte prematura, adelantándose al tabaquismo. La causa principal reside en un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, principalmente ligado al aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos ricos en grasa, azúcar y sal y pobres en micronutrientes, unido al descenso de actividad física como consecuencia de cambios sociales y ambientales asociados al desarrollo.

La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas que la insuficiencia ponderal, incluyendo todos los países de ingresos altos y la mayoría de países de ingresos medianos. De hecho, estos países en desarrollo tienen aún que afrontar una doble carga de morbilidad: no es raro encontrar obesidad y desnutrición en un mismo entorno, al tiempo que aún lidian con enfermedades infecciosas.

La prevalencia de la obesidad, particularmente en niños y jóvenes, ha aumentado tres veces o más en muchos países europeos y en los Estados Unidos desde la década de los ochenta, y más de la mitad de los adultos en la mayoría de los países europeos tienen sobrepeso. Según datos de la OMS, en 2014 el 13% de la población adulta mundial eran obesos y el 39% tenían sobrepeso.

El índice de masa corporal o IMC es un indicador simple que se usa frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Se calcula fácilmente dividiendo el peso corporal por el cuadrado de su talla en metros (Kg/m²). Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso, mientras que si es igual o mayor de 30 indica obesidad. Un elevado IMC constituye un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, los trastornos del aparato locomotor, disnea, apnea del sueño, inflamación, esteatosis hepática y algunos cánceres, entre otras. Los niños obesos presentan también una mayor probabilidad de obesidad, muerte prematura y discapacidad en la edad adulta. A su vez, la obesidad infantil se asocia con dificultades respiratorias, mayor riesgo de fracturas e hipertensión, así

¹ WHO. Obesity and overweight. Fact sheet n° 311. Updated January 2015.

como marcadores tempranos de enfermedad cardiovascular, resistencia a la insulina y efectos psicológicos [1].

1.2 Etiología

La obesidad es un desorden endocrino complejo y multifactorial cuya etiología radica principalmente en interacciones genético-ambientales, traducidas en un desequilibrio entre ingesta calórica y gasto energético que favorece el balance positivo de energía. Los casos de obesidad estrictamente genética no sobrepasan el 5% de la prevalencia. Sin embargo, las alteraciones genéticas que predisponen a este desequilibrio son, en parte, responsables de entre un 40 y 70% de los casos, según el país [2, 3].

La homeostasis energética se basa en el control de la ingesta y el gasto calórico, y está en parte determinada por la termogénesis en el tejido adiposo marrón y por la actividad del sistema nervioso simpático. Diversas áreas del cerebro que conforman los sistemas autónomo y cognitivo establecen redes neuronales implicadas en el control del apetito y la termogénesis [4, 5]. Estas áreas incluyen circuitos mesolímbicos dopaminérgicos, así como los sistemas opioide, endocannabinoide y de melanocortina [6]. La actividad de estos centros está modulada por factores periféricos como hormonas intestinales y hormonas derivadas del tejido adiposo que acceden al sistema nervioso central e informan acerca del balance energético y del estado nutricional [7]. Así, el organismo dispone de una serie de mecanismos coordinados cuyo objetivo es el mantenimiento del peso corporal, al igual que ocurre con la temperatura. Es lo que se conoce como “punto fijo metabólico” o “Teoría del Punto Fijo”. Este punto fijo es propio del individuo y susceptible a alteraciones patológicas [8].

Dada la naturaleza multifactorial y el peso de los factores ambientales en el desarrollo de la obesidad, se han postulado diversas teorías que incluyen dieta, predisposición genética, contaminantes ambientales o el propio “gusto por comer”. Brevemente, se dará una pincelada sobre estos.

El principal factor que contribuye al depósito excesivo de grasa en un individuo es el denominado “entorno obesogénico”, es decir, aquel que favorece el consumo de alimentos hipercalóricos y de escaso valor nutricional y, a su vez, potencia un estilo de vida sedentario [7]. Ello puede ocasionar alteraciones en la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la arborización dendrítica que en etapas críticas del desarrollo y, en menor grado, en la edad adulta, contribuirán al mal funcionamiento de los mecanismos encargados de regular la homeostasis

energética [9]. Además, diversos estudios clínicos y experimentales han constatado que este entorno es capaz de modificar la composición de la microbiota intestinal, lo cual está fuertemente vinculado a complicaciones metabólicas que rompen el balance energético corporal [10-16]. Merece la pena señalar, que las interacciones microbiota-hospedador actualmente cuentan con una gran atención e interés en la comunidad científica en áreas muy diversas, incluyendo obesidad, síndrome metabólico, enfermedades del tracto digestivo e incluso desórdenes mentales [10, 11, 17-19]. El conocimiento de estas interacciones y sus repercusiones metabólicas nos permite avanzar en el conocimiento fisiopatológico e incluso plantear nuevas dianas terapéuticas basadas en el restablecimiento de ese desequilibrio bacteriano, o disbiosis, o en potenciar la acción de bacterias comensales cuya actividad repercute de manera beneficiosa en la salud del hospedador. En este sentido, el uso de probióticos, prebióticos o la combinación de ambos o simbióticos, y antibióticos, están aportando resultados muy interesantes como coadyuvantes en el tratamiento del síndrome metabólico, la enfermedad inflamatoria intestinal o la depresión [20-23].

Encontramos diversas teorías que buscan dar explicación al hecho de que distintas personas en idénticas condiciones en lo referente a dieta y a ejercicio físico presenten índices de masa corporal tan desiguales. Entre éstas, cabe destacar la Hipótesis del Fenotipo Ahorrador, postulada por Hales y Barker en 1992 [24]. Esta hipótesis basada en observaciones epidemiológicas indica la existencia de una fuerte asociación entre bajo peso fetal y condiciones crónicas posteriores como enfermedad coronaria, hipertensión arterial, obesidad o diabetes tipo dos. El aumento de susceptibilidad a la obesidad en la niñez o en la edad adulta podría derivar de adaptaciones del feto a un entorno limitado en nutrientes, orientadas al máximo aprovechamiento de la energía que recibe [25, 26].

Otro de los postulados hace referencia a contaminantes ambientales o a la exposición del individuo con determinados agentes químicos, conocidos como disruptores o interruptores endocrinos (EDC, *endocrine-disrupting chemicals*) [27, 28]. El sistema endocrino controla el crecimiento corporal, el peso y los procesos metabólicos mediante la producción de hormonas y factores de crecimiento que interactúan a través de vías de señalización estrechamente relacionadas. Estas hormonas van a activar diversos procesos en el sistema gastrointestinal, páncreas, músculo, hígado, tejido adiposo y cerebro, que a su vez van a responder regulando el número y contenido de células adiposas, así como el apetito y la saciedad [29-33]. La acción de estas hormonas puede verse interrumpida por otro

tipo de moléculas que mimeticen o bloqueen estas funciones endocrinas a través de la unión o el bloqueo de los receptores hormonales, modificando los niveles de hormonas o alterando los mecanismos transportadores de éstas, pudiendo por tanto desencadenar distintas enfermedades de origen endocrino. Se ha identificado una subclase de EDC que predispone a la aparición de obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico cuando ha existido exposición a éstos en etapas tempranas del desarrollo [28]. De hecho, animales expuestos a cantidades relativamente bajas de dietilestilbestrol desarrollan obesidad [34, 35].

Lo hasta ahora mencionado corresponde con una obesidad de tipo metabólico, donde factores de diversa índole predisponen o directamente elevan el punto fijo metabólico. No obstante, el desequilibrio energético que da lugar a la obesidad puede tener origen conductual, comparable a los trastornos adictivos. Este tipo de obesidad se conoce como “Obesidad Hedónica” o “Hipótesis de la Gula” [36-38]. La característica primaria del sistema hedónico reside en la habilidad de anular las señales homeostáticas energéticas en respuesta a elementos de recompensa inhibiendo con ello los estímulos de saciedad. En este caso, el punto fijo metabólico no sólo no se encuentra modificado sino que además el gasto energético se ve incrementado a modo compensatorio. Se desconocen los mecanismos asociados a este fenómeno pero al parecer la elevada palatabilidad de alimentos densos procesados ejerce un rol fundamental en individuos susceptibles. Factores emocionales, el estrés, la excitación o estados metabólicos pueden modular este tipo de comportamiento. Estudios clínicos y experimentales mediante técnicas de imagen por resonancia magnética demuestran que las áreas corticolímbicas implicadas en los mecanismos de recompensa se ven hiperactivadas tanto en roedores como en individuos obesos durante la ingesta. Los sistemas centrales dopaminérgico y opioide son los responsables de este tipo de comportamiento adictivo, y diversas hormonas como la insulina, leptina o grelina parecen interactuar o modular estos sistemas neuronales implicados en las funciones de recompensa [39, 40].

1.3. Comorbilidades

La obesidad representa una carga crítica en otras enfermedades con amplias consecuencias clínicas y ha sido relacionada con peores resultados quirúrgicos llegando incluso a suponer una contraindicación en los mismos. Existen cada vez más evidencias que enlazan la obesidad con otras alteraciones metabólicas, osteoarticulares, reproductivas, determinados tipos de cáncer y del sistema inmunológico (SI). Entre éstas podemos destacar:

a. Alteraciones metabólicas

El síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, dislipidemias, esteatosis, esteatohepatitis no alcohólica, y enfermedades cardiovasculares derivadas, a su vez, de las anteriores, como hipertensión arterial, enfermedad coronaria o infarto agudo de miocardio, son quizás la cara más visible de las consecuencias del sobrepeso y del acúmulo excesivo y ectópico de grasa en el organismo.

b. Cáncer

En torno a un 10% de las defunciones de cáncer entre personas no fumadoras ha sido relacionado con la obesidad. La OMS estimó que el sobrepeso y la inactividad física responden a entre un cuarto y un tercio de los cánceres de mama, colon, endometrio, riñón y esófago. Los mecanismos subyacentes son difíciles de definir. Reflujo ácido, hiperinsulinemia y altas concentraciones de estrógenos libre en mujeres postmenopáusicas obesas han sido apuntados como posibles responsables.

c. Alteraciones en la reproducción

El nivel de afectación en la función reproductiva se ve incrementado con el grado de obesidad, causando con frecuencia ciclos anovulatorios, síndrome de ovario poliquístico e hirsutismo en mujeres, así como mayor riesgo de preclampsia, diabetes gestacional y dificultades en el parto, defectos en el tubo neural y macrosomía en el recién nacido. En el hombre, la obesidad central se relaciona con impotencia e infertilidad.

d. Efectos en la respiración y trastornos del sueño

En pacientes con enfermedades respiratorias preexistentes como el asma el sobrepeso o la ganancia de peso empeoran el cuadro clínico del paciente. Además, la grasa que circunda el cuello, propiamente por el efecto mecánico que ejerce sobre el mismo, es capaz de dificultar la respiración. Esto es especialmente preocupante durante la noche ya que conduce a la aparición de apnea del sueño, con las repercusiones que de ésta derivan como son la hipertensión pulmonar, insuficiencia cardiaca derecha, infarto o arritmias. En este sentido, puede añadirse el riesgo de accidentes en la vida cotidiana asociados al cansancio por falta de sueño.

e. Trastornos psicológicos

A pesar de que la obesidad ha sido sinónimo de riqueza y bienestar en el pasado, actualmente la esbeltez es el estereotipo general de belleza. Ansiedad y depresión acompañan en ocasiones a personas obesas que a veces sufren discriminación o no se aceptan a sí mismas. Existen dos desórdenes alimentarios asociados a la depresión mayor y el sobrepeso: el llamado "trastorno por atracón" (*binge eating disorder*, subtipo de bulimia nerviosa) y el "síndrome de alimentación nocturna".

f. Enfermedades mediadas por procesos inmunológicos

En las últimas décadas, paralelamente con la obesidad, enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, enfermedad autoinmune del tiroides, psoriasis y artritis psoriásica, han sufrido un dramático incremento en los países occidentales, de manera que la obesidad ha sido señalada como el principal factor ambiental ligado al inicio y progresión de estas enfermedades.[41]

Gracias al auge en el conocimiento del tejido adiposo, inicialmente considerado reservorio energético, y al descubrimiento de sus propiedades secretoras de mediadores solubles, las denominadas adipocinas, así como a la identificación de células del SI infiltradas en el tejido, se han identificado múltiples funciones endocrinas e inmunológicas desconocidas hasta hace pocos años. Conjuntamente, adipocitos, macrófagos, mastocitos, células B y células T contribuyen sustancialmente a la inflamación subclínica del tejido y, por lo tanto, a las comorbilidades ya mencionadas.

1.4 El tejido adiposo como órgano endocrino

El adiposo es un tejido conectivo de origen mesenquimal actualmente reconocido como órgano endocrino. Compuesto principalmente por adipocitos, el tejido adiposo alberga, a su vez, otros tipos celulares, que comprenden preadipocitos, células endoteliales y del SI, y fibroblastos.

El descubrimiento de sus propiedades secretoras así como la identificación de varios tipos de tejido adiposo en el humano adulto ha dado una nueva dimensión a sus funciones y propiedades. De hecho, actualmente, numerosos estudios se centran en la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas en los diferentes subtipos de grasa corporal.

Se han identificado tres tipos de tejido adiposo localizados en regiones anatómicas bien diferenciadas: el tejido adiposo blanco o WAT (*white adipose tissue*) que constituye el principal depósito energético del organismo y se clasifica en visceral o subcutáneo según se encuentre en la cavidad abdominal o bajo la piel (aunque también existen pequeños depósitos de grasa blanca en la región pericárdica, espacio retroorbital, médula ósea y en la cara, que no entran en la clasificación visceral o subcutánea); el tejido adiposo pardo o marrón (BAT, *Brown adipose tissue*), ubicado en el cuello y región supraclavicular en el humano adulto, cuya función principal conocida es la termogénesis; y el tejido adiposo beige o

brillante, recientemente identificado, que funcionalmente es similar a la grasa parda y que puede aparecer bajo distintos estímulos entre los depósitos de grasa blanca. Estos estímulos incluyen la exposición prolongada a bajas temperaturas o la acción de agonistas beta-adrenérgicos, proceso conocido como “browning”. En esta tesis doctoral, nos centraremos en el tejido adiposo blanco, por lo que no se detallarán las propiedades y funciones del resto.

1.4.1 Propiedades secretoras del tejido adiposo

El tejido adiposo blanco está dotado de una vasculatura bien organizada y posee una gran inervación, lo cual le permite establecer comunicaciones con otras células e intervenir en la regulación metabólica corporal. De hecho, la función secretora es una característica del tejido adiposo, particularmente importante por la liberación de ácidos grasos durante el ayuno. La identificación de la leptina en 1994 fue el acontecimiento inicial que condujo al estudio de las propiedades secretoras de mediadores proteicos del tejido adiposo. En general, estas moléculas se denominan adipoquinas, pudiendo ser secretadas por el adipocito pero también por otras células presentes en la matriz extracelular [42]. Aunque no está completamente caracterizado, se estima que el tejido adiposo es una fuente de más de 600 proteínas secretoras. [43] Las adipoquinas son péptidos bioactivos que informan del estado funcional del tejido adiposo a otros órganos diana como cerebro, hígado, páncreas, SI, vasculatura, músculo esquelético y otros tejidos.

Las adipoquinas pueden ejercer efectos específicos en una gran variedad de procesos biológicos, incluyendo:

- Respuesta inmunológica: adiposina, proteína que estimula la acilación (ASP, acylating simulation protein) y amiloide sérico A3.
- Inflamación: Interleukina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, factor de necrosis tumoral α (TNF α), proteína C reactiva (CRP), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), resistina, progranulina y quemerina.
- Metabolismo glucídico: leptina, adiponectina, dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), factor de crecimiento de fibroblastos-(FGF)21, resistina, vaspina y la proteína similar a la angiopoietina 8.
- Sensibilidad a la insulina: leptina, adiponectina, quemerina, proteína de unión al retinol 4 (RBP4) y omentina.
- Secreción de insulina: apelina y nesfatina-1.
- Presión arterial: apelina y angiotensinógeno.
- Contractilidad cardiaca: proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4).
- Adhesión celular: inhibidor del activador del plasminógeno 1.

- Función y crecimiento vascular: factor de crecimiento asociado al endotelio (VEGF).
- Adipogénesis y morfogénesis ósea: proteína morfogénica ósea 4 y 7 (BMP-4 y BMP-7).
- Crecimiento: factor de crecimiento similar a la insulina 1, factor de crecimiento transformante β (TGF β) y fibronectina.
- Metabolismo lipídico: apelina y CD36 soluble.
- Acumulación lipídica en el hígado: fetuina-A.
- Regulación del apetito y la saciedad: leptina y vaspina.

Como consecuencia, las alteraciones en la secreción de adipoquinas podrían ser el nexo entre la obesidad y sus comorbilidades inflamatorias, metabólicas y cardiovasculares. En este sentido, la expansión de tejido adiposo asociado al sobrepeso y la obesidad influencia significativamente la biología del adipocito, generando un estado de hipertrofia adipocitaria, depósitos ectópicos de grasa, hipoxia y estrés crónico del tejido adiposo, con un consecuente perfil de secreción de adipoquinas adverso. De hecho, individuos que poseen adipocitos de gran tamaño típicamente poseen niveles plasmáticos incrementados de factores proinflamatorios, incluyendo IL-6, IL-8 y MCP-1, de leptina y de catecolaminas, así como niveles reducidos de adiponectina e IL-10. Esta hipertrofia adipocitaria favorece la infiltración de células inmunológicas y, por ende, el perfil de secreción adverso de adipoquinas. Asimismo, la distribución de la grasa corporal puede influenciar la predisposición al desarrollo de alteraciones metabólicas. Particularmente, en los casos en que la acumulación se produce mayoritariamente en la cavidad abdominal y torácica superior, obesidad de tipo central, la susceptibilidad se incrementa [44-47].

1.4.2. Adipoquinas

A continuación, se detallan las adipoquinas más destacadas y sus principales acciones desde el punto de vista metabólico.

a. Leptina

Considerada el primer hito en la investigación de adipoquinas, la leptina representa el prototipo de hormona secretada por el adipocito. La clonación de la leptina, producto del gen *ob*, permitió dilucidar el mecanismo subyacente en el modelo experimental de ratón C57BL/6J *ob/ob* los cuales, de manera inexplicable hasta entonces, acusaban hiperfagia y una marcada obesidad desde edad muy temprana [48]. Aunque la obesidad congénita por deficiencia de leptina se considera rara, la clonación de ésta ha permitido satisfacer la necesidad terapéutica de estos pacientes, quienes

presentan un fenotipo muy severo de obesidad desde la niñez. La leptina ha mostrado asimismo su eficacia para el tratamiento de la lipodistrofia, condición patológica que hace referencia a un grupo heterogéneo de desórdenes que cursa con pérdida parcial o total del tejido adiposo, y que en algunos casos presenta hipoleptinemia. Su etiología es múltiple, así como las manifestaciones clínicas y la magnitud de afectación. Actualmente, las formas más comunes derivan de la terapia antirretroviral con inhibidores de proteasas en pacientes de VIH. El resto son mutaciones congénitas en su mayoría por identificar.

La leptina es un péptido de 16kDa compuesto por 116 aminoácidos. Ésta puede circular libre o unida a proteínas, y sus niveles son directamente proporcionales al contenido de grasa corporal. Gracias a la unión a receptores específicos en células diana, juega un papel importante en el control de la ingesta, en la función reproductiva, en el gasto energético, la aterogénesis o el crecimiento fetal. En el hipotálamo, incrementa la síntesis de péptidos anorexígenos y disminuye la de orexígenos, con la subsecuente reducción del apetito. La leptina constituye un factor importante en la supervivencia y masa de células β pancreáticas. En modelos animales de diabetes tipo I, la leptina, sola o en combinación con insulina, ha demostrado normalizar los valores de glucosa inhibiendo los mecanismos que estimulan la secreción del glucagón, hormona hiperglucemiante que inhibe la secreción de insulina [49, 50]. Conjuntamente, se deduce que la leptina pretende favorecer la acción de la insulina.

Tras el descubrimiento de esta hormona, las expectativas generadas en cuanto a su potencial terapéutico en la obesidad fueron altas, sin embargo, el uso de ésta en altas dosis o pegilada² no ha demostrado más que una ligera bajada de peso corporal. Puesto que en individuos tratados con leptina se han descrito niveles séricos elevados, la falta de efecto se ha atribuido a la resistencia o tolerancia a la hormona. No obstante, estudios recientes en roedores obesos indican que la administración de un antagonista para el receptor de la leptina incrementa la ingesta así como el peso corporal de los animales, sugiriendo que más que una resistencia a la administración exógena de leptina lo que se da es una respuesta ineficiente

² Pegilación: proceso químico que consiste en la unión de una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG) a otra molécula, con objeto de protegerla de la degradación enzimática, mejorar su solubilidad en agua, darle estabilidad física o térmica o aumentar la semivida de eliminación, entre otros. Las leptinas pegiladas permiten la prolongación del efecto farmacológico según el grado de pegilación, evitando su degradación enzimática.

debido a un estado de máxima activación receptorial secundario a la hiperleptinemia endógena[51].

En la última década la leptina ha sido ubicada en el centro del eje neuroendocrino-inmunitario. Este punto será tratado en el apartado 3.3.1 de esta introducción.

b. Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30kDa compuesta por 244 aminoácidos. Identificada poco después de la leptina, en 1995, esta hormona secretada exclusivamente por el tejido adiposo ha suscitado un gran interés por su capacidad de incrementar la sensibilidad a la insulina así como por sus propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas. Se han identificado dos receptores a través de los cuales trasmite la señal en sus órganos diana, AdipoR1 y AdipoR2, expresados en la mayoría de tejidos. La adiponectina es capaz de potenciar la secreción de insulina estimulando la expresión del gen de la insulina así como la liberación de ésta por exocitosis de los gránulos que la contienen. Los niveles de adiponectina se han relacionado inversamente con el IMC.

Modificaciones post-transcripcionales de la adiponectina resultan en proteínas multiméricas de bajo peso molecular, trímeros y hexámeros, y de alto peso molecular, formados por la asociación de entre 18-36 unidades. Estudios en humanos y roedores correlacionan mejor estos complejos de alto peso molecular con la sensibilidad sistémica a la insulina que los de bajo peso molecular.

La adiponectina o los agonistas de sus receptores poseen un gran potencial terapéutico en el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades. Se ha comprobado que la administración de adiponectina a roedores mejora la sensibilidad a la insulina y niveles de glucemia, incrementa la secreción de insulina y reduce el peso corporal.

La adiponectina, como la leptina, ejerce funciones inmunológicas que serán detalladas más adelante en este apartado de Introducción.

c. FGF21 (*fibroblast growth factor21*)

Compuesto por 209 aminoácidos (23kDa), este miembro de la superfamilia de factores de crecimiento fibroblásticos es producido por el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético. Actuando directamente sobre receptores específicos, el FGF21 junto con el cofactor β -Klotho han demostrado disminuir los niveles séricos de glucosa y lípidos así como ejercer efectos termogénicos. Sus efectos hipoglucemiantes podrían deberse, al menos en parte, a su efecto inductor del pardeamiento del tejido adiposo

y de la termogénesis adaptativa. El LY2505319, análogo estructural del FGF21 que lleva incorporado en la molécula un puente disulfuro que le confiere mayor estabilidad física, al tiempo que mantiene la misma afinidad y potencia, ha sido utilizado en ensayos clínicos probando su eficacia hipoglucemiante en diabéticos tipo II. Tras 28 días de tratamiento, mejoró significativamente el peso corporal, los niveles de insulina y adiponectina y el perfil lipídico (incluyendo bajada de colesterol LDL y subida del HDL y promoviendo incluso un cambio en el perfil de apolipoproteínas a menos aterogénico. Sin embargo, la sobreexpresión en ratones transgénicos o la terapia con FGF21 recombinante en humanos sólo ha mostrado una tendencia a disminuir la glucemia. A pesar de estos prometedores resultados, los análogos del FGF21 aún quedan lejos de formar parte del arsenal terapéutico. Además, el FGF21 juega un papel fundamental en el remodelado óseo, por lo que estas moléculas podrían acarrear consigo un importante perfil de efectos adversos en el hueso. Por último, es importante señalar que la concentración sérica de FGF21 está incrementada en individuos obesos o con resistencia a la insulina, lo cual sugiere que ambos estados pueden acompañarse de resistencia a las acciones del FGF21 o bien que existe una respuesta adaptativa como consecuencia de concentraciones elevadas del mismo.

d. BMP-4 y 7 (*bone morphogenetic proteins*)

Estas proteínas de 46 y 49kDa, respectivamente, pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta o TGF β (*transforming growth factor β*) y regulan distintos procesos durante la organogénesis, el desarrollo embrionario, la adipogénesis blanca y marrón y el gasto energético. Ambas se expresan en diversos órganos como placenta, tiroides, piel, tejido adiposo o tracto digestivo, y ejercen sus acciones a través de receptores específicos BMPR1 y BMPR2. La expresión en el tejido adiposo y las concentraciones séricas de estas proteínas han sido relacionadas con la obesidad y la distribución de la grasa corporal. BMP-7 puede intervenir en la regulación del apetito. De hecho, su administración a ratones ob/ob reduce la ingesta, indicando con ello que posee un mecanismo a nivel central e independiente de leptina. Además, ha demostrado bajar el peso corporal en ratones DIO, principalmente por aumento del gasto energético. BMP-4 es capaz de promover la adipogénesis, incrementa la expresión del receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas- (PPAR) γ y conduce a los adipocitos hacia un fenotipo de tejido adiposo beige. Actualmente, hay un interés científico creciente en la transformación del tejido adiposo blanco en marrón como

nueva estrategia para tratar la obesidad. Los mecanismos asociados a BMP-4 podrían configurar nuevas aproximaciones terapéuticas para la obesidad y sus comorbilidades.

e. Vaspina (*Visceral adipose tissue-derived serpin*)

La vaspina (47 kDa) fue identificada como miembro de la familia de inhibidores serina proteasas y se comprobó que su expresión estaba altamente incrementada en el tejido adiposo visceral de las ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLEFT) cuando alcanzan el pico de obesidad e insulina plasmática [52]. Su expresión no queda restringida al tejido adiposo sino que ha sido además detectada en piel, estómago e hipotálamo e islotes pancreáticos de roedores [53, 54]. Concentraciones séricas elevadas se han asociado con obesidad y una peor respuesta a la insulina y peor nivel de forma física [55]. Siendo administrada a ratones ha demostrado disminuir significativamente la glucemia y la ingesta, efectos que podrían ser debidos a la inhibición de la calicreína 7, enzima capaz de escindir y degradar las cadenas A y B que conforman la insulina [56].

f. Apelina

Además del papel que juega como adipoquina, este péptido de aproximadamente 1.5kDa (36 aminoácidos) y ligando endógeno del receptor metabotrópico APLNR, se expresa en el sistema nervioso central, mayoritariamente en hipotálamo, y en corazón, músculo esquelético y estómago. Se ha sugerido que contribuye en la regulación del metabolismo de la glucosa, lipólisis, presión arterial, homeostasis cardiovascular, ingesta, proliferación celular y angiogénesis. Particularmente ha suscitado interés por su capacidad de disminuir la lipólisis e inducir vasodilatación, con la consecuente reducción en los valores de presión arterial. La mayoría de estudios clínicos han encontrado una asociación entre niveles elevados de apelina con obesidad y resistencia a la insulina, aunque los efectos metabólicos derivados de la administración de apelina en condiciones sanas y patológicas aún requieren ser investigados.

g. DDP-4 (dipeptidil peptidasa 4)

La ingesta de nutrientes puede estimular la liberación de incretinas, incluyendo el polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa y el péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1, *glucagon like peptide-1*). Las incretinas han demostrado potenciar la secreción de insulina dependiente de glucosa e inhibir la secreción de glucagón, lo que conjuntamente

conlleva una disminución de la gluconeogénesis hepática. En condiciones fisiológicas, la DPP-4 degrada rápidamente estas hormonas.

La DPP-4, proteína de 88 kDa, se expresa en células glandulares como en las salivares, la próstata, la vesícula seminal, el endometrio, los túbulos renales, el colon y las células deciduales. Recientemente se ha encontrado una fuente adicional de DPP-4 en el tejido adiposo y se ha observado que, en comparación con pacientes delgados, pacientes con obesidad y resistencia a la insulina presentan un incremento de DPP-4 en el tejido adiposo visceral y en suero, lo cual podría contribuir al desarrollo de resistencia a insulina asociada a la obesidad.

Actualmente, inhibidores de la DPP-4, como la sitagliptina y como agonistas del receptor del GLP-1, como la exenatida, son utilizados en terapias farmacológicas para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

h. TNF α (*tumor necrosis factor α*)

El TNF α es una citoquina proinflamatoria de 25kDa identificada por primera vez en macrófagos, aunque posteriormente se demostró que también es producido por los adipocitos, cumpliendo una función paracrina y endocrina. Aunque su expresión en el tejido adiposo humano es relativamente baja, sus niveles se han correlacionado con la obesidad y descienden con la pérdida de peso. Se ha comprobado que es capaz de dificultar la señalización de insulina de modo directo en sus órganos diana y de disminuir la secreción de insulina. En modelos animales se ha observado que anticuerpos neutralizantes (anti-TNF α) mejoran significativamente la inflamación y la esteatosis y protegen frente a los efectos de dietas ricas en grasa y frente a la resistencia a insulina. Estos resultados se han corroborado en modelos de ablación genética de TNF α en roedores. Sin embargo, la traslación a la clínica no ha sido exitosa. De hecho, cabría destacar que el uso de anticuerpos neutralizantes anti-TNF α en espondiloartritis generó en estos pacientes un incremento de tejido adiposo visceral y subcutáneo.

i. IL-1 β

Al igual que el TNF α , la IL-1 β (17kDa) es una citoquina proinflamatoria producida por células inmunitarias y secretada también por el adipocito. Circula principalmente unida a la albúmina y señala a través de receptores específicos, IL-1R1 e IL-1R2. La IL-1 β parece contribuir a la inflamación y a la apoptosis que lleva a la destrucción de células β -pancreáticas en diabetes tipo 1. Ensayos clínicos han probado la eficacia del uso del antagonista del receptor IL-1R1 (anakinra) en pacientes diabéticos

tipo 2 demostrando un mejor perfil glucémico y función β -pancreática. No obstante, estos beneficios son atribuidos en mayor grado a la protección que confiere en los islotes de Langerhans.

1.5. Inmunología de la obesidad

Dado que las intervenciones en hábitos dietéticos resultan tediosas y poco efectivas, principalmente por la baja adherencia de los pacientes, para combatir la obesidad se está realizando un gran esfuerzo en el estudio de las bases moleculares subyacentes que articulan la obesidad con sus comorbilidades. En este sentido, el estado crónico de inflamación subclínica descrito en la obesidad ha emergido como pieza clave en la patogenia de esta enfermedad y de sus secuelas metabólicas.

La identificación de la presencia de TNF α en el tejido adiposo de animales obesos fue el primer hallazgo que relacionó al SI con la resistencia a la insulina [57, 58]. Posteriormente, en el año 2003 pudo comprobarse que en dicho tejido existían macrófagos infiltrados y que estas células eran responsables de la inflamación presente en el tejido adiposo [59, 60]. Estas investigaciones constituyeron el inicio del estudio de la conexión entre los procesos inmunitarios y metabólicos que ha supuesto una verdadera revolución en el entendimiento de ambos procesos.

Estudios de los diferentes depósitos de grasa del organismo han revelado que las células inmunológicas representan aproximadamente dos tercios de la fracción de estroma vascular (SVF, *stromal-vascular fraction*) del tejido adiposo. Diferentes tipos de células inmunitarias, incluyendo células B, células T, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos han sido identificadas en el tejido adiposo, y se ha comprobado que la obesidad influye tanto en la cantidad como en los subtipos celulares presentes. Teniendo en cuenta que en la obesidad mórbida este tejido puede alcanzar hasta el 50% del total de masa corporal, éste podría constituir el mayor compartimento del SI con influencia en la inflamación sistémica. El incremento de adiposidad en obesos potencia por lo tanto la habilidad del tejido para ejercer como tejido inmunitario y controlar la inflamación sistémica y el metabolismo. No obstante, algunas personas obesas no presentan este estado de infiltración celular y carecen de marcadores de inflamación, de manera que han sido englobados bajo el término de “obesos sanos”. No haremos referencia a este tipo de pacientes pues no presentan inflamación subclínica ni las

comorbilidades asociadas a la obesidad, aunque precisamente por ello su estudio no resulta menos interesante.

Existen claras evidencias que sugieren que el remodelado prolongado del tejido adiposo como consecuencia del exceso calórico conduce a un estado crónico de inflamación que afecta negativamente a la sensibilidad del tejido a la insulina. Dicho estado, se acompaña de niveles elevados de complemento C3, proteína C reactiva, IL-6, TNF α e IFN γ , y disminución de adiponectina en el tejido adiposo. Resulta interesante destacar que estos mismos sujetos poseen incrementada la expresión del marcador de macrófagos CD68 y disminuida la resistencia a la tracción, lo cual puede ser indicativo de fibrosis. Se ha comprobado que la obesidad y la resistencia a la insulina ejercen efectos importantes en la diferenciación de células inmunológicas desde subtipos antiinflamatorios hacia subtipos más proinflamatorios, incluyendo la polarización de macrófagos M2 hacia M1 y la pérdida de células T reguladoras en el tejido adiposo.

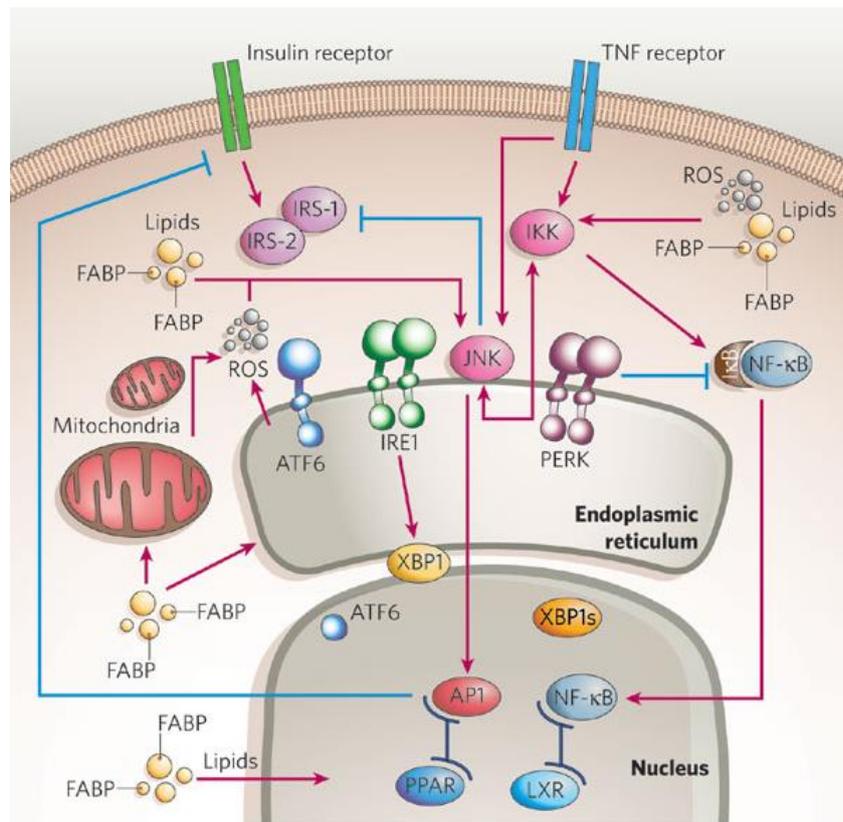
Es lógico pensar que el desarrollo de inflamación y resistencia a la insulina en la obesidad constituye un mecanismo adaptativo para controlar la disfunción del tejido asociada al almacenamiento excesivo de energía. La resistencia a la insulina podría reducir la ganancia de peso aunque a cambio se genera un estado de hiperglucemia y éste contribuye a la inflamación. Por ejemplo, la inhibición de la glucólisis cambia la diferenciación de células Th17 hacia células T reguladoras, dicho de otro modo, el fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio de estas células depende de modo directo de la glucólisis. A su vez, la secreción de IL-1 β por macrófagos requiere del metabolismo de la glucosa.

En respuesta al exceso energético, los adipocitos devienen hipertróficos y/o hiperplásicos. La talla adipocitaria es inversamente proporcional a la sensibilidad a la insulina, y los adipocitos más pequeños poseen los marcadores de inflamación más bajos. El análisis histológico del tejido adiposo reveló la presencia de estructuras de tipo corona o *crown-like structures*, consistentes en la aparición de células inmunitarias rodeando adipocitos muertos presentes en el tejido, fundamentalmente macrófagos M1.

1.5.1. Mecanismos moleculares que integran la acción de la insulina y la respuesta inflamatoria.

En procesos infecciosos y otros que cursan con inflamación las células del SI innato y adaptativo necesitan captar glucosa para su activación. No es de extrañar pues que exista una relación entre la hormona anabólica por excelencia y estas células. Distintos mediadores inmunitarios son capaces de interrumpir la cascada de señalización de la insulina con objeto de inhibir los procesos anabólicos inducidos por insulina, incrementando la disponibilidad de glucosa y generando, por tanto, resistencia temporal a las acciones de la insulina en sus órganos diana. Constituyendo éste un mecanismo adaptativo en la inflamación.

La figura "x" resume los mecanismos moleculares que determinan la aparición de la resistencia a la insulina durante los procesos inflamatorios, explicados por Taniguchi *cols.* [61] Brevemente, las vías de señalización que se activan por moléculas como TNF α , IL-6 o leptina pueden interferir mediante señalización cruzada o *cross-talk* la cascada intracelular que sucede tras la activación receptoral. El receptor de la insulina así como el del factor de crecimiento tipo insulina pertenecen a la familia de receptores tirosina kinasa, los cuales precisan de proteínas adaptadoras para mediar sus señales. Entre éstas cabe destacar la familia de sustratos del receptor de la insulina o IRS (IRS1-6). La insulina estimula la fosforilación de los IRSs en residuos de tirosina, lo que constituye un evento crucial en su señalización. En la mayoría de casos de resistencia a la insulina sistémica, tanto en humanos como animales, este paso es defectuoso. La activación de las kinasas c-Jun N-terminal (JNK) por citoquinas, lípidos, especies reactivas de oxígeno (ROS) o la kinasa IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), sensor de estrés del retículo endoplásmico, conduce a la fosforilación de restos de serina en los IRSs, fenómeno que interrumpe la señalización de insulina. De modo similar, la proteína PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) puede activar la fosforilación del complejo I κ B kinase (IKK) e inhibir la acción de la insulina a través de una serie de eventos transcripcionales mediados por el factor nuclear kappa B (NF- κ B). JNK puede, a su vez, regular la transcripción de genes inflamatorios a través de AP-1 (*activator protein 1*). Por otra parte, las proteínas SOCS (*supressor of cytokine signaling*) pueden causar resistencia a insulina mediante la inhibición de la fosforilación de IRSs. Los eventos transcripcionales generados por lípidos están mediados por los PPARs y de receptores X hepáticos (LXRs, *liver X receptor*), y la actividad biológica de estos lípidos está regulada por proteínas de unión que ejercen de chaperonas (FABPs).



1.5.2. Aspectos metabólicos, macrófagos y resistencia a la insulina

Los procesos metabólicos, inflamatorios e infecciosos se encuentran estrechamente coordinados y dicha conexión puede ser regulada por lípidos. [62] Diversos factores de transcripción regulados por lípidos son cruciales en la modulación de estos procesos. Particularmente implicadas están las familias de receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPARs) y LXR, cuya activación inhibe la expresión de distintos genes implicados en la respuesta inflamatoria en macrófagos y adipocitos [63, 64]. En concreto, la activación de los miembros de la familia PPAR suprime la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente a través de la inhibición de NF-κB. Igualmente, los LXR pueden disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias y, recíprocamente, resultar inhibidos por la activación de receptores tipo toll (TLRs, *toll like receptor*) en macrófagos [65]. Curiosamente, los TLRs están presentes en el adipocito y pueden ser activados directamente por nutrientes, concretamente por los ácidos grasos.

Otro grupo de moléculas que coordinan las respuestas lipídicas en adipocitos y macrófagos y que están fuertemente relacionadas con vías metabólicas e inflamatorias son las chaperonas intracelulares de lípidos o FABPs (*fatty acid-binding proteins*) [66]. Estas proteínas poseen gran afinidad por ligandos hidrofóbicos tales como ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, eicosanoides y otros lípidos, a quienes se une de forma reversible. Estudios en roedores con supresión en la expresión de las FABPs aP2 y MAL1 demostraron que éstos se veían protegidos frente a casi todos los síntomas del síndrome metabólico, incluyendo aterosclerosis y resistencia a la insulina. Posteriormente, se demostró que la pérdida de aP2 en ratones les confería resistencia al asma, estableciéndose como un potencial nexo entre la regulación metabólica y la inflamación de las vías aéreas [67-69].

Los macrófagos representan el grupo celular del SI más abundante en el tejido adiposo [70]. En ratones delgados, entre un 10-15% de las células del tejido adiposo expresan el marcador de macrófagos F4/80, en contraste con el 45-60% presente en roedores obesos, indicando una alteración sustancial en la ratio macrófagos-adipocitos en el animal obeso [59]. Entre ambos estados se hallan además diferencias en cuanto a localización y potencial inflamatorio de estas células, pudiendo diferenciar el fenotipo de macrófagos activados alternativamente (M2; ARG⁺CD206⁺CD301⁺), con menor actividad proinflamatoria y dispersados uniformemente por el tejido adiposo en el ratón delgado, frente al fenotipo de macrófagos clásicamente activados M1(NOS2⁺TNF⁺), proinflamatorios, y fundamentalmente localizados en las estructuras de tipo corona que aparecen alrededor de adipocitos muertos[71, 72].Se ha podido comprobar que el reclutamiento de macrófagos M1 coincide con la aparición de adipocitos necróticos al inicio de la resistencia insulínica[73].

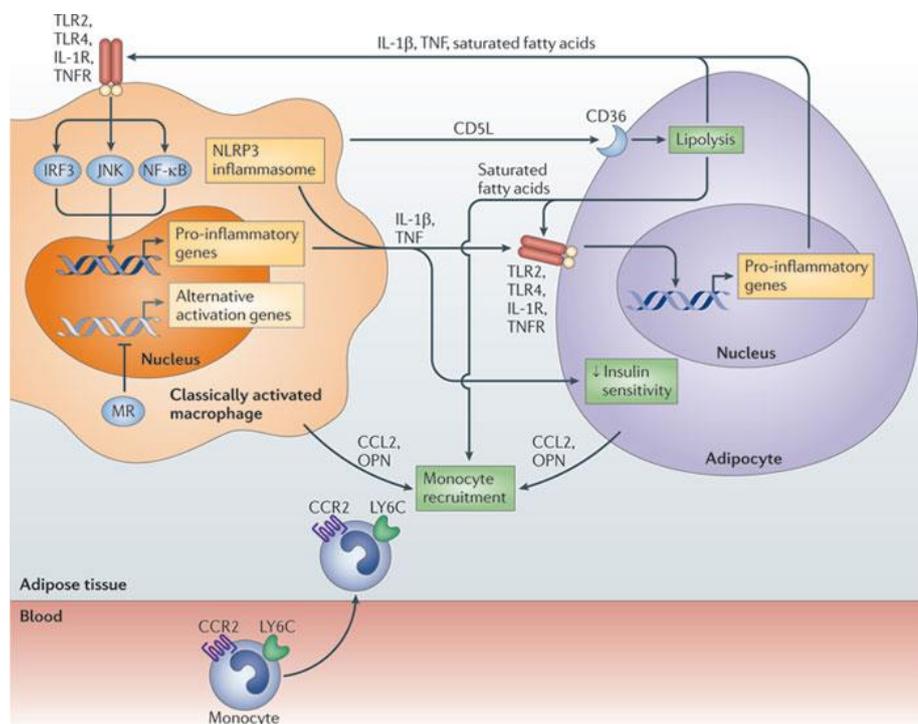
Los ácidos grasos han sido postulados como desencadenantes de la activación de macrófagos y responsables de la aparición de resistencia a la insulina en la obesidad. Concretamente, los ácidos grasos saturados promueven la activación clásica de macrófagos a través de la activación del TLR4. Este hecho fue puesto de manifiesto en animales *knockout* para TLR4 que presentaron resistencia a la inflamación generada en el tejido adiposo mediante infusión lipídica [74, 75].De hecho, la expresión de TLR4 es fundamental en la aparición de resistencia a la insulina en hígado y tejido adiposo inducida experimentalmente por la administración de una dieta rica en grasa. No obstante, estudios recientes indican que dicho fenómeno no es consecuencia directa de la activación de la ruta

canónica de TLR4, dado que ratones en los que se ha silenciado MyD88 (mediador primario en la señalización de receptores de tipo toll y de IL-1) responden con mayor severidad a la dieta rica en grasa[76, 77]. El TLR4, junto a los ácidos grasos, ha sido relacionado con la fetuina A. Esta proteína, secretada en grandes cantidades por el tejido adiposo, es ligando endógeno del TLR4. Estudios en sistemas de co-cultivo in vitro han demostrado que, tras exposición a ácidos grasos libres, los adipocitos liberan fetuina A y que ésta es capaz de activar la polarización de macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio M1, proceso similar al que se produce en el tejido adiposo de individuos obesos. Además, la fetuina A actúa como quimiotáctica de macrófagos incrementando el tráfico de éstos hacia el tejido. Todos los miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR1-9) se expresan, en mayor o menor grado, entre los componentes del tejido adiposo[78].

Un evento clave en el inicio de la inflamación de tejido adiposo es el reclutamiento de monocitos LY6C^{hi}CCR2⁺, los cuales se diferencian a macrófagos M1. Entre los factores quimiotácticos implicados, el receptor de quimioquinas CC tipo 2 o CCR2 y sus ligandos, como el CCL2, suscitan mayor interés. Se ha comprobado que el silenciamiento de CCR2 como la expresión transgénica de CCL2 en el tejido adiposo es suficiente para disminuir o incrementar respectivamente el reclutamiento de macrófagos, con repercusión directa en la sensibilidad a la insulina[79, 80]. No obstante, CCL2 no parece ser requerido para el inicio del proceso, sugiriendo la existencia de mecanismos redundantes entre los distintos ligandos del CCR2 [81, 82]. Otros factores quimiotácticos incluyen la osteoponina[83-85], los ácidos grasos liberados por el adipocito durante la lipólisis[86] o el antígeno tipo CD5 (*CD5-like antigen*) liberado por el propio macrófago y que a su vez induce la lipólisis e incrementa la expresión de otras quimioquinas en el adipocito, incluyendo CCL2, CCL5 (*RANTES, regulated on activation normal T cells as secreted*), CCL7 y CCL8[87, 88].

El proceso por el cual el adipocito muere no ha sido esclarecido. Recientes estudios señalan la piroptosis como mecanismo responsable. La piroptosis es un proceso de muerte celular dependiente de caspasa-1 que conlleva la fuga de componentes citoplasmáticos al espacio extracelular. En el tejido adiposo, este proceso implica la liberación de sustancias reconocidas como DAMPs metabólicos (*danger associated molecular patterns*) y detectados por los PRR (receptores de reconocimiento de patógenos), activando a macrófagos. Estos DAMPs metabólicos incluyen ácidos grasos libres, altas concentraciones de glucosa, ATP, ceramidas y otros esfingolípidos y colesterol, y cristales de urato.

Además de los TLRs ya mencionados, cabe destacar la implicación del inflammasoma NLRP3 en el proceso inflamatorio del tejido adiposo por su respuesta frente a los DAMPs. Los inflammasomas son unos complejos multiproteicos, que se encargan de la activación de la enzima proteolítica caspasa-1. Dicha activación es imprescindible para el procesamiento de los precursores inactivos de la IL1 β y la IL18 (pro-IL1 β y pro-IL18)[89]. El NLRP3 puede ser activado por ácidos grasos libres, ceramidas, glucotoxicidad, colesterol, amiloide beta y cristales de urato, así como por especies reactivas de oxígeno (ROS) cuya producción se ve incrementado por el estrés oxidativo resultante de la disfunción mitocondrial en el adipocito[90-92].



Nature Reviews | Immunology

1.5.3. Activación de células T en el tejido adiposo

Aunque los acontecimientos iniciales en la respuesta inmune incluyen la activación del SI innato, la persistencia en la estimulación antigénica conduce a la activación del SI adaptativo. El reclutamiento de macrófagos se entiende como un proceso por el cual el tejido adiposo pretende aclarar los restos necróticos, de manera que se favorezca la diferenciación de nuevos adipocitos capaces de almacenar el excedente energético. Sin embargo, esta situación sostenida en el tiempo aporta estímulos suficientes para que los macrófagos activen a los componentes del SI adaptativo, ya presentes en el tejido.

La activación de macrófagos es crucial en la inflamación del tejido y está a su vez influenciada por el sistema adaptativo. La liberación de IFN γ e IL-17, por linfocitos Th1 y Th17 respectivamente, estimulan las funciones proinflamatorias de macrófagos induciendo la secreción de IL-6 y TNF α . Por el contrario, los linfocitos Th2, mediante la secreción de IL-4 e IL-13, y las células T reguladoras promueven la polarización de macrófagos hacia el fenotipo antiinflamatorio M2.

La composición de células del SI en el tejido adiposo puede ser compleja, y depende tanto de la localización de la grasa, visceral o subcutánea, así como del estado de obesidad o delgadez [93-95]. En ratones delgados los linfocitos CD3⁺ representan alrededor del 10% del SVF del tejido adiposo, con un ratio 1:3 de células T CD8⁺:CD4⁺. Las células T CD4⁺ pueden a su vez clasificarse en reguladoras (Treg) y colaboradoras (Th) de tipo 1 o Th1, de tipo 17 o Th17 y de tipo 2, o Th2, con actividades proinflamatorias en los dos primeros casos y antiinflamatorias en el caso de Th2, y la proporción de Th1 y Th2 es similar. Las poblaciones celulares en el tejido adiposo visceral están sesgadas hacia el SI innato contando con hasta un 70% de células natural killer (NK), células T $\gamma\delta$ y células T natural killer (NKT), en comparación con el compartimento subcutáneo que posee una mayor proporción de componentes de células CD4⁺, CD8⁺ y células B[96, 97].

En modelos de obesidad inducida con dieta rica en grasa la ratio de células T CD8⁺:CD4⁺ en el tejido adiposo visceral se vio incrementada en comparación con los ratones delgados. Además, condujo a un dramático incremento en la polarización de células hacia Th1 y la población Th2 se vio disminuida ~50%; la población Th17 quedó restringida a menos del 1% del total de células CD4⁺. La relación entre Th1:Treg pasó de 1.5:1 a 6.5:1 con una disminución de Treg de ~70%. A diferencia del visceral, las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ del tejido adiposo subcutáneo disminuyeron y las Treg no sufrieron modificación alguna. Cabe reseñar que el número de células T $\gamma\delta$ secretoras de IL17 incrementó sustancialmente en este modelo. Esta citoquina regula la adipogénesis y homeostasis de glucosa[98]. Observaciones en humanos delgados y obesos describen un mismo patrón[96, 99-101].

El estudio de la dieta rica en grasa en ratones cuyos linfocitos no expresan el gen activador de la recombinación (RAG *knockout*), y por tanto son incapaces para sintetizar células T o B funcionales, pudieron observarse resultados muy interesantes. Al igual que en otros modelos convencionales, esta alimentación se tradujo en un fenotipo diabético en el roedor. La transferencia de linfocitos CD4⁺ a estos roedores redujo la ganancia de peso y niveles séricos de citoquinas y

adipoquinas relacionadas con la obesidad, como leptina y resistina, indicando la importancia de los linfocitos en la homeostasis energética. Los autores sugirieron que el efecto podría estar mediado por la inducción de la secreción de IL-10 por macrófagos M2 y de TGF β por las Treg, aunque los mecanismos no han sido dilucidados[97].

El tejido adiposo de animales delgados alberga una población única de células T reguladoras (Treg, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) caracterizada por una elevada expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ . Esta población disminuye sustancialmente por ingesta excesiva de grasa [96]. Las células Treg expresan IL-10, citoquina que ejerce efectos antiinflamatorios reduciendo la proliferación y activación de células T, y disminuyendo además la señalización inflamatoria en el adipocito [102]. Aunque estas células se pierden durante la obesidad, se produce un incremento general de células T totales, indicando una activación del SI adaptativo y proliferación local de células T. La inflamación mediada por células T está regulada por IL-6, y el bloqueo de la señalización por STAT3 en células T resulta en una mayor sensibilidad a la insulina e incremento de Treg en el tejido adiposo visceral en modelos de obesidad inducida por dieta grasa[103]. La señalización por STAT3 se explica detalladamente en el apartado 3.4.1.

En otro estudio con dieta grasa en roedores, comprobaron que el aumento de células T CD8⁺ fue previo a la llegada de macrófagos. Estos linfocitos están implicados en diferenciación, migración y activación de macrófagos, iniciando así cascadas proinflamatorias en el tejido que conduce a la resistencia a la insulina [104].

Las NKT han manifestado ejercer un importante papel en la intolerancia a la glucosa e inflamación asociadas a la obesidad. De hecho, ratones knockout para β 2-microglobulina, que no poseen NKT, mostraron mejor tolerancia a la glucosa y menor inflamación en la grasa visceral cuando fueron alimentados con dieta rica en grasa. La posterior activación de NKT con α -galactosilceramida potenció insulinoresistencia e inflamación del tejido, elevado además la infiltración de macrófagos[105].

Las células B al igual que los macrófagos expresan TLRs pero la expresión de NLRP3 es muy baja. Igualmente, ambos expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH II) y tienen la habilidad de presentar antígenos a las células T. La transferencia de células B silenciadas para CMH II a

ratones carentes de células B se tradujo en un incremento en la sensibilidad a la insulina, a diferencia del silenciamiento en CMH de tipo I donde no hubo diferencia. Ello indica que la presentación antigénica por células B a las células T CD4⁺ contribuye la inflamación sistémica y a la resistencia a la insulina. Asimismo se ha demostrado que la inmunoglobulina G (IgG) producida por células B está implicada en la resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasa, aunque se desconocen los mecanismos implicados [106].

2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.1. Generalidades

El término Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) define una condición inflamatoria crónica e idiopática del tracto gastrointestinal, en la cual el paciente pasa de forma alternativa por períodos de inflamación y remisión. EII es una denominación general que hace referencia principalmente a dos cuadros clínicos diferentes conocidos como Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. A nivel clínico ambas formas de manifestación son a menudo muy similares, factor que complica la realización de un diagnóstico diferencial fiable en muchos casos. No obstante, existen diferencias sustanciales a nivel anatomopatológico atendiendo a las capas de la pared intestinal que se encuentran afectadas y al tipo de respuesta inmunológica predominante.

La Enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, pudiendo verse afectado cualquiera de los segmentos que lo componen, desde la boca hasta el ano. A pesar de dicho carácter transmural, la EC generalmente cursa con una evolución no penetrante, de forma que solo alrededor del 15% de los casos presentan lesiones tipo fístula o absceso. Clásicamente se produce una afectación inflamatoria discontinua o parcheada del segmento en cuestión, que en ocasiones se acompaña de otras complicaciones como estenosis o fístulas en la zona perianal. La frecuencia relativa con la que estadísticamente se ve afectado cada uno de los segmentos del tracto gastrointestinal en los pacientes con EC es del 47% para el íleon terminal, 28% para el colon, 21% en el caso de la región ileocecal y sólo de un 3% si consideramos el tracto gastrointestinal superior. El hecho de que el área que con mayor frecuencia de afectación sea el íleon terminal hizo que allá por el año 1932 cuando se describió por primera vez la actual EC, se la denominara como “ileítis terminal”.

La sintomatología con la que se presenta la EC puede ser muy diferente en cada paciente, debido a que depende sobre todo de la región intestinal que esté afectada en cada caso. De este modo, si la afectación es meramente colónica la sintomatología suele ser de tipo diarreico, acompañada de presencia de sangre y moco en las heces. En cambio, si la afectación reside en el intestino delgado suele manifestarse dolor abdominal intenso en el cuadrante inferior derecho. La presencia de ulceraciones severas, el desarrollo de fiebre y una significativa pérdida de peso derivada de una menor ingesta de alimentos para evitar el típico dolor postprandial, son síntomas que se presentan en la mayoría de los casos independientemente del segmento intestinal afectado [107].

Desde un punto de vista patológico, las alteraciones macroscópicamente observables en una zona con afectación inflamatoria de un paciente con EC se pueden resumir en un fuerte engrosamiento y rigidez intestinal dando aspecto de órgano macizo a la palpación, reflejo de la fibrosis y el edema subyacentes. Las porciones afectadas se adhieren con frecuencia a otros segmentos intestinales, originando en ocasiones fístulas. Al abrir transversalmente el segmento afectado se observa una disminución de la luz intestinal y una llamativa fibrosis en la pared. La mucosa suele presentar un aspecto en forma de “empedrado”, debido a la alternancia entre ulceraciones profundas y zonas edematosas. Cuando varias úlceras profundas se asocian entre sí, puede llegar a originarse una fístula, caso en que la afectación transmural alcanza la capa muscular [108, 109]. A nivel microscópico, destaca una infiltración difusa en la mucosa intestinal y particularmente en la lámina propia, dominada por linfocitos y células plasmáticas. Asimismo, es muy típico encontrar granulomas que se localizan preferentemente en submucosa, subserosa y ganglios linfáticos. Actualmente hay un cuerpo de conocimiento muy consistente que sostiene el concepto según el cual hay una estrecha relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis, siendo esta patología un ejemplo de primer orden junto a la colitis ulcerosa, dado que sufrir una de estas afecciones inflamatorias crónicas aumenta de forma muy significativa el riesgo de padecer un proceso neoplásico intestinal en general y un adenocarcinoma colorrectal en particular [110, 111].

La Colitis Ulcerosa (CU) se caracteriza por una inflamación no transmural (superficial) que solo afecta a la mucosa, y anatómicamente restringida al colon. En función de la longitud del segmento colónico que se encuentre afectado, la CU recibe una denominación diferente. De este modo, se habla de proctitis si solo se ve afectado el recto, proctosigmoiditis cuando se ven afectados 25-30 cm en

dirección proximal desde el recto, colitis izquierda cuando está afectado recto, sigma y colon ascendente, y finalmente pancolitis cuando se encuentra inflamada la totalidad del órgano. En algunas ocasiones estos pacientes sufren una inflamación que afecta a la zona distal del íleon, esto es conocido como “*backwash ileitis*”, y su aparición dificulta la realización de un adecuado diagnóstico diferencial entre EC y CU. La sintomatología suele estar dominada por un fuerte dolor abdominal sobre todo postprandial, diarrea con deposiciones muy mucosas e incluso acompañadas de pus, rectorragia y anorexia con la consecuente tendencia a la pérdida de peso o retraso en el crecimiento si hablamos de un paciente pediátrico. Cuando esta sintomatología es extremadamente exacerbada, se usa el término de CU fulminante. Esto es así cuando el paciente presenta fiebre, más de diez deposiciones diarias totalmente diarreicas y acompañadas de un profuso sangrado, esto lleva a una anemia e incluso termina haciendo necesaria la transfusión sanguínea. Evidentemente cuando esta sintomatología perdura en el tiempo sin ser controlada clínicamente, puede terminar desembocando en un megacolon tóxico. En esta situación clínica, el colon aparece muy dilatado, se produce una fuerte hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto muy fino y frágil. Llegado a este punto, la única alternativa es la realización de una colectomía ante el altísimo riesgo de perforación y la consecuente septicemia [112]. Es importante destacar que no es extraño que se produzcan alteraciones de tipo sistémico asociadas a la CU. En este sentido, con relativa frecuencia aparecen artropatías periféricas, espondilitis anquilopoyética, problemas cutáneos como el pioderma gangrenoso, lesiones oculares, alteraciones renales como la pielonefritis e incluso algunas hepatopatías.

Desde un punto de vista patológico, a nivel macroscópico la mucosa en fase inflamatoria aparece hiperémica y con hemorragias puntiformes. A medida que el proceso inflamatorio evoluciona aparecen úlceras superficiales, que tienden a extenderse y fusionarse llegando a afectar grandes áreas de la mucosa colónica. Es también muy típica la presencia de pseudopólipos o pólipos inflamatorios, que son focos puntuales de inflamación que pueden confundirse fácilmente con adenomas. Cuando el paciente entra en fase de remisión este aspecto se normaliza bastante, aunque quedan secuelas permanentes que se caracterizan por una mucosa muy lisa, brillante, granulosa y atrófica. En fases muy avanzadas de la enfermedad, el colon se torna muy fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con pérdida de las marcas australes [113-115]. Centrándonos en la observación microscópica, a nivel de la lámina propia se produce una fuerte infiltración de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Junto a este infiltrado, otra

característica típica de la CU es la distorsión de la arquitectura normal de las criptas apareciendo disposiciones aberrantes, debido a la afectación inflamatoria que inicialmente se produce en su base. La extrema fragilidad tisular que ya se ha citado anteriormente asociada a la CU fulminante, puede reflejarse incluso en la aparición de agrietamientos patentes en la mucosa colónica [116, 117].

La realización de un diagnóstico diferencial fiable entre la EC y la CU es una cuestión que ha suscitado debate durante mucho tiempo en la comunidad médica. En general, este diagnóstico se hace atendiendo a las diferencias sobre todo en lo referente a la distribución anatómica de la afectación inflamatoria a lo largo del tubo digestivo, y sobre todo a la transmuralidad del proceso inflamatorio a nivel microscópico. Las técnicas de las que se hace uso para conocer estos detalles comprenden desde la endoscopia hasta la gammagrafía con leucocitos marcados, pasando por la ecografía y a radiografía. A pesar de la tecnología disponible y el creciente conocimiento sobre estas patologías, se dan casos de pacientes que presentan diagnóstico de EII pero que no pueden ser formalmente clasificados en ninguna de las dos presentaciones clínicas antes descritas. Se habla en estos casos de colitis indeterminada [118].

De un modo comparativo entre EC y CU, la CU presenta una incidencia superior (16), estable en los últimos años. No obstante, la EC está viendo incrementada su incidencia fundamentalmente en aquellos países que inicialmente presentaban menos casos.

Distinto factores definen la epidemiología, entre ellos cabe destacar:

- Localización geográfica. Los mayores casos de incidencia se registran en países desarrollados, destacando norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica. Sin embargo, aquellos que tradicionalmente presentaban una tasa baja, sur de Europa, Asia y África, están sufriendo un alarmante incremento en las últimas décadas. Una de las posibles causas justifica la existencia de un gradiente norte-sur (17), en función del nivel de desarrollo económico, que relaciona el modo de vida de los países desarrollados su impacto sobre un plausible exceso de higiene [119], y la respuesta exacerbada frene a la exposición antigénica tardía, teoría aplicada también a alegrías y procesos inflamatorios e infecciosos. Otra de las teorías avala el gradiente este-oeste (20,21), donde se asume que la presión que dirige el gradiente la ejercen los hábitos alimentarios. Tradicionalmente, los países orientales han seguido una dieta más sana y la incidencia de EII ha sido baja. En las últimas décadas, y paralelamente la occidentalización de la

dieta en países como Japón o Corea del Sur, se está produciendo un notable aumento de la incidencia de EII, que apoya por tanto esta teoría.

- La edad parece ser un factor importante en el momento de la instauración de la enfermedad. Mientras que la EC tiene un pico de máxima incidencia el comienzo de la madurez, entre los 20-40 años, la CU lo posee alrededor de los 60 (22). En la última década se está produciendo un repunte considerable en la incidencia de la EII en la edad pediátrica, principalmente EC [120], e independiente de la zona geográfica considerada [121-125]. Este fenómeno está suscitando un gran interés, debido a que se trata de un desorden de naturaleza crónica y un inicio tan temprano de este supone un impacto importante sobre la calidad de vida del paciente afectado durante muchos años.
- La influencia atribuida al sexo es relativamente pequeña en la instauración y severidad de la EII. Aunque sutiles, las diferencias apuntan una mayor afectación en la mujer por EC y en el hombre por CU. (29,39).
- Raza. Los datos epidemiológicos no permiten siquiera cuestionar que la afectación de la raza caucásica es muy superior a la raza negra, aunque existe un sesgo importante que ha de considerarse. Hay que destacar que la mayoría de la población negra mundial se localiza en África, donde el bajo nivel socioeconómico es predominante. De hecho, estudios realizados han demostrado una susceptibilidad a la EII comparable entre las razas negra y caucásica, cuando todos los individuos siguen un estilo de vida occidental comparable. En este caso, en el que factores como la dieta, los hábitos higiénico-sanitarios y por ende la exposición antigénica temprana y a lo largo de la vida de los pacientes objeto de estudio son comparables, dicha asociación desapareció completamente, lo que permite inferir un papel predominante de este tipo de factores sobre el fenómeno que aquí se discute ([126]).

Un caso en el que la asociación entre la raza y una mayor susceptibilidad a la EII se encuentra plenamente aceptada es el de la raza judía. Diversos estudios, focalizando sobre la incidencia de EII en la población judía en diferentes localizaciones geográficas (Israel, EEUU o Europa), han arrojado datos que confirman ligeras variaciones en función de la localización geográfica, y en cualquier caso, una asociación significativa entre la condición judía y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en comparación con cualquier otra raza [127-129]. Dicha asociación es tan fuerte, que el alto nivel socioeconómico que históricamente ha poseído la población judía no puede llegar a justificar los

datos epidemiológicos encontrados, por lo que los factores estrictamente genéticos parecen ser los responsables [130].

- Procesos de carácter infeccioso. Debido a la influencia de la microbiota en la modulación e inmunocompetencia del sistema inmunitario gastrointestinal, ha existido la sospecha de que determinados procesos que afectasen la mucosa intestinal podrían actuar como factor desencadenante de la respuesta inflamatoria autoinmune propia de la EII. En línea con este concepto, se han realizado estudios sobre la influencia que la colonización del tracto gastrointestinal por parte de bacterias del género *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* o *Listeria monocytogenes*, pudiera tener como factor desencadenante de la EII [131-134]. Un resultado interesante es el que en ratones asocia la infección con *Mycobacterium avium* con una inflamación similar a la enterocolitis necrotizante [135]. Por otro lado, se han focalizado muchos esfuerzos en dilucidar si bacterias con especial capacidad de adhesión a la superficie del epitelio intestinal, como *E. coli* con capacidad adherente e invasiva, o especies del género *Fusobacterium* [136, 137] pudieran jugar un papel relevante en ese sentido. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de ellos ha conseguido establecer una relación causa–efecto consistente, aunque aún hay investigadores que tienen grandes esperanzas en encontrar resultados concluyentes sobre todo con las cepas de *E. coli* enteroinvasivas, ya que tienen especial capacidad de invasión y replicación en el interior de macrófagos [138] y de adhesión a enterocitos, además de ser preferentemente aisladas de la mucosa de pacientes con EC en comparación con individuos sanos [139, 140]. Sorprendentemente, la presencia de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal se asocia con un cierto papel protector ante el desarrollo de la EII [141], aunque hay resultados controvertidos en ese sentido [142]. Esto no hace más que reflejar el complejo equilibrio existente entre la microbiota y el SI gastrointestinal, y como la composición en términos cualitativos de la primera parece ejercer un papel funcionalmente relevante en la homeostasis intestinal, siendo este un concepto que será tratado de un modo más extenso en capítulos sucesivos.

2.2. Etiología

En la actualidad la EII sigue siendo considerada una afección de carácter idiopático en la medida que el conocimiento de su fisiopatología sigue basado en

postulados meramente hipotéticos. No obstante, la teoría sobre su génesis que hoy por hoy cuenta con un mayor grado aceptación postula que se produce una respuesta inmunológica exacerbada fundamentalmente localizada en la mucosa gastrointestinal y el *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT) ante antígenos procedentes de la microbiota entérica y en pacientes genéticamente predispuestos. Además esta respuesta inflamatoria que adquiere un carácter crónico, sufre una relevante modulación por parte de diversos factores ambientales. De este modo, se puede establecer que la evolución fisiopatológica de la EII está basada en una compleja interacción de factores genéticos e inmunológicos, los cuales son detalladamente descritos a continuación.

2.2.1. Factores genéticos

La conciencia de una base genética en la EII comienza a desarrollarse en la década de los años 30, escasos años después de que el Dr. Crohn describiese detalladamente esta patología. La relevancia de la genética como un elemento subyacente importante en el desarrollo de la EII resulta evidente atendiendo, por un lado, a la elevada tasa de agregación familiar observada, y por el otro, a la mayor susceptibilidad mostrada en la población judía.

El fenómeno de la agregación familiar en la EII es tal que presentar un historial familiar positivo para la enfermedad es hoy en día el factor de riesgo independiente a considerar más relevante. En el caso de la EC, esta asociación es mayor que para la CU, siendo el riesgo de desarrollar EC ante un caso positivo en un familiar de primer grado, de hasta el 35% [143, 144]. Además, los datos epidemiológicos que se han obtenido realizando estudios de tipo familiar, demuestran una relación de susceptibilidad no solo de forma directa para EC y CU, sino también cruzada entre ellas, de forma que existe un mayor riesgo de padecer ambas presentaciones clínicas en la familia predispuesta con un miembro ya diagnosticado, independientemente de qué presentación clínica presente este último [145-148]. Sin embargo, la evidencia más consistente acerca de la influencia de la predisposición genética en el desarrollo de cualquiera de las presentaciones clínicas de la EII, proviene de estudios realizados con gemelos monocigóticos [149, 150]. No obstante, incluso en este caso caracterizado por una total analogía genética, no se obtiene un 100% de concordancia respecto al desarrollo de la patología en ambos individuos, lo cual da idea del carácter multifactorial de ésta y de lo significativo de la contribución relativa de los factores ambientales en el inicio de la misma [151-153].

Actualmente está plenamente aceptado que el modelo de herencia genética que mejor se ajusta a las características fisiopatológicas de la EII, a la estrecha relación existente entre los dos cuadros clínicos en los que se puede presentar y principalmente a la ingente cantidad de datos epidemiológicos recogidos hasta la fecha, es uno de tipo multi-*locus* u oligogénico. En este sentido, desde hace ya unos años se está realizando un importante esfuerzo investigador orientado a la descripción de las variantes genéticas que se asocian con una modificación significativa de la susceptibilidad a la enfermedad. Idealmente, estas investigaciones podrían ser relevantes en el campo de la clínica mediante el uso de la terapia génica, pero hasta ahora esta es una aproximación que no está dando más que sus primeros pasos. Estudios recientes, basados en la realización de *genome-wide association study* (GWAS) han elevado el número de *loci* asociados con la EII hasta unos guarismos que ya superan los 160, estando muchos de ellos a su vez relacionados con otros desórdenes de carácter autoinmunitario como la espondilitis anquilosante y la psoriasis, así como con una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias [154]. Al tratarse de una patología con una influencia genética de tipo oligogénico, no se ha podido describir ningún *locus* cuya existencia sea suficiente para inducir el desarrollo de la EII como es lógico, aunque con el tiempo se ha conseguido identificar qué genes dentro de un determinado *locus* son los responsables al verse alterados, de los cambios de tipo funcional en el organismo del individuo en cuestión que justifican su mayor susceptibilidad a la patología.

Teniendo en cuenta la etiología mayoritariamente aceptada en referencia a la EII, según la cual se origina como consecuencia de una respuesta inflamatoria exacerbada ante antígenos de la microbiota intestinal, siendo posteriormente dirigido dicho proceso inflamatorio esencialmente por células T CD4. No es extraño que muchos de los genes para los que los estudios por GWAS han demostrado asociación para algunas de sus variantes con la EII, estén relacionados con la regulación de fenómenos cruciales en las respuestas inmunitarios en condiciones basales y en inflamación en el tracto gastrointestinal, destacando por un lado la percepción microbiana a través de PRR, la eliminación de bacterias y sus antígenos por fagocitosis, su posterior presentación en el contexto de MHC y por último el desarrollo de las respuesta inmunitarios adaptativas.

El gen NOD2/CARD15 es probablemente el que hasta el momento ha sido más detalladamente estudiado en este sentido, principalmente por la gran fuerza de asociación que ha mostrado respecto a la EC [155]. Este gen se localiza en el

cromosoma 16 y codifica una proteína esencial en uno de los NLR más relevantes, por lo que una alteración en su secuencia que implique una alteración significativa en la funcionalidad de la proteína final, va a generar un cambio sustancial en la percepción del MDP de naturaleza bacteriana como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*), siendo esto relevante en células como las presentadoras de antígenos (APC) y principalmente las células de Paneth. A día de hoy han sido descritas tres mutaciones en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007insC), las cuales en términos patológicos se relacionan con inflamación localizada en íleon y en ningún caso en colon, lo que justifica que dicha asociación quede restringida a la EC [156, 157].

Por otro lado, otro gen cuya mutación se ha mostrado fuertemente asociada con la EII, en sus dos presentaciones clínicas en este caso, es el codificante para la subunidad específica del receptor de la IL23 (IL23R). Este gen está localizado en el cromosoma 1, presenta varias mutaciones que determinan cambios sustanciales en la susceptibilidad a la EC y la CU, aunque en menor medida para la segunda [154]. La comprensión de la relevancia biológica de la señalización de la IL23 en la homeostasis del SI gastrointestinal es importante para entender el modo en que estas mutaciones modifican la susceptibilidad a la enfermedad. La IL23 es producida fundamentalmente por macrófagos y células dendríticas, mientras que el receptor lo expresan estas mismas células sobre las cuales aumenta su actividad como APC y su producción de citoquinas como la IL27, cuyo gen codificante situado en el cromosoma 16, también es de susceptibilidad para EC y CU, así como otras células innatas como las células NK y las ILC. El IL23R también regula estrechamente la producción de IL17 e IL22, dado que lo expresan las células Th17 que a su vez juegan un papel muy relevante en la fisiopatología de la EC, justificándose así como aquellas variantes genéticas que generan un receptor menos sensible a la IL23, tienden a implicar cierta protección ante la EC [158, 159], mientras que las de mayor sensibilidad como la rs1004819 se encuentran fuertemente asociadas con la esta patología [160]. Este hallazgo se vio posteriormente refrendado por algunos estudios con animales de experimentación, haciendo uso del modelo de colitis inducida por DSS, aunque con una doble vertiente en función de que consideremos la inmunidad innata en exclusiva o el animal inmunológicamente completo [161] y mediante el uso del modelo de colitis espontánea en animales IL10 KO que es dependiente de la presencia de macrófagos para su desarrollo en la medida que estos producen IL12 e IL23 [162]. Otro gen que presenta variantes con fuerte asociación a la EII en

general es el CD40 (cromosoma 20), derivado de una alteración en la homeostasis en la sinapsis inmunológica [163].

Por último, hay múltiples genes de susceptibilidad a la EII que tienen dicho estatus precisamente porque codifican proteínas decisivas en el desarrollo de las respuestas adaptativas a nivel sistémico, y en la mucosa intestinal en particular. En línea con este concepto, en los genes STAT3 (cromosoma 17), IL2RA (cromosoma 10), IL12B (cromosoma 5) e IL18R1 (cromosoma 2) se han encontrado variantes asociadas a la EC y/o CU [164]. Incluso el gen codificante de la propia IL10 (cromosoma 1) tiene variantes con asociación a EC y CU al verse afectado el papel inmunoregulator de dicha citoquina [165]. Independientemente de los genes con variantes asociadas a la EII funcionalmente relacionados con el SI, existe un grupo de ellos con fuerte asociación también y que intervienen en la regulación de la autofagia, destacando entre ellos el polimorfismo (rs2241880) del gen ATG16L1 (cromosoma 2), que se encuentra muy asociado con la localización ileal de la EC [166]. En concreto, la mutación *T300A* se asocia con una menor capacidad fagocítica y para la destrucción de antígenos bacterianos por parte de los fagocitos, y con una menor producción de péptidos antibacterianos por parte de las células de Paneth [167]. Precisamente fue el hallazgo de estos genes implicados en la autofagia, el factor iniciador de corrientes de investigación focalizadas en dichos procesos, que con posterioridad han resultado muy fructíferas en el campo de la gastroenterología básica [168].

2.2.2. Factores ambientales

Composición cualitativa de la microbiota intestinal

La convivencia que se establece en el tracto gastrointestinal en su tercio distal entre la mucosa intestinal y una enorme cantidad de agentes microbianos, desde un principio hizo sospechar sobre la relevancia de una distorsión en el equilibrio que se establece entre ambos interlocutores como una causa subyacente relevante en el desencadenamiento de la inflamación intestinal crónica. El principal factor desequilibrante sobre el diálogo bidireccional que se establece entre la mucosa intestinal y la microbiota es la pérdida de tolerancia inmunológica por parte de agentes celulares comprendidos en el SI innato. No obstante, en los últimos años ha aumentado exponencialmente el interés que suscita la composición cualitativa de la microbiota intestinal como un factor influyente al menos en parte en dicho desequilibrio, aunque tal y como se ya se ha comentado,

no se ha podido establecer aún una asociación directa entre la infección del tracto gastrointestinal con un determinado agente bacteriano y la instauración de la EII.

Los hallazgos que inducen a pensar en un papel destacado de la composición de la microbiota en la inflamación intestinal crónica son, por un lado, la estricta dependencia de la presencia de esta para el normal desarrollo del proceso inflamatorio en varios modelos de colitis espontánea, la descripción de cierta disbiosis intestinal típicamente asociada a los pacientes con EII, y finalmente, el profundo conocimiento que se posee actualmente acerca de la eficacia de diversos enfoques terapéuticos que se basan en la modificación de la microbiota intestinal, destacando el uso de prebióticos, probióticos y los trasplantes de microbiota fecal [169].

La disbiosis intestinal que se asocia con la EII se puso de manifiesto gracias al desarrollo del programa del “microbioma humano”, que permitió conocer la existencia de cierta microbiota típicamente asociada a la inflamación intestinal crónica [170]. Esa disbiosis se caracteriza por una significativa reducción en la diversidad bacteriana, siendo infrecuente encontrar bacterias de los géneros *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum*, con buena representación en condiciones normales [171, 172]. Del mismo modo, se ha estudiado la microbiota en la mucosa de pacientes con EII de forma comparativa entre una fase inflamatoria y otra no activa de la enfermedad, pero no se han encontrado resultados concluyentes en una dirección concreta, aunque parece que esas diferencias se dan con mayor asociación con la EC en comparación con la CU [173, 174]. Independientemente de la ya citada reducción en la diversidad bacteriana, no se ha podido establecer un patrón cualitativo en la microbiota intestinal que se asocie con la EII, principalmente porque cada individuo tiene el inherente a su biología, entorno en que habita y hábitos higiénico – sanitarios. Sin duda alguna, la gran cuestión que permanece sin recibir respuesta por parte de la comunidad científica, es si dicha disbiosis es causa o simplemente una consecuencia de la inflamación crónica intestinal. Las evidencias con las que se cuenta actualmente invitan a pensar preferentemente en la segunda posibilidad, de forma que sería la susceptibilidad genética del hospedador unida a diferentes factores ambientales la que determina un desequilibrio en el modo en que interpreta y responde el SI intestinal ante los antígenos provenientes de una microbiota en principio normal. En este contexto inflamatorio, se produce una alteración importante en la producción de muchos mediadores solubles producidos por el hospedador y que contribuyen al equilibrio en el diálogo

bidireccional que la mucosa intestinal establece con la microbiota, justificándose de esta manera una disbiosis sobrevenida de forma secundaria a una inflamación pre-existente. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las variantes genéticas con mayor fuerza de asociación con la EII se encuentren en genes que codifican proteínas que de un modo más o menos directo están implicadas en el reconocimiento y la respuesta ante antígenos presentes en la luz intestinal, caso de NOD2, IL23R o ATG16L1 antes descritos, hace que no se pueda descartar la posibilidad de que alteraciones cualitativas en la microbiota colaboren al menos en parte en la instauración de la inflamación intestinal [175-178].

El uso de prebióticos y probióticos para tratar de alargar los períodos de remisión en los pacientes de EII viene de largo tiempo atrás, dado que esta aproximación terapéutica ha sido explorada extensamente en modelos preclínicos en décadas pasadas y su implementación en la clínica obtuvo resultados razonablemente buenos. El mecanismo de acción de estos consiste fundamentalmente en promover el crecimiento selectivo de bacterias beneficiosas, o bien en aportarlas directamente, de forma que estas se conviertan en una población mayoritaria dentro de la mucosa intestinal. Algunos de los prebióticos de mayor uso y que hoy en día forman parte de productos tan diversos como fórmulas de nutrición infantil o piensos animales, son la inulina y otros fructo-oligosacáridos de cadena más corta, los cuales han mostrado un efecto beneficioso en la colitis experimental y sobre pacientes con EII, al parecer mediante un aumento selectivo de la presencia de bacterias del género *Bifidobacterium* en la microbiota, pero al parecer también mediante efectos directos sobre las células epiteliales intestinales de un modo independiente de su efecto prebiótico, tal y como hemos puesto de manifiesto en mi grupo de investigación [179]. Las investigaciones realizadas haciendo uso de probióticos son muy extensas, lo que hace que el interés investigador en este campo esté decreciendo en los últimos años. Uno de los muchos ejemplos que se puede destacar en este sentido es el efecto beneficioso de *E. coli* Nissle 1917 en el mantenimiento de remisión en pacientes con CU [180], pero la lista de bacterias usadas como probióticos hoy en día es realmente extensa, incluyendo especies de géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* o *Saccharomyces*.

Un trasplante de microbiota fecal se define como la transferencia de materia fecal de un donante sano a un receptor enfermo, con intención de restaurar la normalidad en la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota del segundo para conseguir un beneficio clínico [181]. Desde la segunda mitad del

siglo pasado este procedimiento ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de la infección intestinal por *Clostridium difficile* o la colitis pseudomembranosa pero en los últimos años está tomando relevancia como opción a considerar en el tratamiento de la EII, cuando esta se muestra refractaria a los tratamientos convencionales. Esta opción terapéutica ha mostrado resultados prometedores tanto en EC como en CU [182, 183], aunque el número de pacientes incluidos en estos estudios es aún muy bajo hay varios ensayos clínicos actualmente en curso que ayudarán a clarificar su posible utilidad en el manejo clínico de la EII.

Estrés

Con el conocimiento detallado del sistema nervioso entérico y las funciones fisiológicas de cuyo control se encarga en el contexto del tracto gastrointestinal, como la motilidad, el transporte hidroelectrolítico y la microcirculación [184], comenzó a considerarse que la EII podía tener un componente psicósomático relevante [185-187]. Las investigaciones en este aspecto han terminado por definir al estrés como un factor escasamente implicado en la iniciación de la EII, pero que parece ser importante en cuanto a precipitar la recidiva de un paciente en remisión. La base fisiológica que fundamenta esta asociación recae por un lado en un aumento de las descargas de naturaleza colinérgica en dicho sistema nervioso entérico que se traduce en un aumento de la motilidad intestinal [188, 189] y de la secreción hidroelectrolítica [190], y por el otro en un aumento de los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y por ende de cortisol. Niveles elevados de CRH y cortisol sistémicos ejercen efectos inmunomoduladores que pueden alterar la homeostasis intestinal. Cabe destacar que la CRH actuando sobre mastocitos produce la liberación de múltiples mediadores solubles que comprometen la función de barrera intestinal (FBI) al aumentar significativamente la permeabilidad transcelular [191]. Además la administración de un bloqueante inespecífico de los dos subtipos receptoriales para la CRH presenta un efecto antiinflamatorio consistente en un modelo de colitis inducida por la administración de la toxina A de *Clostridium difficile* [192]. Por otro lado, existen múltiples evidencias experimentales que relacionan la exposición crónica de roedores a diferentes modelos de estrés con una mayor susceptibilidad al modelo de colitis inducida por DSS [193-195]. Atendiendo a estas evidencias, se han realizado algunos estudios epidemiológicos tratando de establecer una conexión entre el éxito terapéutico en el control del estrés o la ansiedad y una menor tendencia a la recidiva en pacientes con EII, pero no se han obtenido resultados concluyentes en ningún sentido [196-198].

Dieta

El epitelio intestinal se encuentra en íntimo contacto con los componentes de la dieta, los cuales constituyen, tras la microbiota intestinal, la fuente principal de antígenos lumenales, por lo que la importancia de la tolerancia inmunológica del SI gastrointestinal respecto a éstos es tan importante.

Hasta la fecha se han realizado multitud de estudios, todos arrojando resultados negativos, orientados al establecimiento de relaciones de causalidad entre el consumo de alimentos como la leche y otros productos lácteos, cereales, margarina e incluso bebidas refrescantes carbonatadas, con una mayor susceptibilidad a la EII. En general, todos estos estudios han tratado de relacionar la dieta occidental, caracterizada por un desequilibrio nutricional a favor de los hidratos de carbono, con una mayor incidencia de EII. De hecho, hay algunos estudios que han conseguido encontrar cierta asociación con una mayor incidencia de CU [199, 200]. Un desequilibrio en el componente lipídico de la dieta y del balance cualitativo de los ácidos grasos del mismo, podría ser la causa subyacente de dicho fenómeno [201, 202], en la medida que existen estudios que apuntan a un efecto beneficioso de los ácidos grasos ω -3 en la inflamación intestinal [203-207].

La lactancia materna reduce significativamente en el lactante el riesgo de padecer tanto EC como CU [208, 209]. Diversos mecanismos pueden explicar al menos en parte esta asociación, destacando por un lado la composición rica en proteínas y oligosacáridos con capacidad inmunoestimulante [210], su riqueza en TGF- β que promueve la polarización de células T CD4 hacia el subtipo Treg que promueve la tolerancia antigénica [211], su alto contenido en sIgA y en CD14 soluble que contribuye a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal del lactante [212-214], la microbiota que aporta de forma directa y que colabora en la conformación de una adecuada diversidad bacteriana en el intestino del neonato [214], e incluso el refuerzo directo de la FBI debido al efecto de algunos péptidos contenidos en ella que aumentan la expresión de claudina 4 o la ocludina [215, 216]. Además, hay que considerar que la leche materna contiene una cantidad significativa de cortisol que favorece la maduración final del sistema gastrointestinal del neonato. Finalmente, es importante tener en cuenta que la realización de la lactancia materna completa implica un retraso en la introducción de la leche de vaca, lo que puede influir en el riesgo de forma independiente [217, 218].

Hasta el momento, no se ha podido establecer una relación causa - efecto consistente que relacione de un modo incontrovertible la aparición de algún tipo de alergia alimentaria o la concurrencia de algún factor dietético, con un mayor riesgo de padecer alguna de las presentaciones clínicas de la EII.

Tabaco

El único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son lo suficientemente concluyentes para establecer una relación directa y fiable con una mayor o menor susceptibilidad a la EII es el tabaco. En concreto, está establecido un papel protector del consumo de tabaco respecto al desarrollo de CU [219, 220], siendo el porcentaje de fumadores entre los pacientes de CU solo del 10-15% [221]. Por el contrario, este mismo factor se asocia con un riesgo elevado ante el desarrollo de EC y con un peor pronóstico en los casos en los que ésta ya se ha diagnosticado [222-225]. El efecto protector mostrado por el tabaco en la CU parece deberse a los múltiples efectos inmunomoduladores de la nicotina, que ha mostrado efectos antiinflamatorios disminuyendo la producción de citoquinas como la IL8 o la IL1 β [226], entre otros [227, 228].

Apendicectomía

En la actualidad está descrita una disminución de la incidencia de la CU, una aparición más tardía de ésta y un perfil de enfermedad menos agresivo, así como una menor tasa de recidivas, entre los pacientes sometidos a apendicectomía, sobre todo si la intervención se produce durante las primeras etapas de la vida [229-234].

2.3. Inmunología de la EII

El tracto gastrointestinales la superficie del organismo humano expuesta al medio externo de mayor extensión (alrededor de 200 m²). Siendo el objeto principal del SI diferenciar lo propio de lo ajeno, el tracto gastrointestinal va a estar sometido a una enorme presión antigénica difícil de controlar, al tiempo que ha de preservar la habilidad de digestión y absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos a través de la mucosa[175]. El reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos, al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos. A menudo, se utiliza el término "inflamación fisiológica" o "inflamación controlada" para referirnos al estado basal de activación del SI gastrointestinal, aunque se trate realmente de un oxímoron.

Para ello, el SI gastrointestinal se sirve de una serie de componentes heterogéneos, incluyendo desde las células que componen la pared intestinal hasta las integradas dentro de los órganos linfoides asociados al tejido intestinal GALT. Asimismo, encontramos un elevado número de células de naturaleza tanto linfoide como mieloide, conformándose de este modo un sistema de gran complejidad en cuanto a su regulación. Todo ello se encuentra a su vez favorecido por el peristaltismo intestinal, el cual, favoreciendo la motilidad, impide la adhesión mantenida de un determinado microorganismo sobre un pequeño espacio de la mucosa intestinal, reduciendo el riesgo de invasión.

Para entender de qué manera el SI intestinal está alterado en EII, primero es necesario conocer su funcionamiento en condiciones fisiológicas.

2.3.1. Homeostasis inmunológica en el intestino sano

Microbiota intestinal y tolerancia oral

Las bacterias comensales son capaces de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales tales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera mucosal, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal [153]. Esta relación simbiótica se establece durante los primeros 2 o 3 años de vida. La composición de la microbiota está influenciada en primer lugar por la madre (parto vaginal o cesárea, tipo de lactancia y factores genéticos), y en segundo lugar por factores higiénico-ambientales. Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y hacia los antígenos procedentes de la dieta no están del todo esclarecidos y engloban una complicada red de factores anatómicos, celulares y humorales, que previenen la respuesta inmunológica contra estos antígenos, los cuales sí que desencadenarían una respuesta inflamatoria si fueran presentados al SI por una vía no oral [235]. Durante la colonización de la microbiota tiene lugar gran parte de la tolerancia oral.

Barrera epitelial

La barrera epitelial está compuesta por una monocapa celular heterogénea en cuanto a la naturaleza y especialización funcional de las células que la forman.

Todas ellas provienen de células madre pluripotenciales localizadas en las criptas de Lieberkühn [236], las cuales proliferan continuamente permitiendo su propia renovación, que se completa en un periodo de 2-5 días [237]. De este modo se generan unas células que van a ir escalando dentro de la monocapa en dirección al borde apical. Paralelamente a la proliferación en sí misma van a sufrir un proceso de maduración selectiva estrechamente regulado por factores como la señalización de glucocorticoides tanto de origen adrenal como local intestinal [238], diversos elementos solubles como las señales WNT [239, 240] y las señales NOTCH [241], que deben estar proporcionados entre sí [242], y la propia señalización por parte de los antígenos de la microbiota comensal. Este proceso de transición progresiva desde un estado proliferativo hacia un estado madurativo-diferenciado, terminará dando lugar a los tipos celulares que componen el epitelio de la mucosa intestinal: enterocitos o células entero-absortivas (IECs, *intestinal epithelial cells*); células caliciformes, productoras de moco; células de Paneth, destacadas por la secreción de péptidos antimicrobianos; y células enteroendocrinas, que son capaces de producir hormonas que conectan el tracto gastrointestinal con el sistema nervioso entérico.

Justo bajo el epitelio intestinal, a nivel de la *lamina propria*, podemos encontrar células estromales, células B (específicamente células plasmáticas productoras de IgA), células T (linfocitos de la *lamina propria*), macrófagos y células dendríticas. Además, subpoblaciones especializadas de células T (linfocitos intraepiteliales) y algunas células dendríticas se localizan entre las IECs, estratégicamente posicionadas para detectar el contenido luminal [243-245] (Imagen 1).

El movimiento de sustancias a través del epitelio intestinal se produce tanto por un transporte transcelular, mediante bombas y canales de membrana específicos, como paracelular, controlado por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas (*tight junctions*), las cuales además mantienen la estructura polarizada de las IECs [246].

Originariamente se pensaba que la mucosa intestinal, y en general el epitelio, funcionaban únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IECs, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no sólo tolera la presencia de moléculas tipo PAMP procedentes de bacterias comensales sino que además, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la FBI [247].

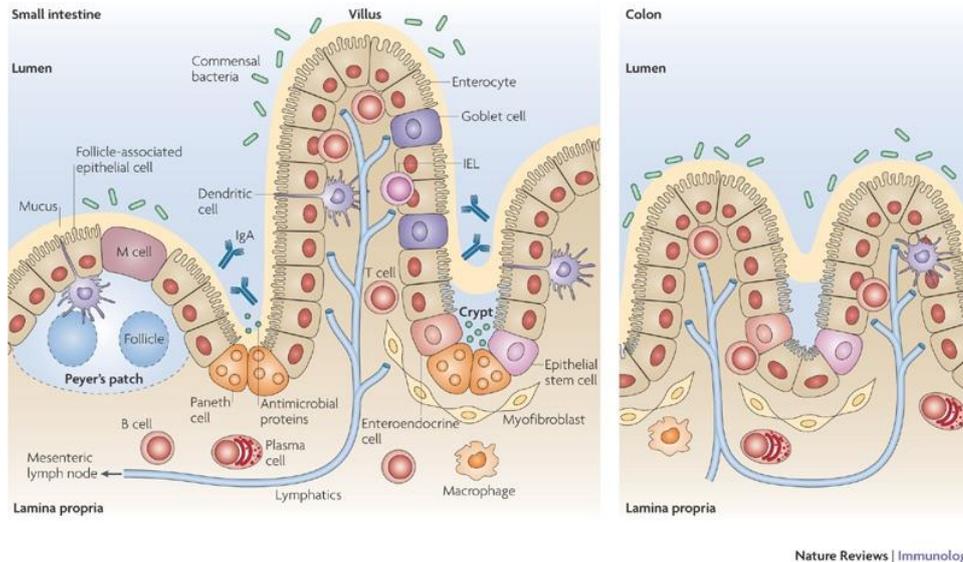


Imagen 1: Anatomía del sistema inmune intestinal.

Reconocimiento antigénico e inmunorregulación

El reconocimiento y procesamiento de antígenos luminales comienza a nivel epitelial [248]. El epitelio intestinal expresa de forma constitutiva varios tipos de receptores con una estructura conservada evolutivamente, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR; *pattern recognition receptor*). Estos receptores son capaces de reconocer moléculas con componentes microbianos específicos (PAMPs) tales como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico, RNA de doble y simple hebra o DNA metilado (CpG), que son específicos de patógenos o, más exactamente, de microorganismos ajenos a nuestra constitución bioquímica. Las tres grandes familias de PRR incluyen los TLR (receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*), los NLR (receptores tipo NOD - *nucleotide-binding-oligomerisation-NOD-like receptors*) y los RLR (receptores tipo RIG; *RIG-1-like receptors*).

Los TLR reconocen patógenos a nivel de la membrana celular y en endosomas (Imagen 2), mientras que NLR y RLR los detectan en el citosol, sugiriendo que efectivamente los antígenos patógenos pueden evadir su propio reconocimiento a nivel de la membrana celular.

Los TLR fueron descritos por primera vez en la mosca de la fruta [249, 250]. Los 10 a 15 receptores (dependiendo de la especie) identificados hasta ahora están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de

reconocer la mayor parte de PAMPs. Con la intención de estudiar la relación entre IECs y bacterias comensales, muchos trabajos han intentado dilucidar si el epitelio intestinal expresa TLR en condiciones fisiológicas y, de ser así, si esta expresión en el epitelio es espacial o regional. La expresión de TLR específicamente en IECs resulta difícil de determinar usando tejidos intestinales completos debido a la presencia de otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células estromales, que también expresan TLR. Por ello, técnicas como inmunohistoquímica, separación enzimática de células epiteliales intestinales o microdissección por captura láser han sido utilizadas para demostrar que TLR2 y TLR4 son expresados débilmente por IECs en tejidos sanos de colon humano [251-253]. El TLR3 parece estar abundantemente expresado en intestino delgado y colon humano sano, mientras que el TLR5 está expresado predominantemente en el colon [252]. Casi todos los TLR, sin embargo, están expresados a nivel de RNA mensajero (mRNA) en colon humano. La expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 también fue detectada en IECs de intestino delgado humano [251].

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. IECs procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de TLR4 y similar o baja expresión de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 [252, 254-256]. Por otro lado se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias regulan la expresión de TLR en IECs [256-259] lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro [260]. Estudios recientes muestran que IFN- γ y T β α inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor LY96 (lymphocyte antigen 96, también conocido como MD2) [256, 258], mientras que IL-4 y IL-13 disminuyen la respuesta de las IECs al LPS, ligando del TLR4, sugiriendo que las citoquinas tipo Th2 disminuyen la expresión de TLR4 por IECs [257, 261]. Estudios que comparan ratones libres de gérmenes (*germ-free*) con ratones convencionales indican que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5) [262]. Mediante inmunohistoquímica se ha detectado la expresión de TLR9 en la cara apical del borde en cepillo de colon de ratones con microbiota entérica, pero no en ratones libres de gérmenes [263].

La expresión de TLR en el intestino está también regulada de forma espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral. Aunque la expresión de TLR2 y TLR4 es baja en colon adulto normal [252], TLR4 se expresa intensamente en la cara apical de IECs colónicas procedentes de pacientes con EC, aunque no con CU [252]. El análisis de IECs polarizadas humanas *in vitro* indica que TLR5 se expresa solamente en la cara basolateral, donde puede desencadenar la producción de citoquinas y quimioquinas en respuesta a flagelina basolateral

[264-266]. En consecuencia, la flagelina luminal sólo podría activar al TLR5 tras daño en la barrera epitelial [266]. Sin embargo, otro estudio indica que TLR5 está presente en la cara apical de íleon de ratón [267]. En cuanto al TLR9, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- κ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical del TLR9 inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (*cross-tolerance*). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada [265].

Estas respuestas divergentes de los TLR en función de la exposición apical o basolateral al ligando son consistentes con la hipótesis de que las respuestas inflamatorias y potencialmente destructivas de los TLR hacia los PAMPs sólo deben ocurrir cuando se ha producido una brecha en la barrera epitelial, o en general cuando se necesita una inmunológica inmediata.

Tras el reconocimiento antigénico, los TLR desencadenan una respuesta tanto innata como adaptativa, mediante vías de señalización intracelulares que culminan en la activación de factores de NF- κ B o mitógeno activated protein kinase (MAPK), lo que induce la producción de citoquinas proinflamatorias. En ausencia de patógenos, la interacción de los TLR con la microbiota está relacionada con la proliferación de células epiteliales, la producción de IgA, el mantenimiento de las uniones estrechas y la expresión de péptidos antimicrobianos, contribuyendo así a la homeostasis intestinal y al mantenimiento de una barrera epitelial intacta [244].

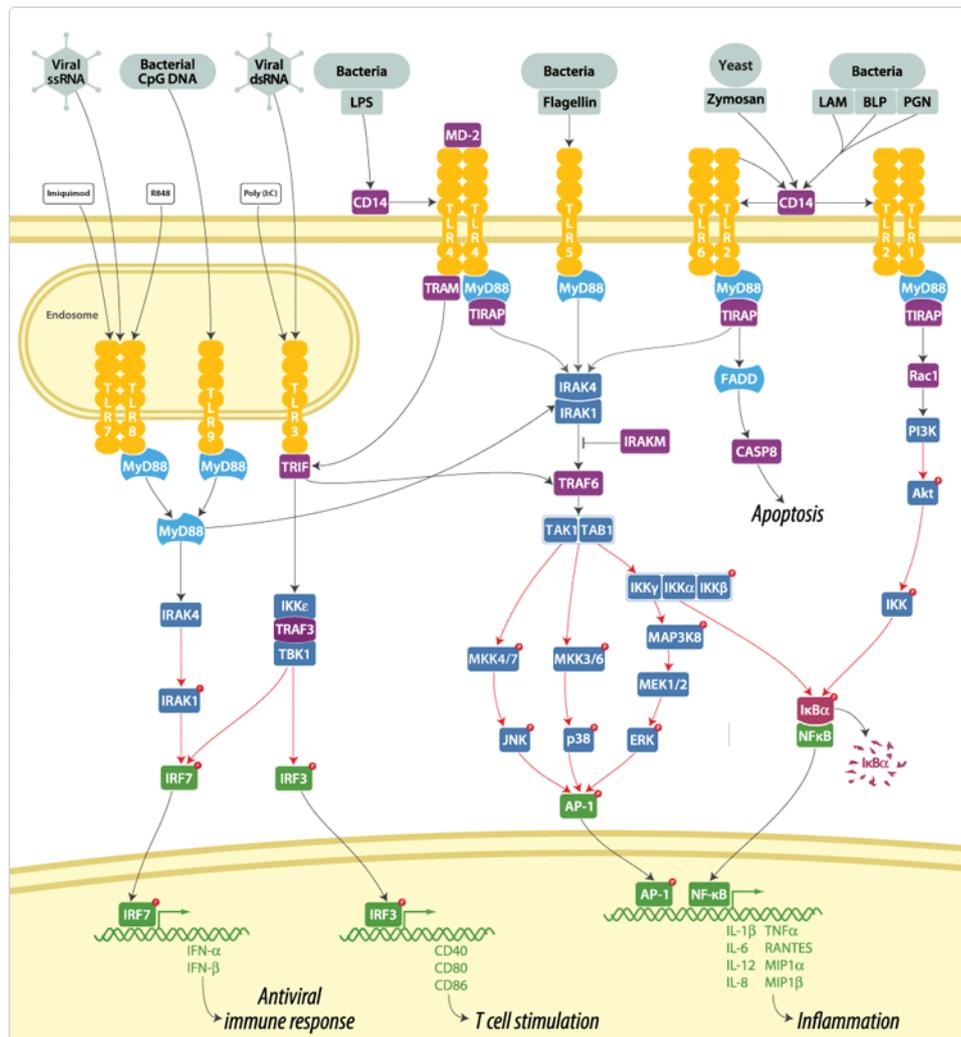


Imagen 2: Reconocimiento de PAMPs por los diferentes TLR.

Los NLR proporcionan mecanismos de defensa adicionales en la mucosa intestinal [268, 269]. NOD1 y NOD2 están expresados en el citosol de células presentadoras de antígenos expuestas a patógenos que contienen peptidoglicano [270]. A nivel basal, la expresión de NOD1 y NOD2 en células epiteliales intestinales es baja o nula, aunque esta expresión se incrementa en casos de inflamación o en presencia de citoquinas proinflamatorias [271, 272]. En el intestino delgado, los mayores niveles de expresión de NOD2 se dan en células de Paneth [273, 274]. En modelos de sobreexpresión de NOD2, la estimulación con muramildipéptido se traduce en la activación de NF- κ B, lo que, junto con la habilidad de las citoquinas proinflamatorias como TNF- α para activar NOD2, sugiere que éste participa en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos [271, 275, 276]. Sin embargo, últimamente la función de NOD2 es objeto de debate ya que estudios con roedores y humanos han mostrado resultados dispares: tanto una pérdida como una función excesiva del receptor en

células que contienen mutaciones en el gen CARD15 [277]. Específicamente, la función de NOD2 en células epiteliales intestinales está insuficientemente caracterizada, aunque la producción reducida de α -defensinas en ratones con mutaciones en el gen CARD15 sugiere que éste regula la función de células de Paneth [278, 279]. Sin embargo, la importancia de este hecho es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las α -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica [279, 280].

Procesamiento antigénico

Las células M (*villous microfold cells*) funcionan como canales conduciendo los antígenos hacia las APCs, las cuales captan, procesan y dirigen los antígenos hacia tejidos linfoides periféricos subyacentes (placas de Peyer en el intestino delgado y folículos linfoides en el colon) donde se inicia la respuesta inmunológica adaptativa. Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías recientemente revisadas [281]. Así, por un lado podemos encontrar una vía de paso asociada a células caliciformes por otro, las denominadas fugas paracelulares (*paracelular leak*), mediante las cuales antígenos de pequeño tamaño (menores de 10kDa), que no pueden ser captados por células dendríticas de la *lámina propia*, llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde las células dendríticas residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las células dendríticas de la *lámina propia* tienen la capacidad de penetrar por las uniones estrechas de las células epiteliales, exponiendo las dendritas a la luz intestinal adquiriendo la capacidad de reconocer antígenos directamente a ese nivel [282] (Imagen 1). Aunque las células B y los monocitos/macrófagos pueden funcionar como APCs, las células dendríticas son las APCs más eficientes en el cuerpo humano.

Las células dendríticas son células clave en el control de la inmunidad o tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las células dendríticas muestran un fenotipo inmaduro (baja expresión en su superficie de moléculas MHC-II y de miembros de la familia B7: CD80 y CD86) y por tanto inducen una ausencia de respuesta (anergia) en las células T *naïve* (Th0) [283]. Estudios *in vitro* sugieren que las células dendríticas interactúan con ciertas cepas bacterianas probióticas produciendo IL-10, lo que tiende a inducir una respuesta reguladora en lugar de efectora, manteniendo así un equilibrio entre subpoblaciones efectoras y reguladoras a través de una red de

citoquinas altamente controlada [284]. Ante estímulos de bacterias no comensales, las células dendríticas maduran y adquieren un fenotipo activado, expresando altos niveles de moléculas MHC-II y B7 en su superficie, así como moléculas estimuladoras, lo que les permite llevar a cabo las dos señales necesarias para la activación de células T *naïve* hacia células T efectoras [285].

Diferenciación de células T colaboradoras

Tras el procesamiento de los antígenos por las APCs, los péptidos resultantes son presentados a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a las células T *naïve* (Th0), comenzando así su activación seguida de su diferenciación. Dependiendo de la naturaleza del antígeno, éstos provocarán la liberación de un tipo u otro de citoquinas por parte de las APCs y, de la misma manera, en función de la naturaleza de estas citoquinas se producirá la diferenciación a uno u otro linaje de células T colaboradoras. Siguiendo este patrón, las citoquinas IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- α dirigen la polarización de las células T *naïve* (Th0) hacia el subtipo Th1, de modo que cuando estos linfocitos sean activados van a presentar un fenotipo Th1 y producirán elevadas cantidades de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α), las cuales participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; la diferenciación hacia el subtipo Th17 está mediado por IL-6 y cantidades reducidas de TGF- β [286-289]. Estas células presentarán un fenotipo caracterizado por la expresión de IL-17, IL-22 o IL-21, entre otras. La inducción de la respuesta Th2 está dirigida por la IL-4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1, es la principal citoquina implicada en la respuesta Th2, junto con la IL-5 o la IL-13. La diferenciación hacia células Treg, en la que participa de nuevo el TGF- β (aunque liberado en grandes cantidades) hace que, una vez activadas, estas células secreten citoquinas con carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF- β), que tratan de frenar o contrarrestar la reacción inflamatoria, pero que en el contexto de la EII no van a ser suficientes y se van a ver superadas por el carácter proinflamatorio de la respuesta. Con la misma función protectora o antiinflamatoria podemos encontrar las células T pertenecientes al subtipo Th3, que así mismo producen elevadas cantidades de TGF- β . Por otro lado, las citoquinas producidas por las APCs van a presentar por sí mismas carácter proinflamatorio con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lamina propria*, células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la

reacción inflamatoria. Además, la activación de macrófagos y células epiteliales también conlleva la producción de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio [290].

2.3.2. Disfunción del SI intestinal

Actualmente está aceptado que la EII es el resultado de una respuesta inapropiada del SI de la mucosa intestinal hacia la microbiota entérica y otros antígenos lumenales. Cabe preguntarse cómo y por qué estos antígenos inducen una respuesta inflamatoria inapropiada. La evidencia experimental de estudios *in vitro*, con animales y en humanos sugiere que varios eventos individuales pueden iniciar alteraciones inflamatorias cuya perpetuación hará que converjan en una serie de eventos finales comunes (eventos secundarios).

Eventos primarios

En primer lugar, varios estudios han demostrado una menor resistencia epitelial y una permeabilidad incrementada en la barrera epitelial de mucosas de pacientes con EC y CU [291]. Estos defectos preceden al inicio clínico de la enfermedad en pacientes con riesgo familiar [292]. Defectos en la permeabilidad también han sido evidenciados en pacientes sanos con antecedentes familiares de primer grado y con la mutación en el gen CARD15, implicando un defecto genético [293]. Varios mecanismos han sido propuestos como desencadenantes del incremento de la permeabilidad, desde una alteración de las uniones estrechas mediada por células T hasta una disfunción neuronal entérica [291, 294-297].

En segundo lugar, pacientes con EII presentan un SI innato alterado. El TLR3 se encuentra disminuido en EC, pero no en CU. Sin embargo, el TLR4 está significativamente aumentado en ambas [298]. Posiblemente debido a su expresión en la cara basolateral, la expresión de TLR5 está generalmente suprimida en la EII. Sin embargo, en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación [299]. También se ha observado un incremento en la expresión de NOD2 en IECs, lo que puede ser consecuencia de la activación de la cascada de NF- κ B, que puede comprometer la habilidad de la mucosa para la eliminación de patógenos, dando lugar a una inflamación crónica [271, 272].

En tercer lugar, el reconocimiento de antígenos y el procesamiento por APCs profesionales están alterados en la EII. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren

que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales posiblemente debido a una respuesta alterada o exacerbada de los PRR, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII [300]. Se ha demostrado un incremento en la frecuencia de APCs con fenotipo activado o maduro en la mucosa inflamada [300], así como una escasez de APCs circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas [301]. En células dendríticas humanas procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (*gut homing*), y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG [301]. Esta ausencia en la capacidad de regulación de estas células puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria, perpetuando la inflamación [285, 302].

En cuarto lugar, las APCs no profesionales como IECs, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4+, adquieren un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN- γ o TNF- α , quizás por la pérdida de moléculas B7 (CD80, CD86)[303]. Se ha observado que las IECs de pacientes con EII también expresan moléculas coestimuladoras alternativas, transformándolas en APCs funcionales. De hecho, se ha comprobado una activación de células T por IECs a través de vías alternativas no dependientes de MHC-II, como por ejemplo a través de la molécula CD1d, siempre que los antígenos alcancen la cara basolateral de las IECs donde se expresa esta molécula [304].

En quinto lugar, en la EII existe un defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas. Debido a un fallo en la tolerancia central y periférica, las células T activadas persisten y no entran en apoptosis. Esta persistencia ha sido observada en pacientes con EC y de hecho está siendo actualmente abordada con terapias que actúan precisamente rompiendo este ciclo de activación [305, 306].

En sexto lugar, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa, dando lugar a la inflamación crónica. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras en la EII. En períodos activos de la enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las reguladoras como consecuencia de un predominio en la diferenciación de células Th0 hacia Th1 (en la EC) [307]. En la UC, se ha detectado un incremento en el número de células NKT activadas productoras de IL-13 e IL-5, perpetuando así la inflamación [308].

Eventos secundarios

Las vías inflamatorias iniciadas por los eventos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se ha detectado una migración de células inflamatorias desde la vasculatura hacia la mucosa intestinal, siendo las principales responsables de tal migración las APCs profesionales y no profesionales. Este proceso se inicia con la liberación de moléculas quimioatrayentes tales como IL-8, MIP-1 α y β (*macrophage inflammatory protein*), RANTES (*regulated on activation normal T cells as secreted*) o MCP-1, 2 y 3 (*monocyte chemoattractant proteins*), que inducen cambios conformacionales en moléculas de adhesión de linfocitos, (integrina $\alpha 4\beta 7$ o el receptor de quimioquinas 7) y de granulocitos (L-selectinas). Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 β secretadas por macrófagos activados inducen la expresión de moléculas de adhesión a nivel del endotelio vascular de la mucosa (E-selectinas y P-selectinas, ICAM-1, VCAM-1, CACAM-1, VEGF-A), promoviendo la adhesión leucocitaria y su extravasación al tejido [309, 310].

En segundo lugar, una gran cantidad de metabolitos y mediadores (NO, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, proteasas y metaloproteasas) se acumulan en la mucosa produciendo daño tisular [311-314].

En tercer lugar, además de la inflamación intestinal, la EII se acompaña de una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso [315, 316], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [317] o fiebre [318]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [319-327], alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis [328]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe a uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia enfermedad [329-331].

En cuarto lugar, la EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, extensión y gravedad de la EII [332-334]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear NF- κ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [335].

3. INFLUENCIA DE LA OBESIDAD EN LA EII

3.1. Introducción

Hasta hace no mucho, EII y obesidad raramente coexistían en un mismo individuo. En las últimas dos décadas, paralelamente al aumento en la obesidad, se ha incrementado su presencia en pacientes con EII. Diversos estudios epidemiológicos han encontrado una asociación significativa entre ambos desórdenes. Es el caso de Escocia, la prevalencia de obesidad en pacientes con EII se ha incrementado, siendo importante porque estos pacientes presentan mayor incidencia de complicaciones postoperatorias y enfermedad perianal, requiriendo terapias médicas más agresivas [336]. En este mismo análisis, la asociación de la obesidad con la EC fue mayor que para la CU. Un estudio pediátrico multicéntrico revelaba que en EEUU el 23,6% de los niños con EII (20% con EC y 30,1% CU) presentaban sobrepeso u obesidad [337]. Por otra parte, la ingesta de dieta con elevado contenido en grasas ha pasado a considerarse factor de riesgo en el desarrollo de la EII [338]. Estos estudios no sólo destacan un aumento en la incidencia, sino también lo correlacionan con una EII más activa, con mayor número de ingresos hospitalarios, y con un menor lapso temporal entre el diagnóstico y la intervención quirúrgica [339]. Existen algunos casos clínicos que demuestran una mejora muy significativa en la calidad de vida del paciente de EII y obeso gracias a la cirugía bariátrica, que se acompaña de una rápida bajada de peso corporal [340]. Y no sólo en la clínica, sino también en el campo experimental se ha constatado que la colitis generada en modelos murinos de obesidad inducida con dieta de alto contenido graso se traduce en una peor sintomatología y pronóstico del animal [341, 342]. Resulta por tanto indiscutible que la obesidad ha devenido en epidemia y ha influenciado negativamente la EII, entre otros desórdenes inflamatorios.

Nuestro grupo de investigación ha podido comprobar en varios modelos experimentales de obesidad, de origen tanto genético como inducido por dieta de alto contenido graso, que la expresión de péptidos antimicrobianos así como de uniones estrechas intercelulares se encuentra alterada. Asimismo, la exposición prolongada a una alimentación rica en fructosa repercutió negativamente en la salud intestinal de las ratas, incluyendo la aparición de disbiosis intestinal (datos pendientes de publicación).

3.2. Salud intestinal y obesidad.

Recientemente, el término “salud intestinal” ha ido ganando popularidad en el mundo occidental, principalmente debido al creciente número de personas que no disfrutan de ésta [343]. Tanto en humanos como en modelos animales, la obesidad ha sido relacionada con un menor peristaltismo [344], deficiencias nutricionales [345-351], crecimiento excesivo de bacterias intestinales, alteración en la composición de la microbiota con incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta derivados del metabolismo bacteriano e ineficiencia en la FBI con translocación bacteriana, reflujo gastroesofágico, cálculos biliares y cambios en neuronas entéricas [352-358]. Todos estos signos repercuten negativamente en la función de barrera del epitelio intestinal.

La alteración en la composición de la microbiota intestinal o disbiosis y la pérdida en la FBI, sumadas a la inflamación del tejido adiposo mesentérico, resulta en un aumento en la síntesis y liberación de citoquinas, factores bacterianos y lípidos a la circulación portal, promoviendo la resistencia a la insulina y por ende favoreciendo el estado proinflamatorio. En consecuencia, el metabolismo hepático está directamente afectado por el perfil secretor adiposo e intestinal, incluyendo la aportación que ejerce la microbiota en este sentido.

3.2.1. Disbiosis intestinal

La presencia de **disbiosis intestinal** tanto en personas como en animales obesos es una realidad incuestionable, verificada en múltiples ensayos clínicos y experimentales [355, 359-365]. Este hallazgo ha suscitado gran interés en la comunidad científica, abriéndose una nueva posibilidad terapéutica en el abordaje de la obesidad o de su repercusión sobre otros procesos patológicos mediante el uso de agentes moduladores de los componentes microbianos del tracto digestivo, como prebióticos, probióticos, antibióticos o combinaciones de éstos [366]. Merece la pena resaltar los resultados obtenidos con trasplantes fecales entre animales obesos y delgados, y viceversa, o la de obesos a animales axénicos, donde el intercambio de microbiota intestinal generó el intercambio de fenotipos en el primer caso, e incrementó la adiposidad y resistencia a la insulina en ratones carentes de flora intestinal [355, 367, 368]. Este hecho ha sido corroborado en pacientes con síndrome metabólico quienes, tras recibir el trasplante de donantes delgados, experimentaron una mejora sustancial en la sensibilidad a la insulina [369]. Otro dato muy interesante al respecto es la resistencia que presentan los

animales libres de gérmenes o axénicos a la obesidad inducida por dieta grasa, y cómo se ven desprotegidos en el momento en que las bacterias colonizan el tracto gastrointestinal de estos roedores[370, 371].

Se ha establecido un vínculo entre microbiota intestinal, la resistencia a la insulina y la obesidad, que podría estar mediado por el paso de LPS desde el lumen intestinal hacia el interior del organismo, encontrando su paso a través de los quilomicrones [372-374]. Este LPS genera la llamada “*endotoxemia metabólica*”, siendo por tanto uno de los agentes causales de la inflamación subclínica descrita en la obesidad al desencadenar la respuesta inflamatoria. El incremento de la permeabilidad intestinal a LPS podría ser consecuencia de la ingesta excesiva de alimentos de alto contenido graso o también de la pérdida de bacterias destacadas en el mantenimiento de la FBI. La presencia de unas especies bacterianas u otras puede conducir a la debilitación en la FBI y posterior endotoxemia[365, 375, 376]. Las bacterias comensales, como ya se ha descrito, liberan PAMPs que son reconocidos por los PRRs (TLRs, NLRs) y pueden regular la respuesta inmunitaria en el hospedador a través de la activación de cascadas de señalización que incluyendo NF- κ B y MAPKs. Este hecho ocurre no sólo en disbiosis, sino en condiciones normales. Además de las bacterias, los componentes de la dieta contribuyen a la regulación de la inflamación local del epitelio, y pueden dar lugar a la aparición de inflamación, principalmente ligada a la ingesta de ácidos grasos saturados y altas cantidades de azúcares, en definitiva, dieta hipercalórica y de escaso valor nutricional. El efecto directo de la dieta sobre el epitelio intestinal fue observado *in vivo* en roedores alimentados con dieta hipergrasa, los cuales presentaron altos niveles de TNF α en macrófagos intestinales, e *in vitro* donde células intestinales expuestas a ácidos grasos secretaron altos niveles de IL-6 [377, 378]. Fisiológicamente se postula que la inflamación local atiende a un mecanismo adaptativo agudo que pretende facilitar el transporte de quilomicrones y hacer frente al incremento en la ingesta de grasas. Cuando este tipo de alimentación es sostenida en el tiempo induce una inflamación intestinal persistente que no contribuye exclusivamente al desarrollo de patologías intestinales sino que puede asistir a la aparición y/o evolución de alteraciones de muy diversa índole, desde síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular, esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica, hasta incluso ciertos desórdenes mentales se han correlacionado con la disbiosis intestinal.[379-384].

La FBI puede, por tanto, sufrir alteraciones como consecuencia directa de la dieta, permitiendo incluso la translocación de bacterias, a consecuencia de una disminución en la resistencia transepitelial o del aumento de bacterias adheridas en la mucosa [354, 385]. Estos microorganismos pueden llegar al interior del organismo, por translocación y alcanzar el tejido adiposo mesentérico (TAM), o bien los nódulos linfáticos mesentéricos [354, 386-388]. La bacteria entonces puede ser retenida, aunque restos de ADN de bacterias comensales pueden ser detectados en sangre tanto en animales delgados como obesos. El LPS accede al interior del organismo principalmente por difusión pasiva transcelular y su absorción está regulada por la mucosa intestinal, abandonando el lumen por vía linfática mayoritariamente. Alcanza la circulación sistémica a través de la vena subclavia, en el conducto torácico, dirigiéndose en primer lugar al hígado, y seguidamente al resto de órganos y tejidos, donde los procesos inflamatorios que se inician favorecen la resistencia a la insulina en sus órganos diana[389].

3.2.2. Función de barrera intestinal en la obesidad

El funcionamiento adecuado de la barrera intestinal es esencial para evitar la translocación excesiva de moléculas inflamatorias a la circulación, como el LPS. La microbiota, como se ha señalado en el apartado anterior, puede influir en la integridad del epitelio intestinal y el tono inflamatorio de la mucosa, que, a su vez, afectan a la permeabilidad intestinal contribuyendo así a la disfunción de la barrera gastrointestinal. Además de la disbiosis intestinal, factores nutricionales, el tipo de dieta, la secreción biliar y el funcionamiento anormal de las células de Paneth, productoras de péptidos antimicrobianos, son quizás los principales factores relacionados el debilitamiento de la mucosa intestinal. Además, los tejidos circundantes, entre ellos el TAM, pueden ejercer efectos sobre la permeabilidad intestinal. En el caso de las personas obesas, éste podría aportar una activación añadida del sistema inmunitario y por tanto mayor respuesta inflamatoria. En el siguiente apartado se desarrollará este punto.

Las evidencias iniciales que indicaron que la obesidad podía estar asociada a un incremento en la permeabilidad intestinal fueron arrojadas por modelos animales, tanto de origen genético en ratones *ob/ob* y *db/db* como en el modelo de obesidad inducida con dieta grasa [365, 376, 390]. El estudio de la permeabilidad intestinal reflejó alteraciones en la mucosa intestinal, cuya principal consecuencia es la entrada de toxinas desde el lumen intestinal, generando inflamación local y/o endotoxemia e inflamación sistémica [365, 390, 391]. La endotoxemia generada experimentalmente por infusión continua de LPS, condujo a la aparición de

resistencia a la insulina y obesidad en roedores [392], lo cual refuerza la hipótesis de que la endotoxemia derivada de la disfunción intestinal favorece el desarrollo de la obesidad y la resistencia insulínica.

Distintos métodos han permitido evaluar el paso de moléculas a través del epitelio intestinal, incluyendo el montaje *ex vivo* del tejido intestinal en cámaras de Ussing hasta técnicas no invasivas consistentes en la administración oral de sondas y posterior análisis de éstas en plasma y orina, de modo que cuanto mayor sea la presencia de éstas en las muestras más comprometida estará la integridad de la barrera intestinal, siendo por tanto más permeable al paso de sustancias. El aumento en la permeabilidad a las sondas, nos sugiere que es la ruta paracelular la que está afectada. Esta ruta está controlada por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas. De modo agudo el aumento en la permeabilidad puede deberse a la contracción del citoesqueleto, mientras que de forma crónica aparece por cambios en la expresión y localización proteínas de las uniones estrechas[393]. Efectivamente, en ratones obesos se ha comprobado que existe una redistribución de uniones estrechas, como zonula occludens y ocludina, un incremento en los niveles de LPS plasmáticos y un aumento en la permeabilidad intestinal al FITC-d vía oral [365, 390, 394]. En humanos, a diferencia de la disbiosis que ha sido ampliamente descrita, existen menos datos de evaluación de permeabilidad intestinal en individuos obesos. Estos estudios, utilizan técnicas de tipo no invasivo y solo algunos muestran un incremento significativo, por lo que existe cierta controversia. No obstante, a grandes rasgos, no han revelado grandes alteraciones [395-397].

El patrón dietético parece ser otro factor desencadenante en la pérdida de FBI. Tanto las dietas con elevado contenido en fructosa como las dietas grasas han demostrado alterar la permeabilidad intestinal en roedores, y generar endotoxemia, obesidad y resistencia a la insulina [365, 383, 398, 399]. El exceso calórico ligado al consumo de alimentos poco saludables, suele ir acompañado de déficit nutricional en personas obesas. Generalmente, estos productos suelen ser ricos en grasas saturadas, sal y azúcares, y pobres en micronutrientes. Algunos nutrientes como la vitamina A o la D, el magnesio, el zinc o el calcio, han demostrado su contribución en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y su carencia ha sido determinada en individuos obesos [345-351, 400]. La disponibilidad celular de ácido retinoico depende del estado nutricional en vitamina A. La depleción metabólica de retinoico en células genera un aumento en la permeabilidad, y viceversa, efecto relacionado con el aumento en la expresión

de ocludina, claudina y zónula occludens-(ZO)1 [401]. Por otra parte, se ha observado que la deficiencia en magnesio reduce el contenido de bifidobacterias en ciego así como la expresión de ocludina y ZO-1 en íleon [402]. La falta de zinc parece desensamblar directamente el complejo proteico de membrana, y sensibilizar el epitelio frente a otro tipo de agresión, como el alcohol, que también induce estrés oxidativo en la mucosa [403-406].

El receptor de la vitamina D parece jugar un papel crucial en la mucosa, dado que preserva la integridad de los complejos de uniones estrechas y estimula la renovación epitelial a través de la modulación del SI [407]. La expresión de este receptor en el intestino demostró ser crítica en la respuesta inmunitaria innata de este órgano. La exposición a DSS en el modelo *knockout* del receptor generó un aumento de la mortalidad que fue asociado a la presencia de bacterias en la cavidad peritoneal. La administración de vitamina D demostró un efecto protector en células epiteliales, por lo que se ha identificado como un regulador clave en la homeostasis intestinal [408-410]. La vitamina D regula el metabolismo del calcio gracias a que aumenta la expresión de calbindina, proteína de unión al calcio, en el enterocito y por ende su absorción. La calbindina modula la actividad de la bomba de calcio dependiente de ATP en la membrana basolateral de la célula intestinal [411]. El metabolismo de la vitamina D así como la absorción de calcio están fuertemente asociados a claudinas 2 y 12 [412].

Existen evidencias que asocian la obesidad y la diabetes tipo 2 con trastornos en el sistema biliar, como la colelitiasis [413-416]. La bilis es secretada al intestino donde los ácidos biliares en su forma conjugada median la absorción de lípidos de la dieta y poseen además propiedades bacteriostáticas, contribuyendo a la esterilidad relativa del intestino delgado, en comparación con los segmentos intestinales más distales. Se ha comprobado que la dieta grasa genera un incremento en la secreción biliar [417-419] y éste ha sido correlacionado con una disminución en la expresión de claudinas 1 y 3, ocludina y JAM-1 (*junctional adhesion molecule-1*) en intestino delgado, aunque no en colon o ciego. Además, la exposición de la línea celular intestinal humana Caco-2 a jugo biliar o a una emulsión grasa generó también un aumento en la permeabilidad paracelular con disminución en la expresión de estas proteínas [419]. Sin embargo, la disminución en la secreción biliar en pacientes cirróticos se ha asociado al crecimiento excesivo de bacterias en intestino delgado, aumento de la permeabilidad paracelular, endotoxemia y translocación bacteriana, efectos que parecen ser revertidos con la administración oral de ácidos biliares [420]. Ello sugiere que la dieta grasa

modifica cualitativamente el patrón de ácidos biliares, disminuyendo la concentración intraluminal de ácidos conjugados. Este fenómeno conduce a la disminución de las propiedades bacteriostáticas permitiendo el crecimiento bacteriano, que incrementa la desconjugación favoreciendo la endotoxemia y translocación bacteriana [399, 421].

Las células de Paneth son, junto con los enterocitos, el componente celular del epitelio más directamente implicado en la defensa inespecífica ejercida por parte de la mucosa intestinal. Estas células expresan una gran cantidad de sustancias con acción antimicrobiana, que son liberadas a la luz intestinal tras la estimulación colinérgica o por diversas citoquinas y quimioquinas (IL13, IL22, IFN- γ) [422-425], así como de receptores de reconocimiento de patógenos microbianos conservados o PPRs en su superficie. Debido a la dependencia de las señales bacterianas para la desgranulación de las células de Paneth se establece un diálogo bidireccional entre la microbiota intestinal y este tipo celular, el cual queda muy bien reflejado en el modo en que desde recientes fechas un número creciente de investigadores asocian ciertos casos de disbiosis a un comportamiento alterado de las células de Paneth, entre ellos la obesidad, donde esta disfunción es especialmente evidente en individuos genéticamente predispuestos [426]. Los péptidos antibacterianos más relevantes producidos por este tipo celular son las α y β defensinas [427], lisozimas, fosfolipasas y lectinas tipo C como las *regenerating islet-derived protein* (REG) Reg3 γ o Reg3 α [428, 429]. Las defensinas, independientemente de sus acciones antimicrobianas, desempeñan un papel relevante generando un gradiente quimiotáctico para células dendríticas y linfocitos de lámina propia.

Dado que las células de Paneth pueden modular la composición de la microbiota, su funcionalidad ha sido evaluada en estados de obesidad. El análisis inmunohistoquímico de biopsias de yeyuno procedentes de individuos delgados y de otros con marcada obesidad reveló que no habiendo alteración cuantitativa en las células de Paneth existía una marcada supresión en la producción de defensina- $\alpha 5$ y lisozima en los pacientes obesos [430]. Hodin y cols. comprobaron que la alteración se localizaba a nivel postranscripcional vía UPR (*unfolded protein response*, proteína que se induce en respuesta al estrés del retículo endoplásmico) hallando sobreexpresión génica de ambos péptidos y evidenciando la presencia de estrés en el retículo de las células de Paneth de personas obesas. La activación de UPR fue confirmada en esta población e inversamente relacionada con los niveles de péptidos antimicrobianos. Por tanto, el funcionamiento de las células de Paneth

parece estar alterado en personas obesas pudiendo contribuir a la disbiosis intestinal presente en la obesidad.

3.3. Tejido adiposo mesentérico en la EII

La estrecha proximidad entre el tracto intestinal y el tejido adiposo mesentérico genera en éste un incremento de marcadores inflamatorios derivados del tracto digestivo. La dieta rica en grasa o HFD (*high fat diet*) no sólo favorece la translocación de bacterias a los nódulos mesentéricos sino que además ha podido comprobarse la llegada de estos microorganismos al tejido adiposo mesentérico. Este hecho ampliamente descrito en roedores ha podido observarse en pacientes con EC, quienes ven incrementada la cantidad de TAM [387, 431]. Como ha sido descrito en el primer apartado, no sólo las células del SI presentes en el tejido adiposo sino también el propio adipocito expresa PRRs, por lo que la translocación bacteriana o la llegada de LPS, van a desatar el inicio del proceso inflamatorio. El TLR4 es activado por el LPS incrementado la síntesis y liberación de TNF α e IL-6 en el adipocito, y la producción de TNF α , IL-6, IL-1 β y MCP1 en macrófagos [432-434].

En la primera descripción de la enfermedad, Crohn *y cols.* reportaron la peculiar presencia de un tejido adiposo alargado que envolvía más de la mitad de la circunferencia intestinal en las áreas correspondientes a las lesiones inflamatorias [435]. En efecto, en la EC se produce un incremento de adiposidad visceral que es independiente del IMC [436]. Los pacientes de Crohn exhiben una extensión de la proliferación mesentérica hacia la raíz del mesenterio, conocida como "*fat-wrapping*" o "*creeping fat*", correspondiente a depósitos ectópicos de grasa extendidos desde el plexo mesentérico y que puede cubrir más del 50% de la superficie intestinal. Anteriormente al conocimiento de las propiedades endocrinas e inmunológicas del tejido adiposo, esta envoltura grasa demostró ser un importante indicador regional del grado de actividad de la enfermedad en pacientes de Crohn, correlacionándose con el grado de inflamación intestinal y la severidad de la colitis [437, 438]. No obstante, debido a las diferencias histológicas encontradas en comparación con el tejido adiposo blanco, algunos autores señalan a esta *creeping fat* más bien como tejido fibrótico. Es extraño encontrar este fenómeno en pacientes con colitis ulcerosa, aunque también en la CU se ha asociado un incremento en la adiposidad, en este caso, exhibiendo un menor grado de inflamación que los enfermos de Crohn [439, 440].

A pesar de la proximidad física con los intestinos en la cavidad abdominal y de las propiedades paracrinas atribuidas al tejido adiposo se conoce muy poco acerca de las interacciones potenciales entre ambos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. El TAM podría constituir una fuente crucial de citoquinas a nivel intestinal responsable de los procesos inflamatorios asociados a la EII. De hecho, la obesidad mórbida en el paciente de EII ha mostrado contribuir al incremento de niveles plasmáticos de IL-6 y TNF α , y el grado de expresión de éstas se ha correlacionado con la masa adipocitaria [431, 441]. Los pacientes de EC exhiben una expresión y secreción de TNF α en el TAM superior a la presentada en individuos sanos [436]. Los niveles de TNF α están elevados en sangre, mucosa y heces, sugiriendo un efecto sistémico. Además, la IL-6 está sobreexpresada en TAM de individuos con EII activa. Diversos estudios sugieren que alrededor del 30% de la IL-6 circulante procede principalmente del adipocito [340, 431, 442]. Por último, los niveles de IL-6 están incrementados un 50% en la circulación portal de individuos obesos, recalando la importancia del TAM en estas elevaciones sistémicas [443]. Los niveles séricos de IL-6 en la EC han resultado ser útiles como parámetro clínico predictivo de recidivas y periodos activos de la enfermedad [444, 445]. Asimismo, la EC está ligada a una respuesta inflamatoria mediada principalmente por células Th1, caracterizada por la producción de IL-6, TNF α e IFN γ . Todo ello nos invita a pensar que el incremento en la adiposidad mesentérica observada en EC contribuye a esta respuesta Th1 [446].

En definitiva, el perfil de citoquinas y la respuesta inflamatoria parecen estar influenciadas por la actividad secretora del tejido adiposo. Cabe esperar, que esta influencia podrá verse potenciada si el individuo parte de un estado crónico de inflamación subclínica, como se ha descrito anteriormente en la obesidad. Y de hecho, existe una contribución bidireccional entre ambos estados patológicos ya que, a su vez, la EII puede modificar el patrón de secreción de adipoquinas del TAM y de manera independiente al IMC que posea el individuo.

3.3.1 ADIPOQUINAS EN LA EII.

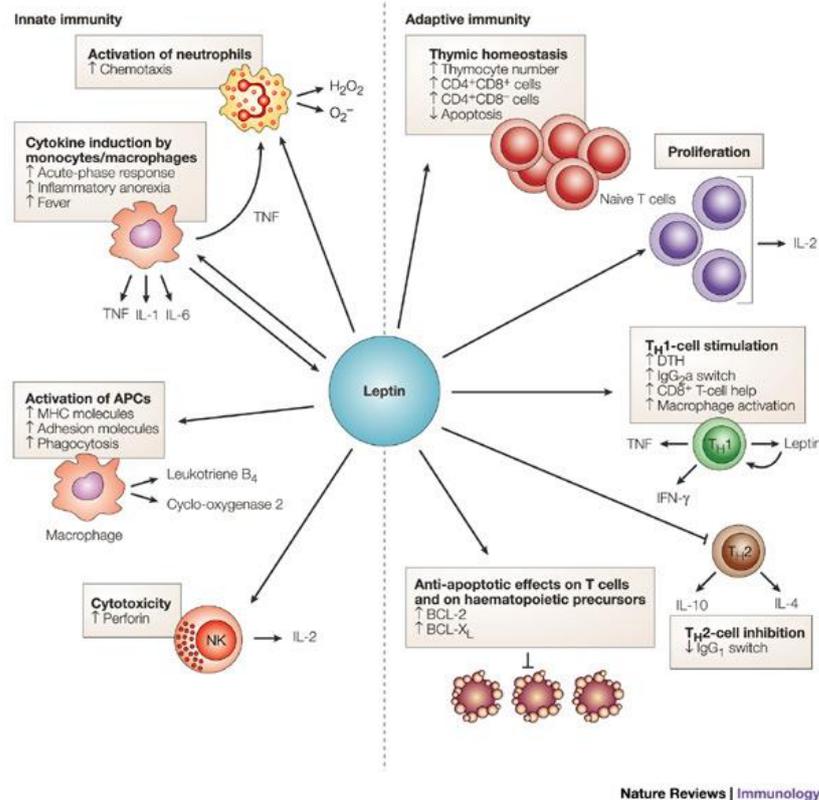
Además de citoquinas o quimioquinas, la secreción de adipoquinas se encuentra alterada en la EII. Este hecho es claramente manifiesto en el TAM, existiendo incluso un patrón diferente dentro de su compartimento, dependiente de la proximidad al foco inflamatorio. Igualmente existe una desregulación de la secreción por parte del tejido hipertrófico, disfuncional, propio de la obesidad. En la última década, y debido al avance en el conocimiento de las funciones endocrinas e inmunológicas del tejido adiposo, el interés por las interacciones

adiposo-intestinal ha experimentado un gran auge. Cada vez son más las implicaciones conocidas de las distintas adipoquinas en los procesos que cursan con inflamación, sin embargo, algunas de estas observaciones son aún objeto de controversia.

Entre las adipoquinas conocidas y con posible implicación en el desarrollo o evolución de la enfermedad inflamatoria intestinal, podemos destacar la leptina, la adiponectina, la resistina y otras adipoquinas recientemente identificadas: quemerina, visfatina y apelina. De todas ellas, hasta ahora la más destacada es la leptina, por ello, y por ser el eje principal de la presente tesis doctoral, se ha dedicado un apartado para la leptina, donde además se describen otras acciones a nivel intestinal.

a. **Leptina.**

La leptina posee similitud estructural con la familia de citoquinas helicoidales, como la IL-2, IL6 o la hormona de crecimiento 1 y se piensa que actúa principalmente como citoquina proinflamatoria. Ciertamente, la leptina incrementa la producción de TNF α , IL-1 e IL-6 por monocitos y de moléculas quimiotácticas como CCL3, CCL4 y CCL5 por macrófagos a través de la activación de la cascada JAK2/STAT3 (Janus Kinasa 2)[447, 448]. En neutrófilos estimula la producción de ROS y promueve la proliferación celular y migración [447, 449]. Los niveles de leptina circulantes y del tejido adiposo aumentan en respuesta a estímulos proinflamatorios, incluyendo TNF α o LPS [450]. Se ha comprobado que la leptina incrementa la producción de citoquinas tipo Th1, como IL-2 e IFN γ , y disminuye la de tipo Th2, como IL-4 o IL-10, por células T o monocitos[451], promoviendo la polarización hacia el fenotipo Th1. En consonancia con estos datos, los ratones *ob/ob* han mostrado resistencia o menor susceptibilidad al desarrollo de modelos experimentales de encefalomiелitis aguda, artritis, hepatitis, colitis o nefritis nefrotóxica [452-460]. Por todo ello, la leptina ha sido catalogada como citoquina proinflamatoria.



b. Adiponectina

La concentración sérica de adiponectina es inversamente proporcional al grado de obesidad, evidenciado en humanos y animales de experimentación [461, 462]. Diversos factores pueden disminuir la producción de esta hormona adipocitaria, incluyendo $TNF\alpha$ e IL-6, así como la hipoxia o el estrés oxidativo [463-465]. Los agonistas $PPAR\gamma$ promueven la diferenciación de adipocitos y la secreción se estimula por la activación de estos receptores [463, 464]. Varios estudios han investigado la asociación entre la fluctuación en la producción de adiponectina y distintos marcadores inflamatorios implicados en procesos patológicos. Así, se ha establecido una correlación negativa entre adiponectina y CRP en personas obesas, diabéticas y también en individuos sanos [463, 466]. La delección de adiponectina conduce en roedores a un incremento en la expresión de $TNF\alpha$ así como de niveles circulantes, y la administración exógena de ésta consiguió normalizar los niveles de esta citoquina [467]. La sobreexpresión transgénica de adiponectina en ratones ob/ob, quienes presentan las manifestaciones del síndrome metabólico, consigue mejorar sustancialmente la resistencia a la insulina, acompañado de una disminución cuantitativa de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo y de la producción de $TNF\alpha$ en este compartimento, aunque también potencia la

obesidad de estos animales alcanzando la morbilidad [468]. De modo similar, la administración aguda de adiponectina a ratones ob/ob resultó en una mejora de la esteatosis hepática a través de la supresión de $\text{TNF}\alpha$ [469]. La activación de los receptores de adiponectina inhibe de modo directo diversas vías de señalización proinflamatorias, incluyendo las reguladas por los TLRs mediante la inhibición de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en varios tipos celulares [470]. Se ha confirmado la presencia de estos receptores en monocitos, células B y NKT humanos [471].

Evidencias acumuladas sugieren que la adiponectina ejerce un papel en el control de la inflamación a través de macrófagos, modulando el fenotipo y la función de estas células. Así se ha descrito que inhibe la transformación de macrófagos en células espumosas [472], famosas por iniciar la formación de la placa de ateroma; anula la producción de $\text{TNF}\alpha$ estimulada por LPS [473]; incrementa la producción de IL-10 humanos [474]. En ratones knockout de adiponectina, los macrófagos peritoneales y los presentes en la fracción de estroma vascular presentaron incrementados los marcadores de macrófagos tipo M1 y disminuidos los de tipo M2; además la estimulación in vitro de éstos con adiponectina resultó en un incremento de marcadores tipo M2 así como en una reducción de ROS [475]. Por último, la adiponectina puede unirse a las células en apoptosis y facilitar la captación de éstas por los macrófagos.

En conjunto, la adiponectina puede modular el fenotipo de macrófagos por distintos mecanismos, aunque las vías de señalización por las cuales actúa no se conocen demasiado. Hay que reseñar que los niveles de adiponectina están aumentados en numerosos procesos de inflamación crónica y en patologías autoinmunes [476], como la artritis reumatoide, la diabetes tipo 1, la fibrosis quística o la EII, lo cual podría representar un mecanismo compensatorio dado que el incremento en la producción de adiponectina por estimulación de $\text{PPAR}\gamma$ mejoró la enfermedad en un modelo de lupus [477].

El efecto de la adiponectina en la EII aún se desconoce. No obstante, es interesante mencionar que la expresión de ésta se ve disminuida en el TAM en modelos experimentales de colitis [478]. Este hecho ha coincidido en algunos pacientes de EC y ha podido establecerse una correlación inversa entre la concentración en TAM y la severidad de la colitis [479]. Sin embargo, estos datos no son concluyentes dado que en otros casos se ha

reportado lo contrario [480]. En relación a los niveles séricos de adiponectina durante la EII también se han obtenido datos conflictivos [475, 481]. Por tanto, el significado clínico de la adiponectina en el contexto de enfermedades inflamatorias es objeto de controversia y requiere seguir profundizando en su estudio.

c. Resistina

Es uno de los miembros de la familia rica en cisteína conocida como RELMs, *resistin-like molecules*, asociadas a la activación de procesos inflamatorios. La resistina ha demostrado inducir resistencia a la insulina en roedores [482]. El modelo *knockout* de resistina presenta bajos niveles de glucemia en ayunas debido a una producción hepática de glucosa discreta [483]. La deficiencia de leptina en el ratón *ob/ob* potencia la obesidad aunque a pesar de ello mejora la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina [484]. La capacidad de la resistina para modular la glucemia está asociada con la activación de SOCS3 y a su acción inhibitoria en la señalización de la insulina [485]. A pesar de que los estudios en animales muestran que la resistina promueve la resistencia a la insulina, en humanos no está tan claro [486, 487]. La resistina inicialmente fue identificada en el tejido adiposo aunque análisis posteriores mostraron un patrón más amplio de expresión que condujo a controversia acerca de la regulación de esta adipocina. En ratones, la síntesis de resistina está restringida al tejido adiposo [482], mientras que en humanos es producida principalmente por monocitos y macrófagos y es indetectable en el adipocito [488]. En células mononucleares humanas la transcripción es inducida por citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6 y TNF α , y en el tejido adiposo blanco es inhibida por rosiglitazona, agonista PPAR γ , sugiriendo que el efecto antiinflamatorio del agonista puede estar mediado en parte por la atenuación de la expresión de resistina [489]. De hecho, las propiedades proinflamatorias de la resistina en células humanas mononucleares son evidentes, dado que promueve la expresión de TNF α e IL-6 por estas células. Además, contrarresta directamente los efectos antiinflamatorios de la adiponectina en células endoteliales de moléculas de adhesión proinflamatorias como VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*) y pentraxi 3 en estas células, es decir, potenciando la adhesión leucocitaria [490, 491].

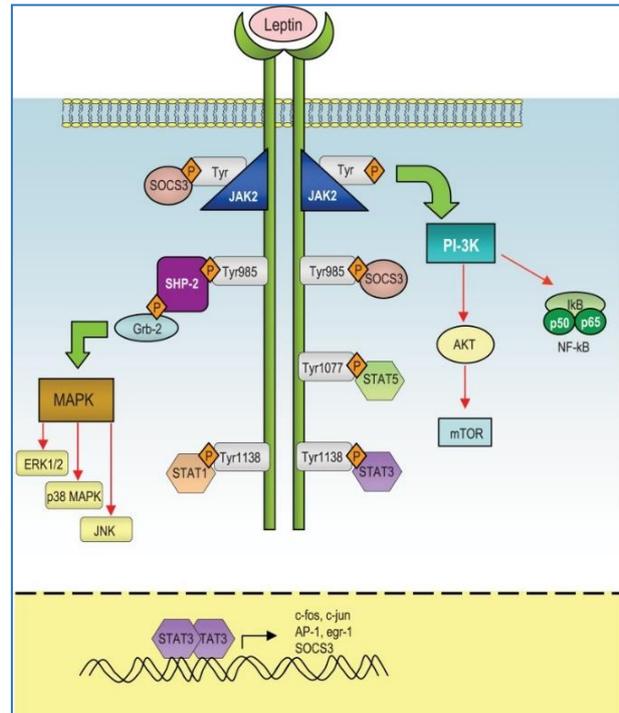
Cabe destacar que los pacientes con EII presentan elevados niveles plasmáticos y de expresión de resistina en el TAM en comparación con pacientes de cáncer colorrectal y diverticulitis [492].

d. Otras adipoquinas.

La *quequerina*, recientemente identificada, se expresa fundamentalmente en adipocitos y hepatocitos, y posee un doble papel metabólico e inmunológico [493]. Su expresión y secreción se incrementan drásticamente durante la adipogénesis e interviene en la diferenciación adipocitaria. La síntesis y secreción de quequerina aumenta en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en la línea celular de adipocitos 3T3-L1, así como en cultivos primarios de adipocitos humanos y de ratón [494-496]. La concentración sérica de quequerina está incrementada en los pacientes de EII y se conoce que actúa como molécula quimiotáctica favoreciendo el reclutamiento de macrófagos y células dendríticas [497]. Ha demostrado exacerbar la colitis experimental por DSS en ratón, incrementando sustancialmente la pérdida de peso, el acortamiento colónico, el daño histológico, el índice de actividad de la enfermedad y los niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 [498]. Curiosamente, estos efectos no se correspondieron con un aumento cuantitativo de células dendríticas, macrófagos, neutrófilos o NK en el colon. La administración de quequerina a roedores sanos no produjo ningún efecto inflamatorio.

La *visfatina*, también conocida como NAMPT o PEBF (“*Nicotinamide phosphoribosyltransferase*” o “*pre-B-cell colony-enhancing factor*”, respectivamente), es otra de las adipoquinas recientemente identificadas capaz de regular metabolismo e inflamación. El término visfatina fue adoptado debido a su expresión predominante en el adiposo visceral. Ésta, es capaz de inducir de manera dosis-dependiente la producción de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e $\text{IL-1}\beta$, así como de IL-10 en monocitos humanos [499]; de promover la activación de células T mediante el incremento de la expresión de citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 , y las de moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 e ICAM1; y de actuar como factor quimiotáctico de monocitos. Cabe destacar que la expresión de RNA mensajero en tejido colónico de pacientes EII está significativamente incrementada {Mochen, 2007 #2598; Lebedeva, 2005 #2599}.

La *apelina* es otra de las últimas incorporaciones de la creciente familia de adipocinas. Es producida y secretada por adipocitos maduros aislados de tejido humano y de ratón. Su expresión en el tejido así como los niveles circulantes están incrementados en varios modelos de obesidad, y ha sido relacionada con la fisiopatología del estrés oxidativo y con la inflamación [500, 501]. De manera dosis-dependiente, el



TNF α aumenta la expresión de apelina en humanos y roedores [502]. En modelos experimentales de colitis así como en pacientes con EII la producción de apelina está incrementada, y la administración exógena de apelina estimula la proliferación colónica epitelial en ratones que previamente han sido expuestos a un inductor de inflamación intestinal [503].

3. 4 Acciones de la leptina en el tracto gastrointestinal

3.4.1. Vía de señalización de leptina

La señalización intracelular de leptina se inicia tras la unión con su receptor específico, el LepR, también conocido como ObR, quien pertenece a la familia de receptores de citoquinas de clase 1. Los efectos pleiotrópicos de la leptina derivan de la extensa expresión del LepR en múltiples tipos celulares. El LepR es un receptor que existe en forma de dímero transmembrana, del cual se conocen 6 isoformas, denominadas por orden alfabético desde la "a" hasta la "f" (LepRa - LepRf), y cuya diferencia en la mayoría de los casos reside en el tamaño del dominio intracitoplasmático [504]. La isoforma "e" es la excepción, en el sentido de que LepRe carece de dominio transmembrana y constituye una forma soluble del receptor, al parecer encargada del transporte de leptina en sangre [505]. Todas las formas del receptor poseen la misma afinidad por la leptina, sin embargo, únicamente la forma de mayor longitud, el LepRb, es capaz de transducir por

completo la señal a la célula. El resto de isoformas carecen total o parcialmente de los motivos intracelulares necesarios para tal fin, por lo que su función no está clara. Se ha sugerido que podrían estar implicadas en el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica o en su degradación. El receptor LepRb carece de actividad enzimática intrínseca, de modo que cuando es activado por su ligando sufre un cambio conformacional que permite el acoplamiento de otras enzimas kinasas, principalmente Jak2 y Jak1 [506]. Una vez activadas, comienza una cascada de transfosforilación entre las propias Jak así como sobre residuos de tirosina del receptor, concretamente Tyr985, Tyr1138 y Tyr1077, proveyendo sitios de anclaje a mensajeros que prosiguen con la transmisión de señal, como las proteínas STATs [507, 508]. Estas proteínas se disocian del receptor y translocan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción mediante la unión a elementos de respuesta específicos en el promotor de sus genes diana. Por ejemplo, en respuesta a la leptina, STAT3 se une al residuo de Tyr-1138 del receptor, permitiendo a Jak2 fosforilar y activar a STAT3. La mutación en este residuo de tirosina suprime la activación de STAT3 por la leptina y da lugar a hiperfagia severa y obesidad mórbida [509-511]. Asimismo, la leptina estimula la fosforilación del LepRb en el resto de Tyr1077, donde se une STAT5 y consecuentemente media su fosforilación.

La vía Jak/STAT y sus efectos están modulados por un sistema de *feedback* negativo mediado por las proteínas supresoras de señalización de citoquinas o SOCS, las cuales se inducen por la estimulación de citoquinas e inhiben la señal ocupando los residuos fosforilados de tirosina de Jak o del propio receptor [512]. La leptina, a través de STAT3, puede inducir la expresión de SOCS3 que posee gran afinidad por el residuo de Tyr985 del LepRb [507, 513-515]. Se ha planteado que SOCS3 podría jugar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la leptina y la consecuente hiperleptinemia que se observa en la obesidad [514].

Otro regulador negativo de esta vía viene dado por la SHP-2 (*SH-2 domain-containing phosphatase-2*), enzima tirosina-fosfatasa constitutiva implicada en la desfosforilación de Jak2 [516]. Como resultado de la activación del LepRb, la Tyr985 es fosforilada por las Jak, permitiendo el acoplamiento de SHP-2. Esta es fosforilada y, junto con su molécula adaptadora Grb2, activa la cascada de señalización de p21Ras/ERK (*RAS p21 protein activator/Extracellular signal-regulated kinases*), cuyo resultado final es la expresión de genes diana como *erg-1*, factor de transcripción implicado en el crecimiento y la diferenciación [507]. Otros miembros de la vía de las MAP kinasas pueden ser activados por la leptina, p38

MAPK y JNK. Entre las posibles dianas activadas por estas vías, la regulación de NF- κ B es crucial para la regulación transcripcional de citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL-1 β [517].

Asimismo, la leptina puede regular la actividad de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), de manera que la subunidad reguladora de la PI3K puede unirse a los restos de tirosina fosforilados, generando un cambio conformacional que permite la activación de la subunidad catalítica y consecuente fosforilación del enzima sobre sus sustratos, típicamente otras kinasas como Akt (también conocido como proteína quinasa B o C, PKB o PKC)[518] o FOXO1 (*Forkhead box O1*), factor de transcripción que es fosforilado por Akt e inactivado [519-522]. La leptina inhibe tanto la expresión como la actividad hipotalámica de FOXO1 a través de la vía PI3K [519]. Se ha comprobado que la sobreexpresión y activación constitutiva de FOXO1 disminuye la sensibilidad a la leptina y en consecuencia los ratones acusan hiperfagia y ganancia de peso, y el silenciamiento con ARN interferente de FOXO1 fue capaz de conseguir los efectos contrarios [519, 520].

Finalmente, la leptina estimula la fosforilación de la quinasa ribosómica 6 (S6K), el principal sustrato endógeno de mTOR quinasa (*mammalian target of rapamycin*) en el hipotálamo. La rapamicina, que inhibe específicamente a mTOR, atenúa los efectos anorexígenos de la leptina; contrariamente, la activación de S6K potencia la sensibilidad a la leptina [523, 524]. La ruta mTOR/S6K parece ser diana de la vía PI3K/Akt en neuronas estimuladas por leptina [525].

Todas estas vías de señalización activadas por la leptina se han relacionado sus en distintos tejidos: STAT3, implicado en el control de la ingesta, producción hepática de glucosa y secreción de gonadotropina, mientras que el control de la lipogénesis en tejido adiposo, la inducción de la formación de la capa íntima arterial, el incremento en la absorción de péptidos y los efectos inmunomoduladores de la leptina en colon e hígado parecen independientes de STAT3 [526].

De cara a esta tesis doctoral, vale la pena detallar los diversos procesos biológicos que, siendo controlados por STAT3, tienen relevancia en la homeostasis inmunológica intestinal, y que por tanto pueden relacionar esta proteína con la fisiopatología de la EII. En referencia al papel que juega en la regulación funcional de las células T, cabe destacar que STAT3 interviene en la transducción de señal de la que dependen las acciones de citoquinas como la IL6, la IL21 o la IL23, de las que a su vez depende la polarización de células T CD4 vírgenes hacia el subtipo

Th17 [527-530] y la regulación funcional de otros tipos celulares como las DC o las ILC. Existen múltiples evidencias sobre el papel decisivo de STAT3 en el mantenimiento de un comportamiento tolerogénico en las APC en general, y las DC en particular, dado que está descrito que la deficiencia en esta proteína en DC determina que estas induzcan una activación mayor en las células T (mayor producción de IFN γ) con las que contactan en sinapsis inmunológica [531]. En general, está aceptado que esto último está relacionado con la ausencia de la inmunomodulación mediada por IL10 sobre estas células, lo cual queda de manifiesto al desarrollarse una colitis espontánea cuando se elimina experimentalmente la expresión de STAT3 de ciertas poblaciones celulares con función presentadora de antígenos como los macrófagos [532, 533]. De esta forma, dado que STAT3 ejerce un papel determinante en la señalización de citoquinas con papeles radicalmente opuestos en la regulación funcional de las células T, resulta difícil desentrañar el papel que pudiera jugar en el contexto de la inflamación crónica asociada a la EII, al menos en lo referente a las células T CD4. Por otro lado, STAT3 sí que tiene un papel mucho más definido en células epiteliales intestinales en las que induce la proliferación celular y la producción de múltiples péptidos antibacterianos y de mucinas, lo que justifica la relevancia que hoy se le da a este factor de transcripción en la homeostasis de la mucosa intestinal en condiciones basales y en inflamación [534, 535]. Tanto es así que los ratones con deleción específica de STAT3 en células epiteliales intestinales son más susceptibles a la colitis inducida por DSS, debido a una menor capacidad de restitución epitelial y de contención de los antígenos luminales [536]. Entre otras moléculas, STAT3 induce la producción de IL22 e IL27. Ambas son citoquinas que contribuyen a la regulación y el mantenimiento de la estructura y función de barrera epiteliales. Además, la IL27 también tiene efectos sobre células T [537]. La IL11 o la IL6 también dependen en su expresión de STAT3 y actúan como factores de crecimiento para las células madre intestinales, lo que las convierte en relevantes en la homeostasis de la mucosa intestinal [538, 539]. Otros mediadores solubles potencialmente relevantes en la fisiopatología de la EII y que en su cascada de transducción de señal usan a STAT3 son GM-CSF, IL35, el factor de crecimiento epidérmico o la hormona del crecimiento [540]. Finalmente, en concordancia con los conceptos antes expuestos, hay evidencias científicas sobre la existencia de polimorfismos que afectan al gen codificante para STAT3 que se asocian con un riesgo incrementado de padecer EII [541].

3.4.2. Efectos de la leptina en el tracto gastrointestinal

Aunque la leptina fue descubierta en el tejido adiposo y éste es sin duda el principal órgano secretor, también es producida en estómago, músculo esquelético, placenta, glándula pituitaria y colon [542-545]. El estómago constituye la principal fuente de leptina del tracto gastrointestinal, donde células endocrinas y exocrinas de la mucosa gástrica pueden producirla, jugando las exocrinas un papel más destacado [546-548]. La secreción endocrina se produce en varios estados fisiológicos, incluyendo el ayuno o la alimentación tras ayuno. En estas condiciones, la concentración de leptina incrementa en suero y mucosa gástrica [549]. Las células principales secretan leptina y su receptor soluble a la mucosa donde, pese a la acidez del entorno, mantienen la estabilidad y puede alcanzar el duodeno en forma libre o unida a proteínas [548]. Los receptores de leptina abundan en el tracto digestivo, especialmente en la parte proximal del intestino, y se localizan en bordes apical y basolateral de IECs [526, 550], por lo que no es de extrañar que intervenga en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Recientemente, se ha identificado una población celular perivascular en la submucosa intestinal que expresa en mayor proporción el receptor y cuya presencia aumenta distalmente, alcanzado el pico expresión en íleon y manteniéndose en colon y recto. Consecuentemente, los múltiples efectos ejercidos por leptina en el tracto gastrointestinal podrían no derivan exclusivamente de la hormona producida por la mucosa gástrica sino que también la circulante [551].

Efectos de la leptina sobre la motilidad intestinal

Los efectos ejercidos por la leptina sobre la motilidad intestinal presentan una naturaleza compleja. Podemos encontrar receptores de leptina en las terminaciones aferentes y eferentes del nervio vago. En la rata, las terminaciones vagales aferentes se han clasificado en dos grandes grupos, un primer grupo que responde a la leptina y produce una respuesta estimuladora, y un segundo grupo, usualmente insensible a la leptina y que genera una respuesta inhibitoria a la misma. En el intestino delgado el mecanismo es complejo, la leptina puede causar efectos excitadores e inhibidores sobre mecanorreceptores. La deficiencia de leptina aumenta el tiempo de vaciado gástrico así como la velocidad de tránsito en el yeyuno, acortando el tiempo total de tránsito en el intestino delgado. Algunos estudios muestran que la administración central de leptina retrasa el vaciado gástrico [552-554]. La leptina, en ausencia de colecistoquinina (CCK), regula el comportamiento alimenticio y el apetito excitando terminaciones vagales de tipo 1

e inhibiendo las de tipo 2, mientras que en presencia de CCK potencia la motilidad del tracto gastrointestinal [555-557].

Efectos de la leptina en la absorción y la secreción

La absorción de macronutrientes puede estar modulada por la acción de la leptina en estados fisiológicos y patológicos. En relación a carbohidratos, la leptina proveniente principalmente de la mucosa gástrica puede modificar la expresión y actividad de transportadores de glucosa y fructosa, disminuyendo la actividad del Sglt1 (*sodium-glucose transporter-1*) en el estado preprandial, e incrementado la de transportadores de glucosa y fructosa Glut-5 y Glut-2 [558, 559]. Asimismo, parece incrementar la absorción de pequeños péptidos procedentes de la digestión proteica a través del transportador de di y tripéptidos PepT1[458], promoviendo la traslación de un pool intracelular de PepT1 hacia el borde en cepillo del enterocito en la zona proximal del intestino delgado, y, a largo plazo, incrementando su expresión génica [560, 561]. Sin embargo, la hiperleptinemia crónica resultante de la dieta rica en grasa disminuye la expresión de receptores de leptina y en consecuencia la expresión de PepT1 y la absorción de pequeños péptidos se ve reducida. Este efecto parecer ser independiente de STAT y ser modulado por la ruta ERK-1/2 [562]. Los ratones carentes de leptina presentan una disminución significativa de PepT1, la cual puede revertirse con la administración de leptina [563].

La infusión intravenosa de leptina en rata condujo a un descenso en apolipoproteína (Apo) A-IV, cuya síntesis es estimulada por la absorción de grasas [564]. Estudios *in vitro* en Caco-2 arrojaron datos consistentes en el metabolismo lipídico, donde la administración basolateral de leptina inhibió la secreción de triglicéridos, la biosíntesis de Apo B-100 y Apo B-48, y la formación de quilomicrones y lipoproteínas de baja densidad o LDL. Además, incrementó el pool intracelular de MCT-1 y su translocación a la membrana luminal, favoreciendo por tanto la absorción de butirato. [565]. El butirato es un ácido graso de cadena corta, producto de la fermentación bacteriana de carbohidratos no absorbibles, que constituye la principal fuente energética de las células intestinales y posee propiedades antiinflamatorias y reguladoras a nivel celular. Por último, la leptina generó un aumento en la expresión de FABP hepática e intestinal *in vitro*, implicada en la captación, metabolismo intracelular y transporte de ácidos grasos de cadena larga [457].

En consecuencia con lo anteriormente expuesto, en un modelo murino de síndrome de intestino corto tras la resección masiva de intestino delgado, la administración exógena de leptina incrementó la absorción de sacarosa y de grasa [563], e indujo efectos diferenciales en enzimas peptidasas, incrementando la actividad de aminopeptidasas y disminuyendo la de carboxipeptidasas.

Los procesos de transporte hidroelectrolíticos podrían, a su vez, verse modulados por esta hormona. Existen pocos datos al respecto, aunque ha podido comprobarse *in vivo* e *in vitro* que bajo condiciones inflamatorias, la hiperleptinemia induce la secreción de cloruro [566], lo cual podría dar explicación a la relación epidemiológica establecida entre el IMC y la frecuencia de diarrea [440].

Efectos tróficos de la leptina en el epitelio intestinal

Aunque hay alguna evidencia en la literatura que no atribuye a la leptina efectos sobre el crecimiento de la mucosa del tracto gastrointestinal, varios estudios han demostrado que la administración exógena de leptina estimula el crecimiento epitelial comportándose como factor trófico [567, 568]. En lechones neonatos la leptina estimuló el desarrollo morfométrico de la mucosa intestinal, la proliferación de IECs y la actividad de enzimas localizadas en las microvellosidades [569]. La resección intestinal masiva en roedores induce el crecimiento de criptas y villi a la par que la expresión de la leptina y de su receptor. Es más, el tratamiento con leptina exógena potencia el crecimiento de criptas y villi [570, 571]. En cambio, cuando la resección se practica en ratones *ob/ob*, deficientes en leptina, se observa una disminución en la proliferación celular y un aumento de la apoptosis en células intestinales [572]. Este y otros estudios sugieren un rol proapoptótico a nivel intestinal, contrario a otros estudios que apuntan lo contrario [570].

Los efectos mitogénicos y antiapoptóticos señalan a la leptina como posible factor tumorigénico. Dada la asociación de dieta rica en grasa y obesidad con el cáncer de colon, no sería raro que la hiperleptinemia de algún modo estuviera implicada en la carcinogénesis [573]. Sin embargo, los datos experimentales son controvertidos. La leptina estimuló la actividad de MAPK *in vitro* e incrementó la proliferación de líneas celulares de mucosa gástrica. Se ha hallado su expresión en adenocarcinomas gástrico y de colon y en pólipos colorrectales, y sus niveles se han correlacionado con un incremento de la proliferación celular en colon o con riesgo de cáncer en ratas alimentadas con dieta grasa [574-577]. No obstante, otros

estudios no muestran asociación entre leptinemia y cáncer de colon [573], e incluso han mostrado que pacientes de cáncer en estado avanzado presentan menores niveles de leptina en sangre, aunque la influencia de la ingesta en este sentido no pudo aclararse [578]. En rata, la leptina disminuyó las lesiones precancerosas de la mucosa colónica inducidas por azoximetano [579], mientras que los animales que carecen de receptor de leptina fueron más susceptibles al daño [580]. En humanos, se encontró un aumento en la expresión de leptina en carcinoma colorrectal e incluso en el área sana adyacente al tumor. Los investigadores también mostraron una correlación directa entre el nivel de leptina y el grado de diferenciación tumoral [577]. Este panorama ganó complejidad tras la aparición de nuevos estudios que asignaban a la leptina una función reguladora de la respuesta inmunitaria antitumoral en colon [581, 582]. Por lo tanto, por una parte la leptina estimula la proliferación celular y posee efectos antiapoptóticos, pero por otro lado potencia la respuesta inmune antitumoral sugiriendo que el incremento observado en tumores constituye una respuesta homeostática.

Papel de la leptina en la FBI

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la pared intestinal controla el flujo paracelular de macromoléculas mediante la regulación de las uniones estrechas y adherentes intercelulares, quienes asimismo están asociadas a una red apical de filamentos de actina enriquecidos en miosina II que conforman el citosqueleto celular. La organización y contracción de las uniones y citosqueleto controlan así la permeabilidad. La proteína monomérica GTPasa RhoA y su efector Rho-quinasa (ROCK) intervienen en la regulación de la organización de los filamentos por estímulos fisiológicos y patológicos. [583, 584] La actividad de RhoA ejerce un control muy fino, que depende de la naturaleza e intensidad del estímulo, de manera que tanto la inhibición como la activación de la vía RhoA/ROCK repercute en ambos sentidos sobre las uniones estrechas. Se ha demostrado que la estimulación *in vitro* de diversas líneas de células intestinales, como HT29-19A, LS174T o HM7 por leptina, principalmente en la membrana apical, incrementa la permeabilidad paracelular, fenómeno asociado a la contracción del citosqueleto mediada por ROCK. Y-27632 y AG490, inhibidores de ROCK y de JAK2 respectivamente, fueron capaces de prevenir estos efectos.

Sin embargo, existen evidencias que arrojan resultados y conclusiones opuestas con respecto al mantenimiento de la FBI. En primer lugar, la delección específica del receptor de leptina en células intestinales provocó un aumento de la susceptibilidad a infección por *Entamoeba histolytica*[585-587]. En segundo lugar, el

mismo estudio demostró que la eliminación del lugar de activación de STAT3 en el dominio intracelular del LepRb, el residuo Tyr1138, derivó en una destrucción más severa de la arquitectura de la mucosa con grandes ulceraciones. De modo similar, la delección de STAT3 asociada a IECs dificultó la curación del epitelio tras la exposición a DSS [536].

La leptina puede también interactuar con otros componentes de la barrera intestinal, como las células de Paneth o las células caliciformes. En primer lugar, se ha demostrado que la leptina puede modificar la composición de la microbiota intestinal a través de la regulación de la síntesis y secreción de péptidos antimicrobianos por las células de Paneth y que este efecto es independiente de la ingesta. En este sentido, la falta de señalización de leptina generó una disminución significativa en la expresión de Reg3 β , Reg3 γ , y defensinas α y β , asociado a un estado de disbiosis intestinal, caracterizado la disminución del filo *bacteroides* y aumento de *firmicutes*[551]. La producción de mucinas por las células caliciformes aumenta con la administración de leptina, fenómenos observado tanto *in vivo* como *in vitro*, y por el cual se le ha conferido esta hormona un papel protector en el epitelio intestinal [588, 589]. Además, la leptina podría prevenir la úlcera gástrica y favorecer su curación incrementando la actividad de la COX y NO, induciendo la secreción de moco y la angiogénesis [590, 591]. Asimismo se ha estudiado la función de la leptina en las lesiones por isquemia y su curación en tracto gastrointestinal. Su administración aceleró la curación de anastomosis colónica [592]; disminuyó el grado de afectación intestinal por isquemia en roedores [592]. Además, la leptina parece controlar la producción de NO por activación de la NOS de manera dosis dependiente, lo cual, gracias a la potencia vasodilatadora del NO favorece el flujo sanguíneo mesentérico, proceso contrario a la isquemia [593, 594].

OBJETIVOS

1. Estudiar la influencia de la obesidad en el desarrollo de colitis experimental aguda, en un modelo de obesidad caracterizado por su resistencia a la leptina.
2. Caracterizar el papel de la leptina en la inflamación intestinal en roedores cuya señalización de leptina no está alterada.
3. Puesta a punto de un método de normalización en Western Blot que evita el uso de proteínas de expresión constitutiva, cuya abundancia puede verse alterada por inflamación y/o obesidad.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma® (Madrid, España). La leptina fue suministrada por Protein Laboratories Rehovot Ltd. (Israel).

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MODELOS ANIMALES

En los experimentos *in vivo*, se realizaron en ratas Zucker y ratones C57BL6/J, empleándose en ambas especies machos y con una edad comprendida entre 10-12 semanas, suministrados por Harlan Laboratories® (Barcelona, España). Dichos animales fueron mantenidos bajo estrictas condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon® sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014), y agua *ad libitum*, excepto en el caso del modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS). Los experimentos fueron realizados tras un periodo de aclimatación de 7 días. Dichos estudios *in vivo* han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

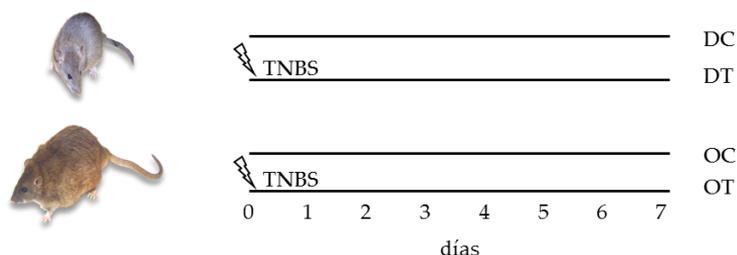
2.1. Inducción de colitis aguda en ratas Zucker por ácido trinitrobenzeno sulfónico o TNBS.

2.1.1. Inducción de colitis aguda por TNBS.

La colitis fue inducida por la administración intrarrectal de una solución de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) en etanol al 50% (V·V⁻¹)[595]. Cada rata recibió 10 mg de TNBS en un volumen de 0.25 mL bajo anestesia con isofluorano, previo ayuno de 16h para favorecer la penetración de éste. Durante siete días, se realizó un seguimiento del peso corporal de los animales, así como del consumo de bebida y comida. Transcurrido dicho periodo, los animales fueron sacrificados bajo anestesia por dislocación cervical previa exanguinación a través de la vena porta.

2.1.2. Diseño experimental.

Se emplearon ratas Zucker machos obesos y sus controles delgados de 12 semanas, los cuales son heterocigotos para la mutación en el receptor de la leptina y, por lo tanto, presentan un fenotipo sano. Los animales fueron a su vez divididos aleatoriamente en dos subgrupos, control y colítico, cada uno con 10 animales. La abreviatura utilizada para cada grupo fue la siguiente: DC, delgado control; DT, delgado TNBS; OC, obeso control y OT para el grupo obeso que recibió el TNBS.



Esquema X: Diseño experimental en el experimento de colitis aguda inducida por TNBS en la rata Zucker.

2.2. Estudio del efecto de la administración de leptina en un modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J inducido por sulfato de dextrano sódico (DSS).

2.2.1. Inducción de colitis aguda por DSS.

La inducción de la colitis se realizó mediante la administración de DSS 2.5% (P.V⁻¹) en agua de bebida, siendo esta repuesta a diario durante la totalidad del experimento, que duró 7 días[596]. La monitorización del estado de los animales se realizó atendiendo a los criterios recogidos en el índice de daño de la enfermedad (Tabla X). Del mismo modo, se realizó un seguimiento diario de la evolución del peso corporal, representado de forma relativa al peso inicial de cada animal al comienzo del pretratamiento con leptina y relativo al inicio de la administración de DSS, así como del consumo de bebida.

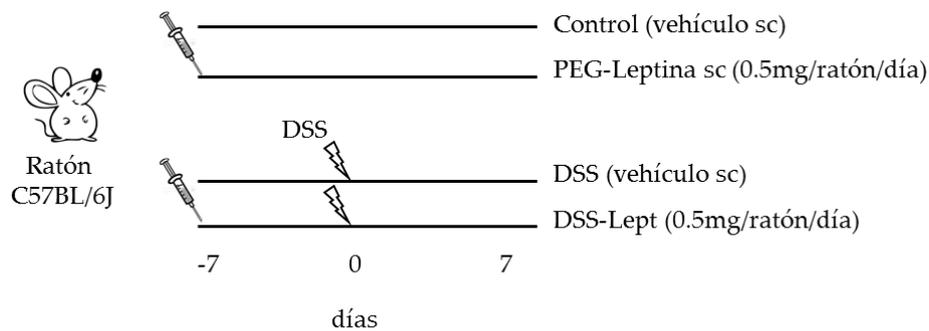
Valor	Pérdida de Peso (%)	Consistencia de las heces	Sangre en heces
0	Ninguna	Normal	No
1	1-5	Blanda	No
2	5-10	Blanda	Hemocult positivo
3	10-15	Diarrea	Hemocult positivo
4	>15	Diarrea	Sangrado rectal

Tabla X: Criterios de valoración del índice de actividad de la enfermedad (DAI) asociado a la colitis por DSS.

2.2.2. Diseño experimental.

Previo a la inducción de la colitis, y con objeto de generar un estado hiperleptinémico sostenido en el tiempo, los animales recibieron un pretratamiento con leptina pegilada (0.5 mg/kg/día) que se mantuvo hasta el final del experimento, administrada en una única dosis vía subcutánea y cuya semivida de eliminación es de aproximadamente 20 horas. Conocido el efecto de la leptina en el control de la saciedad, los animales fueron pareados en la alimentación de manera que los grupos controles tuvieron restringida la cantidad de pienso a la del grupo tratado con leptina (*pair-fed*), que comieron *ad libitum*. Dicho efecto en la saciedad fue disipándose hasta alcanzar la ingesta media normal por ratón/día entre el quinto y el sexto día, por lo que la inducción de la colitis se inició tras una semana de administración de leptina. La glucemia fue monitorizada a diario con objeto de conocer el estado de los animales con restricción calórica, que no sufrieron crisis de hipoglucemia. La leptina, además de inducir saciedad, es capaz de generar pérdida de peso en individuos sanos dada su capacidad de activación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón[597]. Por lo tanto, a pesar del pareamiento establecido entre grupos controles y tratados con leptina, hubo un desfase en el peso corporal entre dichos grupos que nos impidió el uso de este parámetro en el índice de actividad de la enfermedad (DAI, *disease activity index*).

Se establecieron cuatro grupos experimentales: control, leptina, DSS y DSS-leptina, con un número de animales variable entre 7 y 10. El grupo control, llevado en paralelo con el grupo "leptina", recibió un volumen equivalente de solución salina por vía subcutánea y su alimentación estuvo restringida a la del grupo leptina. De igual modo se trataron en paralelo entre los grupos DSS y DSS-Leptina, que, además del DSS, recibieron por la misma vía solución salina y leptina pegilada, respectivamente.



Esquema X: Diseño experimental en la colitis aguda inducida por DSS en ratón.

Transcurridos 7 días de administración de DSS, se procedió al sacrificio de los animales en campana de flujo laminar, con objeto de estudiar posteriormente la posible translocación de bacterias desde el intestino al interior del organismo y la presencia de lipopolisacárido (LPS) en hígado y plasma. Para ello, los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución de ketamina y xilacina. Una vez perdido el reflejo plantar en los ratones, se procedió a la exanguinación de éstos a través de la bifurcación aorto-femoral, y seguidamente se les practicó la dislocación cervical. Así, en condiciones de esterilidad, se extrajeron los órganos de los animales y, según la finalidad de los mismos, fueron procesados en el momento o congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Todo ello será detallado en el apartado correspondiente.

3. ESTUDIO DEL ESTATUS INFLAMATORIO.

3.1 Estudio del estado inflamatorio en general.

3.1.1. Estudio in vivo del estado inflamatorio general por imagen.

La presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno fue detectada in vivo en los ratones mediante administración por vía intraperitoneal de 25 mg/kg del reactivo L-012 (120-04891) (8-amino-5-cloro-7-fenilpirido (3,4-d) piridazina-1,4-(2H, 3H) diona) (Wako®, Osaka, Japón) usando como vehículo 100 µl de agua destilada estéril [598, 599]. Inmediatamente después, fueron anestesiados con isoflurano y colocados en el interior de un IVIS Spectrum Caliper® LifeSciences. A continuación, se fueron capturando imágenes durante los siguientes 10-15 minutos. El reactivo administrado reacciona en este tiempo con las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno presentes generando quimioluminiscencia.

3.1.2. Estudio del estado inflamatorio sistémico mediante la determinación de nitratos y nitritos en plasma.

3.1.2.1. Obtención del plasma.

En el ratón, la extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI ml⁻¹). En el caso de la rata, la sangre fue tomada de la vena porta y recogida en tubos colectores de sangre P800 (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU). La sangre fue sometida a una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

3.1.2.1. Determinación de nitratos y nitritos en plasma.

Dada la asociación entre una elevación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma (derivados de un aumento de la presencia de NO), con la reacción inflamatoria sistémica típicamente asociada a la septicemia, se aplicó un protocolo basado en la reacción de Griess [600] para la cuantificación de nitratos/ nitritos éstos en plasma. Brevemente, en primer lugar se realiza la conversión de todos los nitratos presentes hacia nitritos, ya que la reacción de Griess solo es sensible a éstos. Posteriormente, los nitritos así generados fueron cuantificados espectrofotométricamente mediante una reacción en presencia de sulfanilamida 1% (p/v), naftiletieno diamina dihidrocloruro 0.1% (p/v) y H₃PO₄ 2.5% (p/v), mediante la cual se genera un producto coloreado detectable a 540 nm. Paralelamente se realizó una curva patrón generada con nitrito sódico. Los resultados son expresados en concentración µM.

3.2 Evaluación del daño y la inflamación intestinal

3.2.1. Evaluación macroscópica del daño intestinal

Inmediatamente después de la muerte del animal, el colon fue extraído y limpiado con solución salina para eliminar los restos de heces. Se anotaron los valores de peso así como de longitud, sometiendo el órgano a un peso constante de 2g. Una vez tomadas estas medidas se obtuvieron pequeños segmentos transversales de la zona distal adyacente al daño destinados a la extracción de RNA, a histología (conservados en RNA later y formalina al 4%, respectivamente) y al cultivo del explantes. El resto del tejido fue entonces abierto longitudinalmente, fotografiado, valorado y rápidamente congelado en nitrógeno líquido en distintas alícuotas, conservadas a -80°C hasta su posterior uso.

En el modelo de colitis inducido por TNBS, el daño colónico macroscópico se valoró en base a la presencia y magnitud de los siguientes signos característicos del modelo de TNBS: adhesiones, cicatrices, fragilidad, dilatación proximal, necrosis, deformación, obstrucción intestinal, hiperemia y fibrosis. Se estableció un índice de daño colónico con una escala comprendida entre 0 y 22 (Tabla X).

En el modelo de colitis inducido por DSS, el daño colónico macroscópico es muy diferente al que aparece en el modelo de colitis inducida por TNBS. Por esta razón, el índice de daño colónico está basado en características tales como hiperemia, fibrosis, engrosamiento u otro tipo de lesiones (Tabla X). De esta forma el índice de daño macroscópico queda comprendido en una escala entre 0 y 9.

En el modelo de colitis inducida por DSS además del colon se obtuvieron segmentos de íleon siguiendo el mismo protocolo descrito para el colon.

PARAMETRO	VALOR	SIGNIFICADO
Adhesiones	0	Ninguna
	1	Diseción dificultosa
	2	Visibles
	3	Ovillo intestinal
Obstrucción	0	Normal
	1	Requiere limpieza manual
	2	Impacto fecal
Hiperemia	0	Normal
	1	Ligera, parcheada o pérdida del patrón vascular
	2	Intensa, generalizada
	3	Hemorragia
Fibrosis	0	Normal
	1	Cierta rigidez
	2	Marcada rigidez
Necrosis	0	Ninguna
	1	Restos aislados
	2	Parcheada
	3	Lesión focal <0.8 cm
	4	Lesión focal >0.8 cm
	5	Lesión esencialmente continua y extensa
Deformación	0	Ninguna
	1	Ligeramente anormal
	2	Circular o elíptica
	3	Total
Otros	+1	Cicatrices
	+1	Fragilidad
	+2	Dilatación proximal

Tabla X. Criterios de valoración del daño colónico macroscópico en el modelo de TNBS. (Índice máximo: 22)

Parámetro	Valor	Significado
Hiperemia	0	Ninguna
	1	Localizada. Parches
	2	Severa
Fibrosis	0	Ninguna
	1	Media
	2	Severa
Engrosamiento	0	Ninguno
	1	Medio
	2	Severo
Otros	1+	Adhesiones
	2+	Deformación proximal

Tabla X. Criterios de valoración del daño colónico macroscópico en el modelo de DSS. (Índice máximo: 9)

3.2.2. Estudio histológico

Una de las secciones transversales de colon obtenidas tras el sacrificio fue conservada en formaldehído al 4% (P.V⁻¹). A continuación estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de 5 μ m empleando un micrótopo de parafina. Los cortes realizados fueron montados en portas y sometidos a una tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H&E), que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio. Asimismo, los cortes fueron sometidos a una tinción a base de azul alcian y rojo nuclear, que permite conocer la actividad funcional de las células caliciformes en relación a la producción de mucinas y su liberación a la interfase epitelio – luz intestinal.

Se estableció un índice histológico específico atendiendo a los siguientes criterios: longitud de las criptas (0-2), infiltración leucocitaria (0-4), engrosamiento de la submucosa (0-2), erosión (0-2) y pérdida de estructura de las criptas (0-2). Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos y su valoración fue realizada de forma independiente y objetiva siguiendo un esquema de doble ciego.

3.2.3. Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal

El ensayo de permeabilidad *ex vivo* se realizó tomando una pieza de aproximadamente 0.5 cm de colon distal de ratón que se sumergió en solución

Ringer fría (en mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 2.4 K₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, y 10 glucosa). Se hicieron montajes de tejido intacto sobre cámaras de Ussing con dispositivos de voltaje DVC-1000 (World Precision Instruments, Aston, United Kingdom). Transcurridos 10-15 minutos del montaje del tejido se consiguió una estabilización en los valores de I_{sc} (I₀) y conductancia (G₀), en ese momento se añadió FITC dextrano (MW 4000 Da) al reservorio de la cara apical del tejido a una concentración de 2.5 mg/ml. Se fueron tomando muestras de la solución Ringer de la cara basolateral cada 30 minutos durante 150 min. A continuación se añadió carbacol (300 μM), agonista colinérgico que actúa como secretagogo, anotándose la respuesta de I_{sc} del tejido colónico. Tras la medida de la intensidad de la fluorescencia (excitación 490 nm; emisión, 520 nm; usando el fluorímetro FLUOstar-Control, Polarstar OPTIMA, BMG Labtech), la permeabilidad al FITC-dextrano se calculó haciendo uso de una curva de FITC dextrano disuelto en solución Ringer (1000–1 μg/ml) de la cual se obtuvieron los pertinentes valores de fluorescencia. Bajo las mismas condiciones de excitación, emisión y ganancia se obtuvieron valores de fluorescencia para cada uno de los fragmentos colónicos ensayados a cada uno de los puntos temporales de toma de muestra. Dichos valores, previa sustracción del valor de fluorescencia mostrado por la solución Ringer fresca, se interpolaron en la curva anteriormente obtenida y de este modo para cada caso se obtuvo un valor de FITC dextrano en la cara basolateral del tejido, el cual es expresado en μg/ml.

3.2.4. Cuantificación de la sangre oculta en heces

El modelo de colitis inducida por DSS se caracteriza por un profuso sangrado rectal, siendo este uno de los factores decisivos en la severidad del proceso colítico. Por tanto, se aplicó el siguiente método espectrofotométrico adaptado del desarrollado en un principio por el Dr. Donald S. Young [601] para la cuantificación de sangre en heces. Brevemente, las heces fueron homogeneizadas en agua destilada ultrapura (EIA Grade Ultra Pure Water, SpiBio, Reino Unido) en una concentración de 0.105 mg de heces/μl. Se seleccionó una alícuota de 200 μl representativa del total de dicho homogenado, la cual se llevó a un tubo de 15 ml y se incubó a 100°C en baño hirviendo durante 10 min para degradar las peroxidases derivadas de la dieta presentes en las heces. A continuación, se dejó enfriar brevemente para posteriormente añadir 1.2 ml de una mezcla en proporción de ácido acético glacial y agua destilada (30/70 v/v). Seguidamente, se añadieron 1.8 ml de acetato de etilo puro sobre la anterior mezcla, se agitó y centrifugó a 2500 rpm/3 min/temperatura ambiente. Finalmente,

se recogió la fase superior y se la hizo reaccionar con 3,3', 5, 5' tetrametilbenzidina en presencia de H₂O₂. La actividad peroxidasa endógena del grupo hemo de la hemoglobina sanguínea realiza la conversión de dicha molécula generando una coloración espectrofotométricamente mensurable a 660 nm. Paralelamente se usa como referencia una curva de hemoglobina generada en agua destilada y que se somete al protocolo arriba descrito desde el primero de los pasos. Los resultados son expresados como mg Hemoglobina/mg de heces.

3.2.5. Determinación de la actividad mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en colon

Una de las muestras de colon obtenidas tras el sacrificio del animal fue homogeneizada en un tampón compuesto por Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5% (P.V⁻¹). Una vez centrifugado el homogenado, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividades enzimáticas en colon. La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO), utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisidina en presencia de H₂O₂ [602]. Los resultados fueron expresados como mUnidades/mg de proteína. Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina (AP) fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sánchez de Medina *et al* en el cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el p-nitrofenilfosfato sódico [603]. Los resultados se expresan igualmente como mU/mg de proteína.

3.2.6. Cuantificación de la expresión génica mediante Western Blot.

3.2.6.1. Extracción y cuantificación de proteínas para análisis por Western Blot.

El tejido objeto de estudio fue sometido a homogenización mecánica en tampón de lisis RIPA frío compuesto por sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1%, desoxicolato sódico 0.1% y Tritón X-100 1% en PBS, conteniendo un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, P8340) en una proporción de 1:200 así como de fosfatasas (SC-45045, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, EEUU) en una proporción de 1:100. Seguidamente el homogenado se expuso a ultrasonidos para forzar la completa lisis celular y finalmente se sometió a centrifugación a 10.000 rpm, 10 minutos y a 4°C con objeto de eliminar los restos celulares. En el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinchonínico [604], empleando albúmina sérica bovina como estándar.

3.2.6.2. Western Blot

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron mezcladas en la proporción adecuada con el tampón de carga comercial 4X suministrado por BioRad® (Hércules, CA, EEUU) y calentadas a 95°C durante 5 minutos. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de gradiente de concentración de acrilamida comprendido entre 4-16% , éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.25 μm (GE Healthcare Lifesciences®, Pittsburgh, PA, EEUU). Estas membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0.15 M y Tween-20 1% (v/v)). A continuación, la membrana fue expuesta al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos usados y sus diluciones empleadas fueron: β -Actina (1:1500) y caspasa-7 (1:1000) de Abcam® (Cambridge, Reino Unido); PCNA (1:1000) de la casa BD Biosciences® (California, EEUU); pSTAT3 (1:2000) y STAT3 (1:1000) de Cell Signaling Technology®, Inc.; BCL-2 (1/500) y BAX (1/1000) (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU). Todos estos anticuerpos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (m.V⁻¹). Como control de carga genérico se usó la expresión de β -Actina, excepto en aquellos casos en los que se hace una relación directa entre la expresión de la proteína fosforilada y la de la proteína total. Las membranas fueron posteriormente expuestas durante 90 minutos al anticuerpo secundario de la especie apropiada según el anticuerpo primario empleado, estando este conjugado con una enzima peroxidasa, de modo que las bandas fueron detectadas usando un reactivo generador de quimioluminiscencia suministrado por Perkin Elmer, Life Sciences (Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el software Image J.

3.2.7. Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR

3.2.7.1. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción

El RNA total de las distintas muestras fue obtenido usando TriReagent® (Ambion®, Life Technologies), siguiendo para ello las recomendaciones del fabricante. En el caso de muestras provenientes de animales tratados con DSS, es necesario eliminar los restos de este arrastrados conjuntamente con el RNA [605], debido a la interferencia que este causa en la eficiencia de la DNA polimerasa y el consecuente perjuicio que ello implica en la eficacia y fiabilidad de la PCR a tiempo real. Por tanto, estas extracciones se realizaron en columnas comerciales que permiten la extracción de RNA sin restos de DSS (Qiagen®, CA, EEUU),

siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de RNA de las distintas muestras se realizó usando un Nanodrop® (Thermo Scientific) considerando asimismo la relación 260 nm/280 nm con el fin de estimar la pureza e integridad del ácido nucleico. Una cantidad total de 1 µg de RNA por muestra fue retrotranscrito para la obtención del DNA complementario, mediante el empleo de la enzima transcriptasa inversa según las indicaciones del fabricante del kit empleado (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories®, California, EEUU). El DNA complementario se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso, mientras que el RNA restante se conservó a -80°C.

3.2.7.2. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Sybr Green como fluoróforo (iQ™ SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. Los genes de referencia elegidos fueron generalmente la subunidad 18S del RNA ribosómico y la hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HPRT), siendo generalmente el promedio de la expresión de ambos empleado como control de carga en los distintos experimentos. Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la Tablas 1 y 2.

3.2.8. Estudio de la translocación bacteriana.

3.2.8.1. Determinación bacteriológica en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs).

Con intención de caracterizar la integridad de la pared intestinal y la capacidad de ésta para contener la carga bacteriana en el lumen intestinal, se analizó la presencia de bacterias en los MLN. Los MLNs fueron extraídos del animal con material quirúrgico estéril, pesados manteniendo y homogeneizados en 1ml de Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) sin suplementar con ayuda del émbolo de una jeringa estéril de 5ml. De este homogenado se sembraron 50µl en placas de Petri que contenían medio Agar MacConkey o medio Brucella agar sangre (Brucella Blood agar with Hemin and VitK1, Difco®). Con el fin de permitir el crecimiento de bacterias intestinales aerobias y anaerobias, las placas de agar MacConkey fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en condiciones aerobias, mientras que las placas de agar Brucella se mantuvieron durante 48 horas a esta misma temperatura en cámaras de anaerobiosis, eliminando el oxígeno presente en el medio con el uso de Anaerogen® 2.5l. Los

resultados se expresan como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido ($\log \text{CFU} \cdot 10^3/\text{g}$ tejido).

3.2.8.2. Determinación bacteriológica en el hígado y medida de LPS.

Se sembraron homogenados de hígado en placas de Petri con distintos medios de cultivo de bacterias. El procedimiento seguido es una adaptación del desarrollado por Sonnenberg *et al* [606]. Brevemente, el hígado fue extraído en condiciones de esterilidad, pesado y un lóbulo completo homogenizado ($1/3 \text{ P.V}^{-1}$) en PBS estéril comercial (GIBCO®) preservando en todo momento las condiciones de esterilidad y de ausencia de pirógenos. A continuación, 50 μl de dicho homogenado fueron sembrados en placas de Agar LB y de Agar MacConkey, que posteriormente se cultivaron durante 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Los resultados fueron expresados como $\log \text{CFU/g}$ tejido.

Por otro lado, el homogenado de hígado restante fue expuesto a baño de ultrasonidos durante 45 minutos. Con este paso aseguramos la lisis de las bacterias presentes. A continuación, el homogenado fue centrifugado a 10000 rpm/10 minutos/4°C y el sobrenadante recogido en un tubo estéril y libre de pirógenos. En este sobrenadante se determinó la concentración hepática de LPS por colorimetría empleando para ello un kit comercial basado en el método LAL o Lymulus Amebocyte Lysate assay (Lonza®). Para ello, se diluyó el homogenado del tejido (1:10) en agua libre de pirógenos (Lonza®) que fue seguidamente sometida a calentamiento 15 minutos a 70°C para eliminar la interferencia que producen las proteínas del homogenado. Posteriormente, se procedió a la disipación de los lípidos presentes mediante el uso de Pyrospense® (Lonza®), y con objeto de precipitar la suspensión obtenida, la muestra fue centrifugada durante 1 minuto a máxima velocidad. En este último sobrenadante se realizó la medida de LPS en campana de flujo laminar siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como Unidades de Endotoxina (EU)/g de tejido.

3.3 Experimentos ex vivo

3.3.1. Cultivo de explantes de colon

Con objeto de estudiar la producción de citoquinas del colon de ratón y de esa forma evaluar el grado de activación de determinados ejes pro/antiinflamatorios por la leptina, se realizó un cultivo de un segmento del órgano de aproximadamente 0.5 cm, siguiendo el siguiente protocolo: dicho segmento fue dividido en dos partes de tamaño similar siendo cada una procesada

de forma paralela e independiente y siempre bajo las mismas condiciones experimentales (n=2). Para eliminar en la medida de lo posible microorganismos provenientes del lumen intestinal, los fragmentos fueron sumergidos durante al menos 15 minutos en un cocktail antimicrobiano preparado en PBS (PBS, anfotericina B [12.5 µg/ml], penicilina [500 U/ml], estreptomina [0.5 mg/ml] y gentamicina [10 µg/ml]). Seguidamente los fragmentos de tejido intestinal fueron sumergidos en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado (10% v/v), L-glutamina (2mM) y antimicrobianos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) e incubados durante 24 horas en una atmósfera con el 5% de CO₂ y a 37° C.

Tras la incubación, el fragmento de tejido colónico y el medio de cultivo fueron recogidos separadamente. El medio de cultivo fue centrifugado a 10000 rpm, 5 min a 4°C para eliminar restos de tejido y el sobrenadante fue conservado a -80°C hasta su uso para la determinación de citoquinas por ELISA. Por otro lado, el fragmento de tejido rescatado del cultivo tras la incubación fue procesado para la determinación de proteínas por el método del ácido bicinchonínico o BCA [607], con objeto de normalizar los resultados obtenidos en función de la concentración proteica de la muestra evitando por tanto el error derivado del tamaño del segmento. De este modo, los resultados pudieron ser expresados en pg de citoquina secretada/µg de proteína tisular.

3.3.2. Determinación de la secreción de citoquinas en explantes de colon por análisis Multiplex®

En el sobrenadante obtenido de los explantes de colon se determinó la concentración de distintos mediadores proteicos secretados por el colon, que incluyen quimioquinas, citoquinas y el factor de crecimiento vascular endotelial A. Así, y mediante una multidetección por inmunoensayo se determinaron las concentraciones de TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, IL-23, IL-27 y VEGFa. La medida se realizó haciendo uso de un kit ProcartaPlex® diseñado para estos analitos (Affimetrix, eBioscience, Inc.) y la lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation).

3.3.3. Cultivo primario de células mononucleares de bazo

3.3.3.1. Diseño experimental *in vitro*

Los experimentos *in vitro*, se realizaron en placas de cultivo de polipropileno con tratamiento superficial para células adherentes (Thermo Scientific NUNC™ (Roskilde, Dinamarca)).

Se cultivaron células obtenidas del bazo de los ratones, con objeto de determinar la producción de citoquinas por linfocitos y macrófagos presentes en los órganos de estos animales. Para ello, esplenocitos fueron estimulados con concanavalina A y LPS, respectivamente. Cada una de estas condiciones, con un *n* igual a cuatro, incluyó un grupo control llevado en paralelo que no incluía ningún estímulo en el medio, dado que la duración de los experimentos fue de 24 horas en el caso de LPS y de 48 para la concanavalina A.

3.3.3.2 .Aislamiento de esplenocitos

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo y se dispuso en medio de cultivo DMEM, suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]). Una vez eliminada la grasa adherida al órgano, éstos fueron presionados mecánicamente con la parte posterior del émbolo de una jeringa de 5 ml estéril, con objeto de desorganizar la estructura del bazo y obtener una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada durante 30 segundos a temperatura ambiente resuspendiendo las células en un tampón de lisis comercial. Posteriormente estas fueron rápidamente lavadas y filtradas para obtener una suspensión de células mononucleares y eliminar restos del órgano de procedencia utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350). Las células mononucleares aisladas se dispusieron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomina [0.1 mg/ml] y anfotericina B [2.5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol.

A continuación, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0.4% (P.V⁻¹) en cámara de Neubauer. Se sembraron 0.5 millones de células por pocillo en placas de 24 pocillos manteniendo una densidad celular de 1 millón de células/ml. Las células fueron estimuladas e incubadas durante 24 y 48 horas en atmósfera de CO₂ (5%) a 37°C, empleándose como estímulos la lectina concanavalina A (Con A) (5 µg/ml) y el LPS (1 µg/ml). Las muestras de medio de cultivo obtenidas fueron centrifugadas a 10000 rpm/5

min/4°C y conservadas a -80°C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA.

3.3.3.3. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular mediante ELISA

Tras el cultivo primario de esplenocitos, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares y conservado a -80° C hasta su utilización. Diversos kit comerciales fueron empleados para la cuantificación de las citoquinas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de ELISA. En todos los casos se siguieron estrictamente las instrucciones recomendadas por el fabricante. Los kits empleados fueron suministrados por eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU (TNF α , IFN γ , IL6 e IL10, todos ellos de ratón). Los resultados se expresan como pg/ml de medio.

4. EVALUACIÓN DEL ESTADO METABÓLICO

4.1. Hemograma y estudio hematológico

Antes de obtener el plasma de los animales, se separó una alícuota de sangre (30-50 μ l) para determinar la cantidad de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, la cantidad total de hemoglobina en sangre y la fracción de sangre compuesta de glóbulos rojos (hematocrito) y de plaquetas (trombocrito). Dicho análisis fue realizado en un contador hematológico (Mythic® 22CTC2 Diagnostics).

4.2. Citometría de flujo.

Para el análisis de la expresión de determinados marcadores celulares y por tanto el estudio de la abundancia relativa de diferentes subpoblaciones celulares de carácter inmunológico en los ratones, se hizo uso de un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). Las células fueron marcadas y preparadas para su análisis de la siguiente manera. Tras su obtención, fueron lavadas con tampón de marcaje para citometría de flujo (PBS, BSA 2 % (m.V⁻¹), EDTA 10 mM, Azida 0.1% (m.V⁻¹)). Seguidamente, se les realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos, todos ellos suministrados por BD Biosciences® (California, EEUU) a diluciones que oscilan entre 1:100 y 1:200. En la misma solución de marcaje se incluye mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) a una dilución de 1:500. Transcurridos 30 minutos de exposición a anticuerpos superficiales a 4°C, las células fueron lavadas y fijadas en PBS-paraformaldehído al 2 % (m.V⁻¹) durante

10 minutos/4°C, lavadas una vez y finalmente resuspendidas en tampón de marcaje hasta su adquisición.

En el caso del marcaje de forkhead box p-3 (Foxp3) de localización nuclear, una vez realizado el marcaje de moléculas superficiales, las células fueron permeabilizadas usando el kit específico de permeabilización nuclear (Foxp3 transcription factor fixation/permeabilization, eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU), marcadas usando el anticuerpo PercP-Foxp3 (eBiosciences®, San Diego, CA, EEUU) a una dilución de 1:150 e incubados durante toda la noche a 4°C. Los datos arrojados por el citómetro de flujo fueron analizados mediante el software informático FlowJo (Tree Star, California, EEUU).

4.3. Evaluación de parámetros plasmáticos.

4.3.1. Determinación de la glucemia.

En el experimento de colitis por TNBS, la glucemia se determinó en el plasma obtenido a punto final del experimento por colorimetría utilizando kits comerciales (Spinreact, Gerona, España).

El seguimiento glucémico en los ratones tratados con leptina, se llevó a cabo utilizando de reactivas y un glucómetro (Accu-Chek®, Aviva) tomando una pequeña muestra de sangre del extremo distal de la cola del animal, realizando para ello una pequeña incisión cuya costra era levantada cuidadosamente para medidas repetidas, con objeto de evitar nuevas incisiones.

4.3.2. Estudio del perfil lipídico general.

Se determinaron las concentraciones de triglicéridos y colesterol total por colorimetría (Spinreact, Gerona, España), así como los ácidos grasos libres (Waco Chemicals, Richmond, VA).

4.3.3. Determinación de corticosterona.

La concentración de corticosterona sistémica fue determinada por ELISA haciendo uso de un kit comercial de la casa Enzo® LifeSciences Inc, Nueva York, EEUU.

4.3.4. Medida de LPS en plasma.

El LPS se determinó en plasma siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito para hígado y haciendo uso del mismo kit comercial.

4.3.5. Determinación de zonulina y haptoglobina.

Se determinaron zonulina y haptoglobina plasmáticas utilizando un kits de ELISA (MyBioSource, San Diego, CA, EEUU y R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EEUU, respectivamente).

4.3.6. Determinación de leptina.

La leptinemia fue determinada por ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EEUU) en todos los animales excepto en los ratones que recibieron tratamiento con leptina pegilada.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de $P < 0.05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, EEUU).

Tabla 1: Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real (*Rattus norvegicus*)

Gen	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 3'-5'
18S	CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	CGCCGGTCCAAGAATTTCAAC
Adiponectina	TGGCGATTTTCTTTCATTC	AGGATTAAGAGGAACAGGAG
ALPL	GCCAGAGAAAGAGAAAGACC	TCTTGGAGAGAGCCACAA
CD14	AGAATCTACCGACCATGAAG	GATCTGAGAAGTTGCAGTAG
Ciclina D1	AAAAACAAACCACAAAGACG	AATTTTCCTCAGTTTGGATGG
Clau-4	AAAAAGACTTTTCTCAGCCC	AACTCAGGATGACTCCTAAC
Cxcl-1	GCTCTGAGACAATGAACGCTACAC	TTCTTCCACATCTATGCCACTTGAG
Foxp3	CTGCTTGGCAGTGCTTGAGAA	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
Grelina	GAGAAAGGAATCCAAGAAGC	GAGCATTGAACCTGATTTCC
HP	AAAAACAAACCACAAAGACG	AATTTTCCTCAGTTTGGATGG
IAP	GACATTGATGTGATCCTTGG	CTCTCGATTCCAAACATACC
IFN γ	GAAAGCCTAGAAAGTCTGAAG	AGTATTTTCGTGTTACCGTC
IL-10	TCTCCCCTGTGAGAATAAAAG	TAGACACCTTTGTCTTGGAG
IL-17A	TGGACTCTGAGCCGCAATGAGG	GACGCATGGCGGACAACAGAGG
IL-1 β	AATGACCGTTTCTTTGAGGCTG	CGAGATGCTGCTGTGAGATT
IL-6	GCTCTGGTCTTCTGGAGTTCCG	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
LBP	ATGTCAGTCCTGGGAATC T	CATTGAACATGCCGACTTTG
Leptina	CTCATCAAGACCATTGTCAC	TGAGGATCTGTTGATAGACTG
Lyz-2	ATCAATAGCCGATACTGGTG	CCGATAGATCTCGGTTTTTAC
Lyz1-1	CACAAGGGATGAACTATTGG	TGTGAGGAAAAGGGATACTC
PDGFR β	GACCTATCGTGCTACCTTAATC	CTGCCTTTGGAGATGTAGTT
Reg3 γ	CTGTTCATATTTAGGTACGAG	CTCCACTAAGAATAGACACAAG
Resistina	GATCAATCAAGACTTCAGCTC	GTGACACATTGTATCCTCAC
S100A8	CTGGTATAAAAGGGAATCACC	TTATTCTGCACAAACTGAGG
TFF3	GTATGGCTCCAACAAATGTC	GTACATTCTGTCTCTTGCAG
TGF β	ACTGGCGAGCCTTAGTTTG	CGTGGCTTCTAGTGCTGACG
TLR4	ACCTAGATCTGAGCTTCAAC	TTGTCTCAATTTACACCTG
TNF α	GTCGTAGCAAACCACCAA	GCTGACTTTCTCCTGGTATG
ZO-1	AAAAAGACTTTTCTCAGCCC	AACTCAGGATGACTCCTAAC

Tabla 2: Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real (*Mus musculus*)

Gen	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 3'-5'
18S	TGGTGGAGCGATTTGTCTGG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTACG
Adiponectina	CCACTTTCCTCATTCTG	CTAGCTCTTCAGTTGTAGTAAC
Apelina	GCCTTCTAAAGCAGGATTG	AATAGATGTGAGGGTTCCAG
Ccl-2	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TTGGTGACAAAACACTACAGC
CD14	GAATCTACCGACCATGGAG	AAGTTGCAGGAACAACCTTC
CiclinaD1	GTCCTACTGTTTGCGGCTTG	GCAGACGCCTCTTGGGTCTACAATA
Clau-4	GACTGTGCAAAGTTACTAGC	ACCAGCAATTTGGATGTAAG
Clau-5	AACAGTTCCTACTGAGATCC	CTTTTAAACACGTCCCTCTG
F4/80	TTCAAATGGATCCAGAAGG	CAGAAGGAAGCATAACCAAG
FGF7	ACAGAACAAAAGTCAAGGAG	TGATGAGAGAAAAGTCGTC
Grelina	AGATCAGTTCAATGCTCC	ATCCTGAAGAACTTCCCC
HP	ATGGACTTTGAAGATGACAG	GTAGTCTGTAGAAGTGTCCG
HPRT	AGGGATTTGAATCACGTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
IFN γ	GCTCTGAGACAATGAACGCTACAC	TTCTTCCACATCATGCCACTTGAG
IL-10	CAGGACTTTAAGGGTTACTTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
IL-17A	ACGTTTCTCAGCAAACCTTAG	CCCCTTTACACCTTCTTTTC
IL-1 β	AAGGGCTGCTTCCAAACCTTTGAC	TGCCTGAAGCTCTTGTTGATGTGC
IL-22	ATCAGTGCTACCTGATGAAG	CATTCTTCTGGATGTTCTGG
IL-27	AATCTCGATTGCCAGGAG	CTCAGAGTCAGAGAGGTG
IL-6	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
Jun	CATGTTTGTTTGTGGGTG	ATGGATAATGCAGCAAAGAG
LBP	CTGGATTCATCGATAAGCTG	TTTGCATGATGCTCTTTAGG
Leptina	CTTTGGTCTATCTGTCTTATG	TCTTGGACAAACTCAGAATG
Ly6G	CCCTTCTCTGATGGATTTTG	AGTATTGTCCAGAGTAGTGG
Lyz2	ATTTCCCCTCTAAGTCACAG	TGAAGAAGTACCTACAGAG
MUC3	AAAGATTACCTCCAATCTCC	TAAAACCTAAGCATGCCCTTG
Myc	TTTTGTCTATTTGGGGACAG	CATAGTTCCTGTTGGTGAAG
PCNA	CTGAGGTACCTGAACTTTTTC	TATACTCTACAACAAGGGGC
Reg3 γ	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAGA
Resistina	CCTCCTTTTCCTTTTCTTCC	CATTTGGAACAGGGAGTTG
S100A8	GCCCTCTACAAGAATGACTTCAAG	ATCACCATCGCAAGGAACCTCC
SOCS3	CAAAGAAATAACCACTCCC	GATCTGCGAGGTTTCATTAG
TLR4	GATCAGAAACTCAGCAAAGTC	TGTTTCAATTTACACCTGG
TNF α	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC
VEGF	TAGAGTACATCTTCAAGCCG	TCTTTCTTTGGTCTGCATTC
Visfatina	CAAGAGATTGTAGAGGGAATG	TCTCGGGTTAACTTCTGTAG
ZO1	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT

RESULTADOS

1. Inducción de colitis aguda en ratas Zucker por TNBS.

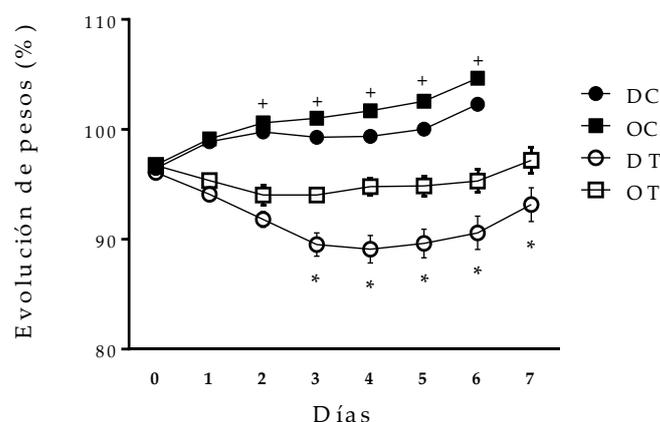
Con objeto de responder al primero de nuestros objetivos y poder evaluar la influencia de la obesidad en el desarrollo de la EII, decidimos aplicar el modelo de colitis químicamente inducida por instilación rectal de TNBS en la rata Zucker.

La rata Zucker es uno de los modelos experimentales más conocidos y empleados de obesidad genética. La obesidad en estos animales se hereda como carácter autosómico recesivo y deriva de una mutación en el receptor de la leptina. Dicha mutación, denominada *fa*, del inglés "*fatty*", apareció por azar en los laboratorios de Theodore y Louis Zucker en 1961 [608]. Estos animales acusan hiperfagia, muy pronunciada en edad temprana, obesidad, hiperinsulinemia y dislipemia, por lo que es un modelo frecuentemente utilizado en el estudio del síndrome metabólico. En cambio, las ratas heterocigóticas para la mutación (*fa/+*), en las que el receptor de leptina es funcional, son delgadas y mantienen perfiles lipídicos e insulinémicos normales, que hacen adecuado su uso como controles sanos en este modelo.

El modelo de colitis aguda por TNBS, fue descrito por Morris en el año 1989, en rata [595]. Dado que el TNBS no es tóxico de forma directa para el epitelio, se administra por vía intrarrectal en una solución de etanol al 50%, la cual daña el epitelio y permite el acceso del TNBS a la mucosa. En dicho contexto, éste se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada previa reacción con las proteínas tisulares. En ausencia de TNBS la respuesta inflamatoria al etanol es aguda y se resuelve completamente en unos 3-4 días. Por el contrario, la combinación TNBS/etanol produce una respuesta que se prolonga durante algunas semanas. La afectación colónica se caracteriza por ser de tipo transmural, con anorexia, potente pérdida de peso y diarrea. Se produce una necrosis epitelial, seguida de una inflamación de la mucosa, con formación de granulomas y fibrosis marcada, además de alteraciones funcionales como trastornos en el transporte hidroelectrolítico y en la motilidad.

Como ya se ha descrito en el apartado de material y métodos, cada grupo de animales delgados y obesos fue aleatoriamente dividido en grupo control y colítico, respectivamente. En adelante, cada grupo será abreviado como DC, delgado control; OC, obeso control; DT, delgado TNBS o delgado colítico; y OT, obeso TNBS o colítico. El modelo de colitis aguda inducida por TNBS se desarrolló con normalidad, con aparición de diarrea y sangrado rectal en ambos grupos

experimentales. Merece la pena mencionar que el malestar aparente de los animales fue más marcado en el grupo OT, hallando un deceso al sexto día, de manera que el número de animales quedó restringido a 9. Se realizó seguimiento diario del peso corporal así como del consumo de agua y pienso. La pérdida de peso corporal fue el parámetro con carácter objetivo seleccionado en este modelo como orientativo de la evolución de la colitis. Pudo comprobarse como, efectivamente, desde el día 1 los animales colíticos comienzan a perder peso, apareciendo diferencias significativas entre grupos DT y OT a partir del día 3, llegando hasta un 20% de pérdida en el grupo DT y un 6% en OT (figura 1A). Dada la naturaleza de la rata Zucker, los grupos DC y OC mostraron una evolución desigual, con diferencias significativas entre sí desde el día 2, duplicando el grupo OC la ganancia total de peso al final del experimento con respecto a DC (figura 1C), dicho de otro modo, en tan sólo una semana el peso ganado por los animales obesos fue el doble que el ganado por el grupo delgado control. Asimismo, los grupos colíticos mostraron una menor ingesta de pienso. En la rata Zucker, la ingesta está sesgada por el fenotipo, de modo que la cuantificación en términos absolutos, es decir, consumo de gramos de pienso por rata y día, arrastra consigo dicho error. Por tanto, la aproximación más adecuada para evaluar dicho parámetro consiste en la determinación de la variación porcentual del grupo colítico, delgado u obeso, con respecto a su grupo control no colítico. En este sentido, como muestra la gráfica de la figura 1D, el grupo OT experimentó una anorexia más pronunciada.



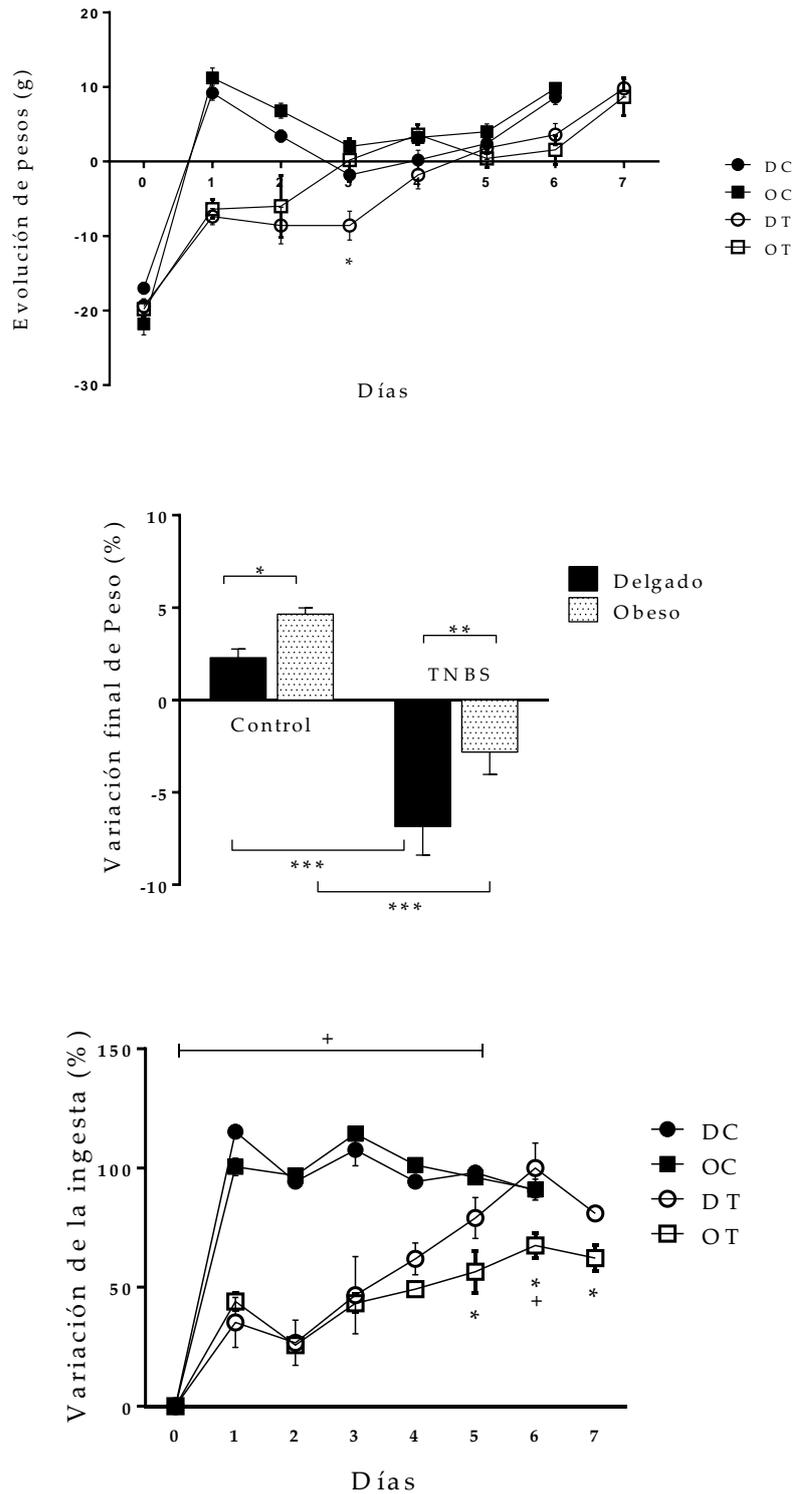


Figura 1. Evolución de los animales en el transcurso de la colitis inducida por TNBS. A. Evolución del peso corporal, expresado como porcentaje de peso inicial. B. Evolución del peso corporal en gramos. C. Variación final de pesos (%). D. Consumo de pienso por animal y día con respecto al control. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $p < 0.05$ vs DC; * $p < 0.05$ vs DT, excepto en variación final de pesos, donde * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ entre los grupos señalados.

RESULTADOS

La afectación colónica a nivel macroscópico fue sustancialmente mayor en el grupo colítico obeso (OT), evidenciado principalmente por el grado de fibrosis y acortamiento colónico. De hecho, la ratio peso/longitud quintuplicó la del grupo OC, a diferencia del grupo DT, para el que dicha relación fue menos de 4 veces superior a la de su control. El índice de daño macroscópico así como la cuantificación digital del área necrosada fueron a su vez superiores en los animales obesos, aunque en este caso dicha diferencia no alcanzó significancia estadística. Cabe destacar que el incremento del tamaño del bazo de los animales obesos colíticos, tanto en términos absolutos como relativos al peso corporal, fue superior al que presentaron los delgados, indicando una mayor afectación inflamatoria más marcada a nivel sistémico. (Imagen 1, Tabla 1).

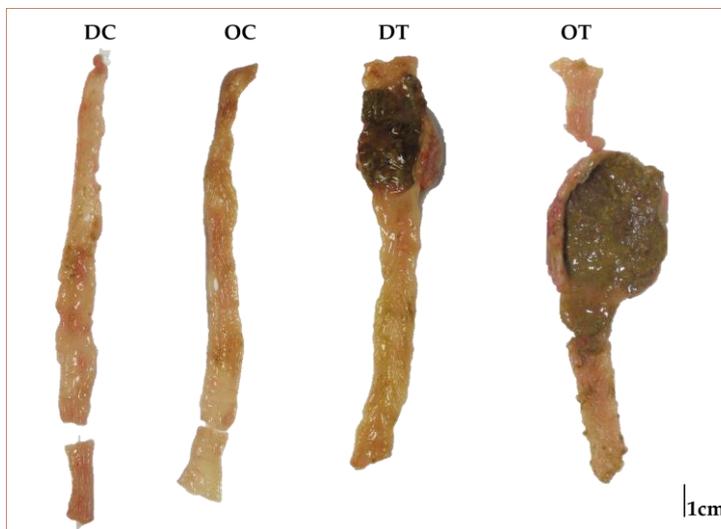


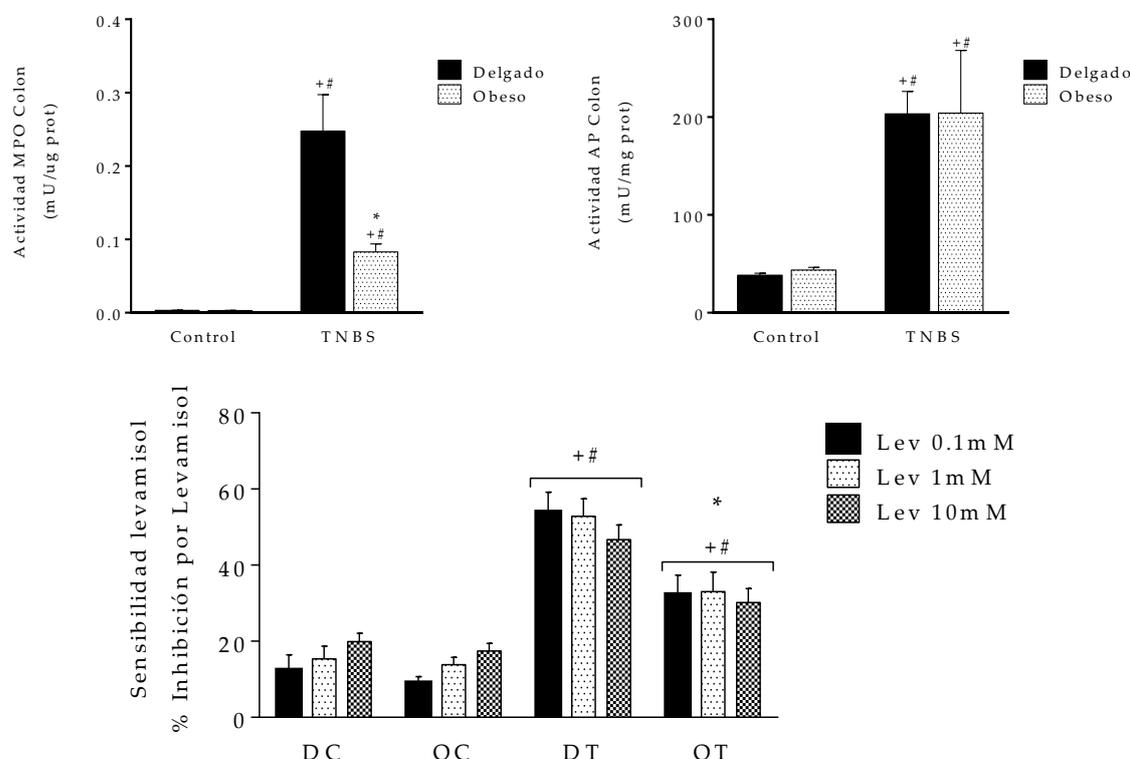
Imagen 1. Imágenes representativas de las alteraciones macroscópicas en colon. Fotografías realizadas tras el sacrificio de los animales.

Grupo	DC	OC	DT	OT
IDM (UA)	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2	11.9 ± 1.6
Área Necrosada (cm ²)	-	-	8.4 ± 1.3	12.7 ± 2.8
Relación Peso/Longitud (mg/cm)	71.6 ± 0.00	83.5 ± 0.00	285.6 ± 0.03 ^{+#}	431.4 ± 0.10 ^{+#*}
Relación Peso colon/Peso corporal/Longitud (cm ⁻¹)	0.185 ± 0.004	0.171 ± 0.006	0.838 ± 0.096 ^{+#}	0.981 ± 0.223 ^{+#}
Peso del Bazo (g)	0.63 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.85 ± 0.05 ^{+#}	1.10 ± 0.06 ^{+#*}

Peso Relativo del Bazo (%)	163.0 ± 5.5	128.5 ± 4.8 ⁺	249.0 ± 11.0 ⁺	250.2 ± 16.0 ^{+#}
Incremento del Bazo (vs Control)			1.53 ± 0.07 vs DC	1.95 ± 0.12 vs OC

Tabla 1. Parámetros macroscópicos. Influencia de la obesidad y/o inflamación en relación al daño macroscópico, área necrosada, relación peso/longitud en el colon, y tamaño absoluto y relativo del bazo con respecto al peso corporal. IDM, índice de daño macroscópico. UA: Unidades arbitrarias. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0.05 vs DC; # P<0.05 vs OC; * P<0.05 vs DT.

Las determinaciones bioquímicas realizadas en el tejido colónico, mostraron un incremento en la actividad MPO y fosfatasa alcalina en los animales colíticos, reflejo de la infiltración leucocitaria (principalmente neutrofílica) y estrés celular, secundarios al proceso inflamatorio asociado al modelo. Como puede observarse en la figura 2A, la actividad MPO del grupo OT fue aproximadamente un tercio de la encontrada en DT. La actividad de la AP fue similar en ambos grupos inflamados, no obstante el grupo OT presentó diferencias significativas en la sensibilidad de la AP frente a distintas concentraciones de levamisol (inhibidor de la AP), fenómeno asociado al cambio de isoforma de la enzima que se produce en respuesta a inflamación (figura 2B y C).



RESULTADOS

Figura 2. Determinación de actividades enzimáticas en tejido colónico. A. MPO (mU/mg proteína); B. AP (mU/mg proteína); C. Sensibilidad de AP a distintas concentraciones de levamisol, expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT. Lev: levamisol.

El análisis histológico de cortes transversales de colon, evaluado mediante tinción con H&E, puso de manifiesto una patente alteración del epitelio intestinal a consecuencia de la colitis en ambos grupos, DT y OT, con pérdida, deformación y/o erosión en criptas, engrosamiento de submucosa e infiltración leucocitaria, así como una marcada hiperplasia muscular (Tabla 2, imagen 2).

	DC	OC	DT	OT
Longitud de las criptas (0-2)	0.05 \pm 0.05	0.2 \pm 0.08	0.95 \pm 0.14	1.00 \pm 0.19
Infiltración Leucocitaria (0-4)	0.15 \pm 0.11	0.35 \pm 0.13	1.5 \pm 0.47	0.94 \pm 0.45
Engrosamiento Submucosa (0-2)	0.0	0.0	0.65 \pm 0.23	0.5 \pm 0.25
Erosión (0-2)	0.1 \pm 0.1	0.05 \pm 0.05	0.4 \pm 0.22	0.25 \pm 0.25
Pérdida Estructura Criptas (0-2)	0.0	0.0	0.4 \pm 0.22	0.375 \pm 0.25
Hiperplasia Muscular (cm)	2.1 \pm 0.21	1.79 \pm 0.3	3.63 \pm 0.41	3.44 \pm 0.2
Valoración total (UA)	2.4 \pm 0.3	2.39 \pm 0.34	7.53 \pm 1.37 ⁺ #	6.5 \pm 0.8 ⁺ #

Tabla 2. Valoración histológica de cortes transversales de colon sometidos a tinción con hematoxilina eosina. UA: unidades arbitrarias. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT.

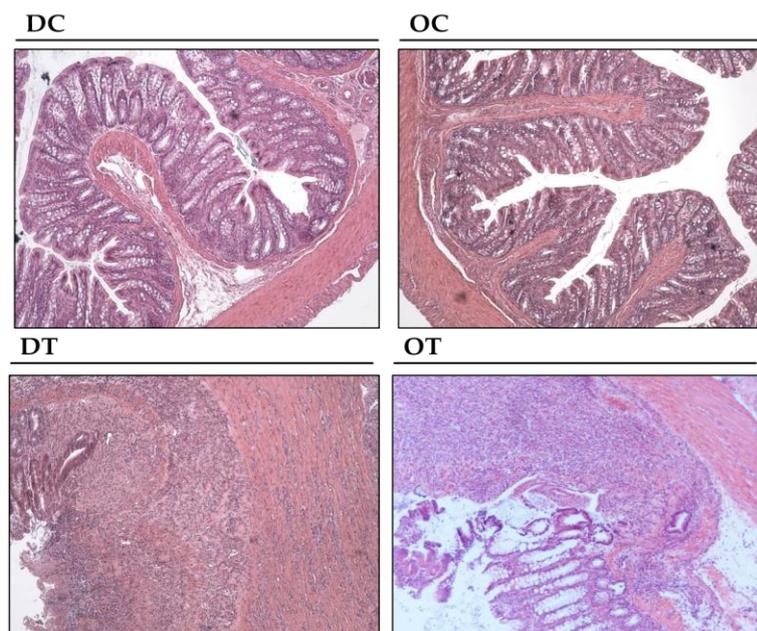


Imagen 2. Estudio histológico del colon. Imágenes (10x) de secciones transversales de tejido colónico sometidas a tinción de H&E. Imágenes representativas de los diferentes grupos experimentales.

Asimismo, analizamos la integridad del glucocálix, el cual está principalmente formado por mucinas que se disponen en la cara apical del epitelio intestinal contribuyendo positivamente a la función de barrera intestinal. Para ello, se realizó una tinción con azul alcian-rojo nuclear, que tiñe específicamente de azul el mucopolisacárido y de rojo núcleos y citoplasma. Como puede observarse en la imagen 3, el grupo OC muestra una importante producción de mucinas, la cual sufre una marcada reducción en condiciones inflamatorias. Por el contrario, en los animales delgados no se observó cambio alguno asociado a la inflamación intestinal.

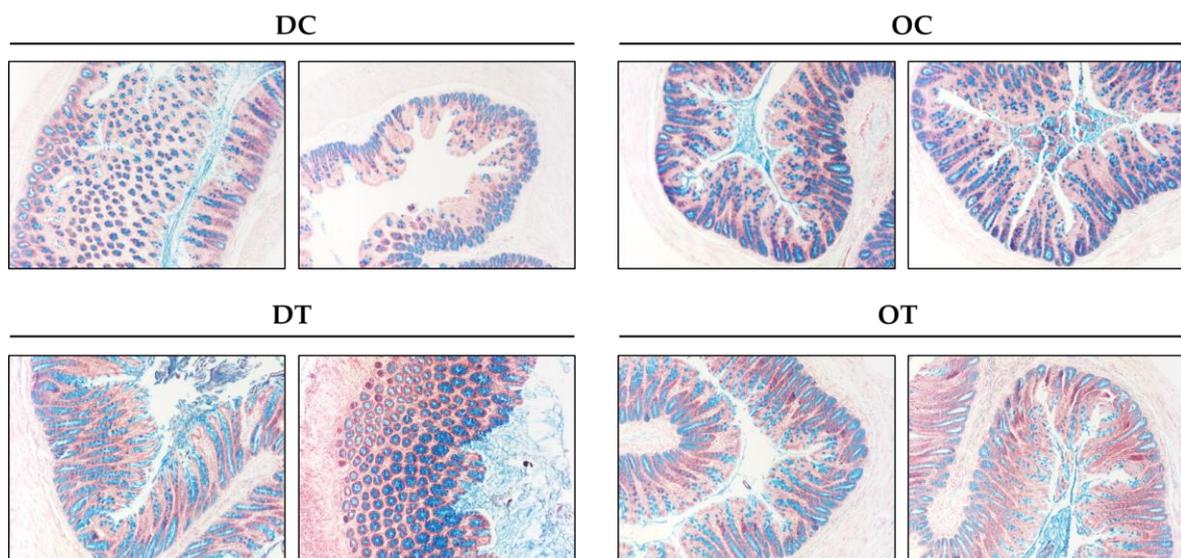


Imagen 3. Integridad del glucocálix sobre el epitelio intestinal en el modelo de colitis inducida por TNBS en rata Zucker. Las imágenes mostradas corresponden a cortes procedentes de una misma tinción de azul alcian y rojo nuclear (n=2).

Con objeto de caracterizar la función de barrera intestinal en el modelo de obesidad genético de rata Zucker, así como el grado de afectación de la misma en condiciones inflamatorias, se realizamos diversos estudios. En primer lugar, decidimos evaluar *ex vivo* la permeabilidad paracelular mediante la determinación del paso de FITC-d a través del epitelio colónico, montado en cámara de Ussing. Tal y como se observa en la figura 3, la inflamación del tejido favoreció sustancialmente el paso del fluoróforo al reservorio basolateral del dispositivo, indicando un incremento de la permeabilidad intestinal. En relación a la inflamación, el incremento fue equiparable en ambos grupos colíticos, sin afectarse en mayor o en menor medida por la obesidad. No obstante, en términos absolutos la señal de FITC-d fue significativamente mayor en el grupo OT con respecto a DC, indicando que el fenotipo *fa/fa* perjudica en mayor grado la función de barrera, pudiendo observarse una tendencia al alza en condiciones fisiológicas,

que se convierte en significativa con el proceso inflamatorio ($P=0.0036$ vs DC). En segundo lugar, se analizó la posible translocación de bacterias luminales a órganos extraintestinales, como el hígado o los ganglios mesentéricos (MLN), mediante la siembra del homogenado del tejido en un medio de cultivo bacteriano selectivo para enterobacterias (agar MacConkey). Los resultados, concordantes entre sí y a su vez con el dato anterior, muestran como la translocación bacteriana secundaria al proceso inflamatorio sufre un incremento significativo por la condición de obesidad. Dada la cercanía de los ganglios mesentéricos con el intestino, la translocación sufrida por este órgano fue lógicamente mayor que en el caso del hígado. La presencia de bacterias en ganglios está significativamente incrementada por la obesidad, tanto en condiciones basales como inflamatorias. En hígado no se detectó presencia bacteriana alguna en grupos DC y OC, sin embargo, ambos grupos colíticos exhibieron translocación bacteriana, si bien no diferente en términos cuantitativos. Sin embargo, cualitativamente puede observarse que tan sólo en un animal del grupo OT no se detectó bacteria alguna, a diferencia del grupo DT en el que ocurrió lo propio en 4 animales (figura 4). En tercer lugar, se cuantificó la presencia de LPS por el método LAL, tanto en MLN como en el plasma obtenido de sangre portal. Como era de esperar, la presencia de LPS en MLN fue manifiesta en todos los grupos experimentales, siendo ésta sustancialmente mayor en los grupos obesos. En lo referente al LPS en plasma de sangre portal, como se puede observar en la figura 5, se produce cierto incremento ante el proceso inflamatorio en los animales delgados, siendo dicho fenómeno mucho más marcado en bajo el condicionante de la obesidad, alcanzando el grupo OT la significancia estadística ante los dos grupos sanos.

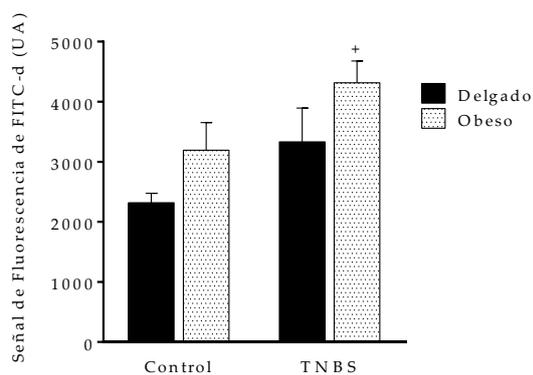


Figura 4. Estudio de la permeabilidad paracelular *ex vivo* en colon distal en cámara de Ussing. Concentración de FITC-d en el reservorio basolateral a punto final. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P<0.05$ vs DC.

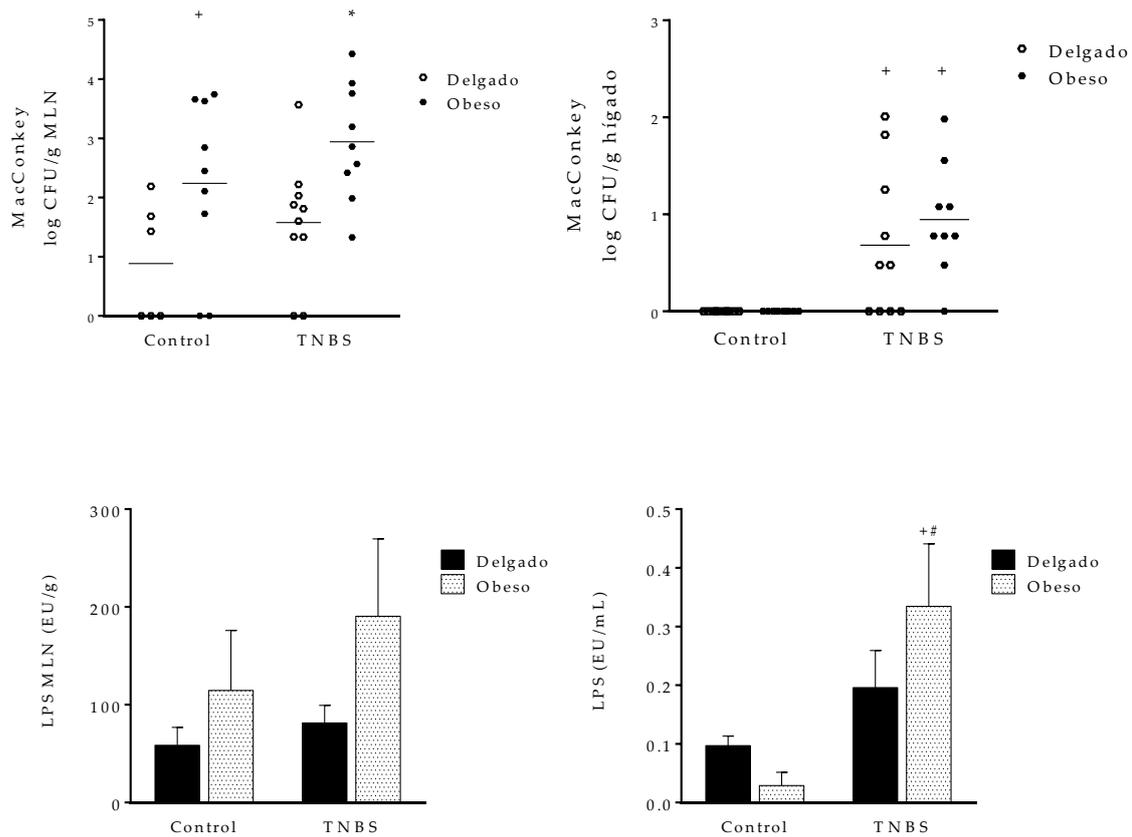


Figura 5. Estudio de la translocación bacteriana a órganos extraintestinales. Arriba: Bacterias aerobias presentes en MLN (izquierda) e hígado (derecha) cultivadas en medio selectivo para enterobacterias (Agar MacConkey). Abajo: concentración de LPS en MLN (izquierda) y plasma portal (derecha). Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P<0.05$ vs DC; # $P<0.05$ vs OC; * $P<0.05$ vs DT.

A la luz de estos resultados, decidimos evaluar la posible afectación hepática derivada de la llegada de bacterias y/o LPS. Como se observa en la figura 6, la expresión de fosfatasa alcalina no específica de tejido (ALPL), enzima que cataliza la desfosforilación de LPS y se encuentra incrementada en hígado por la colitis ulcerosa, también aparece aumentada en el modelo de colitis inducida por TNBS. Dicho fenómeno está potenciado por la obesidad, mientras que hemos encontrado valores comparables entre animales obesos sanos y delgados inflamados (figura 6A). Asimismo, la expresión de la proteína de unión al LPS (LBP, *LPS-binding protein*) se vio notablemente aumentada por la inflamación sin sufrir modulación alguna por la condición de obesidad (figura 6B). Sin embargo, la expresión de TLR4 y de CD14, quien actúa como co-receptor junto al TLR4 en el reconocimiento del LPS, únicamente se modificó en los animales obesos, quienes

mostrando de una expresión basal menor, sufrieron un incremento mucho más destacable que llega a alcanzar la significancia estadística (figura 6 C y D).

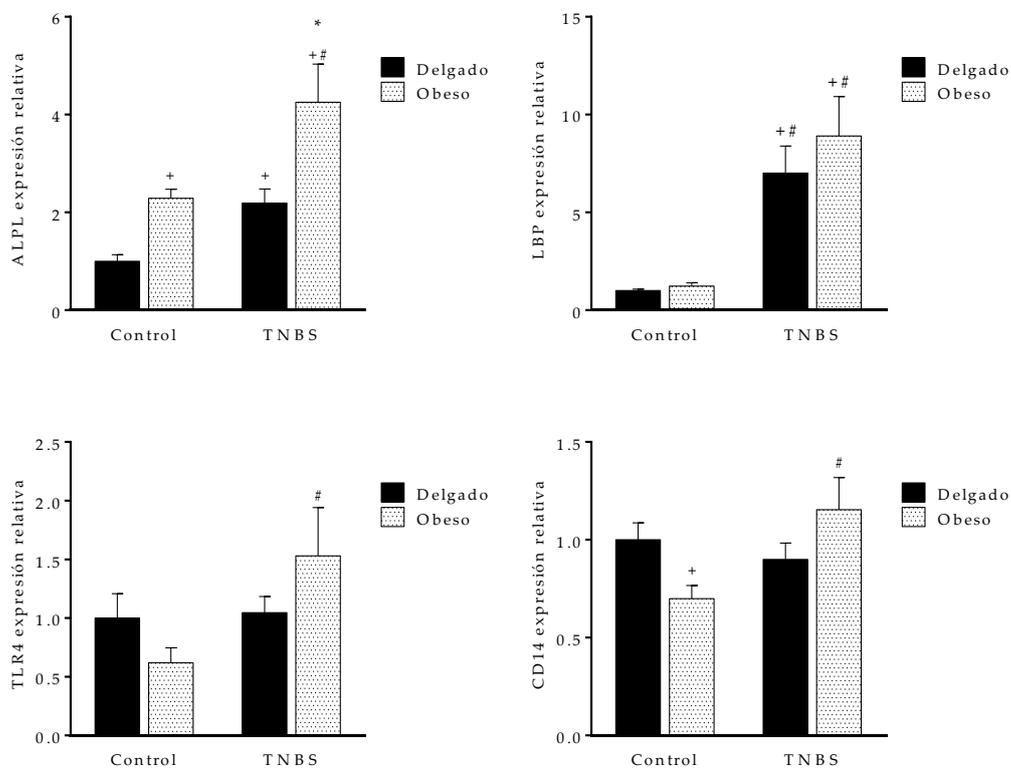


Figura 6. Expresión génica relacionada con el metabolismo del LPS en el tejido hepático y su modificación por la inflamación y/o la obesidad en la rata Zucker. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Los datos se analizan empleando el 18s de expresión constitutiva como gen de referencia, y se expresan como incremento medio \pm SEM relativo al grupo DC. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT.

A continuación estudiamos la modulación de la función de barrera intestinal centrándonos en los cambios de expresión génica de algunos elementos que la regulan. Entre estos, destacan las proteínas implicadas en las uniones estrechas. Claudina 4 sufrió un marcado aumento de expresión por la inflamación, el cual desaparece ante la concomitancia de la obesidad (grupo OT) ($P < 0.05$). Por otro lado, la expresión de ZO-1 no sufrió modificación a causa de colitis, aunque puede observarse un pequeño descenso en la rata Zucker obesa no colítica, que no alcanzó significancia ($P = 0.17$). No obstante, los animales obesos colíticos presentaron cambios en la expresión de haptoglobina, siendo esta menor en el grupo OC con respecto al DC (figura 6A). De hecho, la concentración plasmática de zonulina (pre-HP2), proteína reguladora de las uniones estrechas intercelulares, precursora de la haptoglobina y cuya elevación en plasma ha sido relacionada con

trastornos que cursan con disfunción en la barrera intestinal, fue significativamente mayor en el grupo OT (figura 6B).

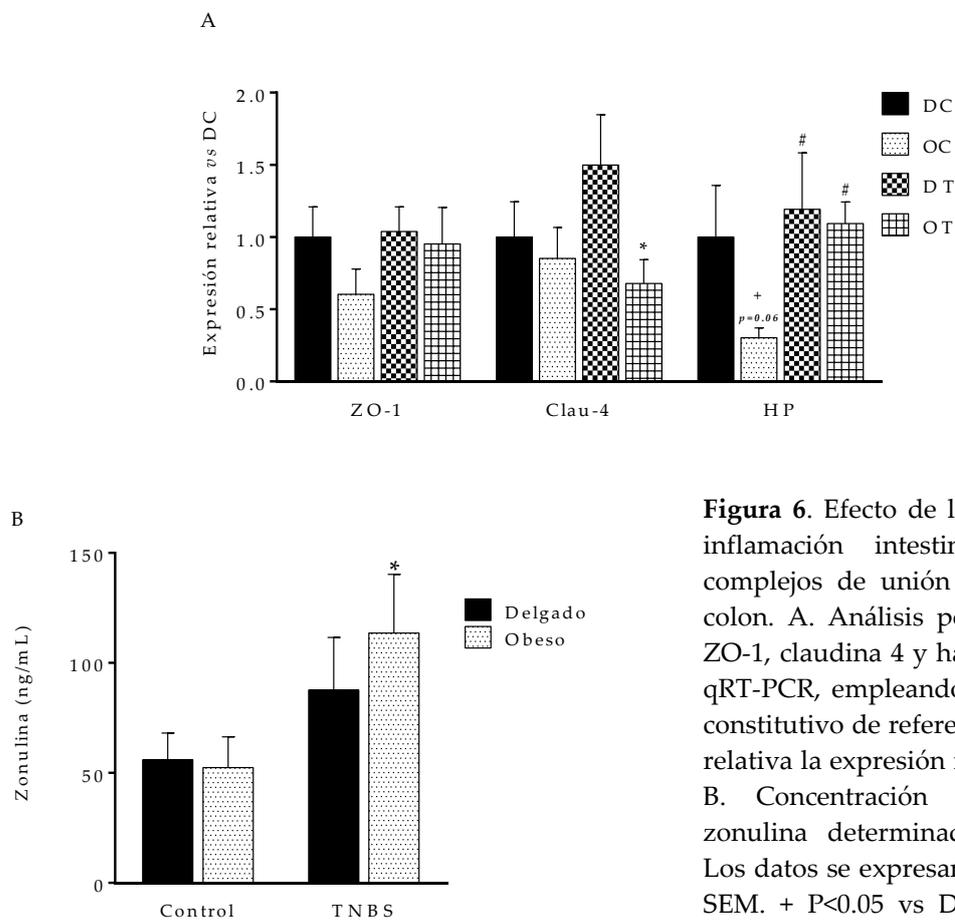


Figura 6. Efecto de la obesidad y la inflamación intestinal sobre los complejos de unión intercelular en colon. A. Análisis por qRT-PCR de ZO-1, claudina 4 y haptoglobina por qRT-PCR, empleando 18s como gen constitutivo de referencia y haciendo relativa la expresión respecto de DC. B. Concentración plasmática de zonulina determinada por ELISA. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT.

En relación a los genes implicados en el proceso inflamatorio colónico, los resultados obtenidos por qRT-PCR fueron tan sorprendentes, como consistentes. En términos generales, la rata Zucker obesa no sufrió un mayor incremento en la expresión de ninguno de los genes estudiados en comparación con el grupo DT, encontrando incluso menor expresión o no modificación en alguno de estos. De este modo, no hallamos cambio significativo en la expresión de IAP, TLR4, COX-2 o IL-10 relacionado con colitis u obesidad. La expresión de ALPL, Cxcl-1, iNOS, TNF α , IFN γ , IL-17a o Foxp3 siguió un mismo perfil, exhibiendo ambos grupos colíticos un aumento en la expresión aunque dicho aumento fue de menor magnitud en los OT. Por último, genes codificantes para S100A8, IL-1 β e IL-6 vieron incrementada su expresión por el proceso inflamatorio de modo comparable entre ambos grupos (figuras 7A y B).

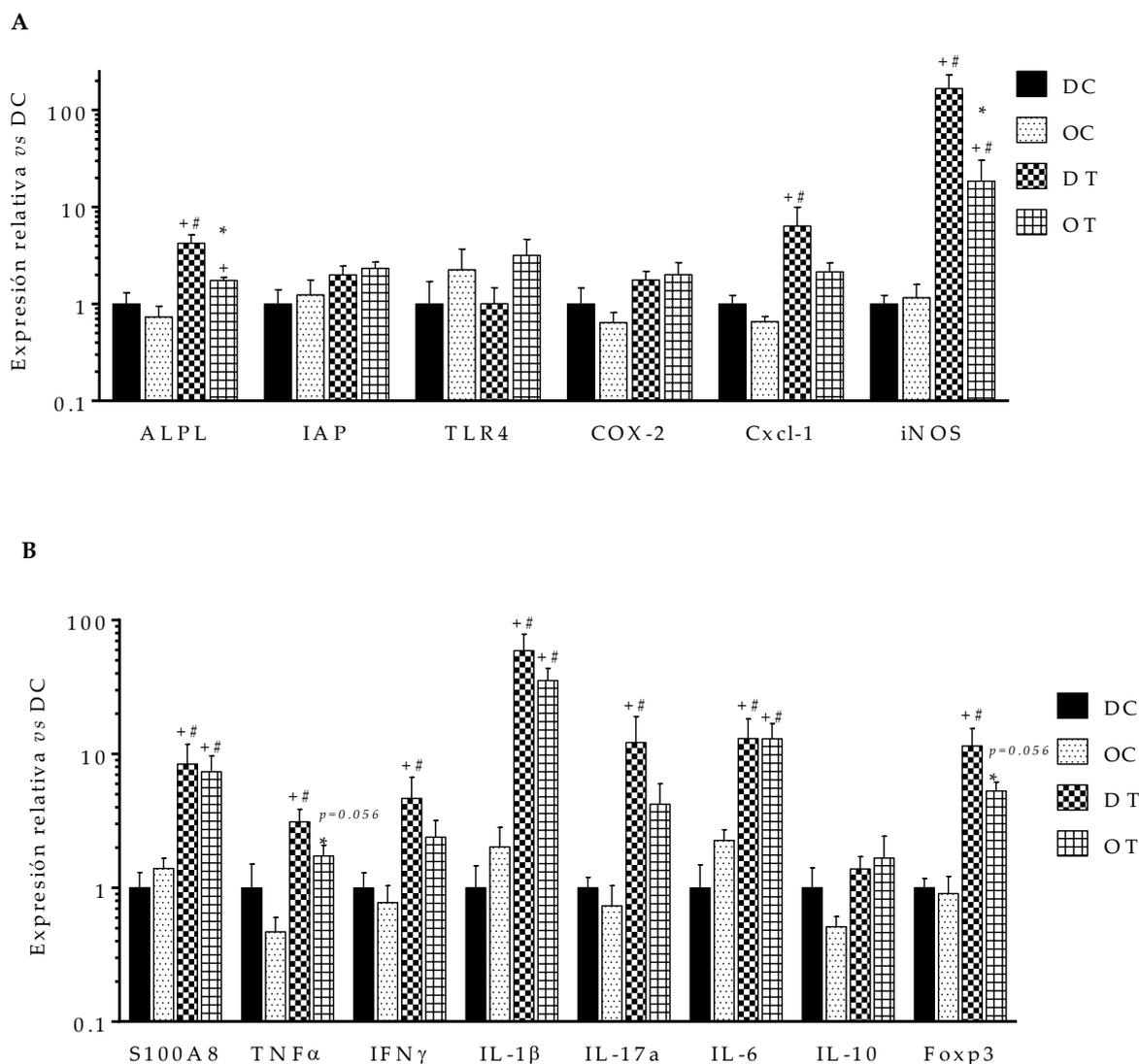


Figura 7. Perfil de expresión génica de mediadores inflamatorios en colon analizados por qRT-PCR, empleando 18s como gen de referencia y haciendo relativa la expresión respecto a DC. El eje Y representa el logaritmo decimal de dicho cambio relativo, con objeto de incluir todos estos genes en la misma figura. No se empleó el valor logarítmico para el tratamiento estadístico de los datos. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT, salvo valor indicado.

Asimismo, los animales inflamados exhibieron un incremento en la producción de péptidos antimicrobianos, producidos por las células de Paneth y, en menor grado, por el enterocito, participando activamente en la contención y la regulación cuali-cuantitativa de la microbiota intestinal. Como era de esperar, la colitis indujo sustancialmente la expresión de las lisozimas (Lyz)-2, Lyz1-1 y Reg3 γ , aunque el cambio acaecido en cada uno de estos genes difiere entre sí, las lisozimas comparten la tendencia a expresarse menos en la rata Zucker *falfa*. Lyz-2 aumenta significativamente por igual en DT y OT, Lyz1-1 lo hace exclusivamente

en DT y, por último, Reg3 γ se encuentra incrementado por la inflamación en el grupo OT e inalterado en DT respecto a sus controles respectivos (figura 8).

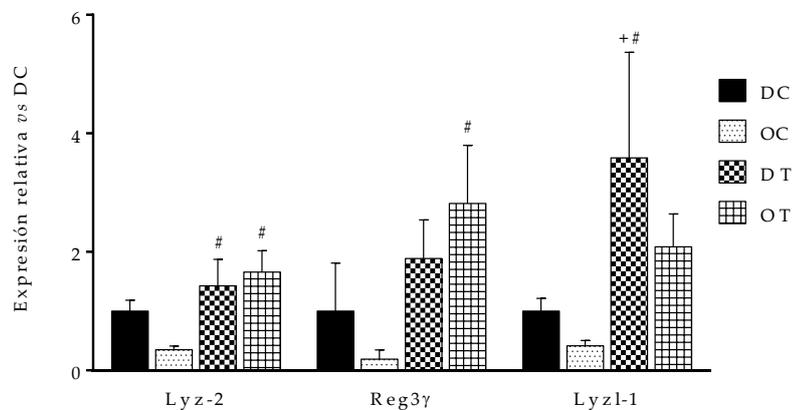


Figura 8. Expresión colónica de péptidos antimicrobianos determinada por qRT-PCR, empleando 18s como gen constitutivo de referencia y haciendo relativa la expresión respecto a DC. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs DC; # $P < 0.05$ vs OC; * $P < 0.05$ vs DT.

La capacidad de restitución epitelial es decisiva en la evolución de los modelos de colitis inducidos químicamente, al afectar al restablecimiento de la función de barrera. En el análisis de la expresión de genes implicados en crecimiento, proliferación y protección de la mucosa, observamos como la expresión de ciclina D1 y PCNA aumentó con la inflamación en el fenotipo obeso, aunque en el segundo caso sin alcanzar la significancia estadística. El TGF β , apareció sustancialmente reducido por la obesidad en condiciones basales e inflamatorias, sin mostrar modulación alguna por la colitis en sí misma. Por su parte, PDGFR β mostró una tendencia relativa similar a la de TGF β en lo relativo a la obesidad como variable, pero apareciendo un franco aumento de su expresión asociado al modelo inflamatorio, al menos en el grupo delgado. El TFF3 no mostró cambio en relación a ninguna de las variables estudiadas (figura 9A). De igual modo, la fosforilación y consecuente activación del factor de transcripción STAT3 fue comparable entre los grupos colíticos, cuya relación pSTAT3/STAT3 fue superior en comparación con el grupo control (figura 9B).

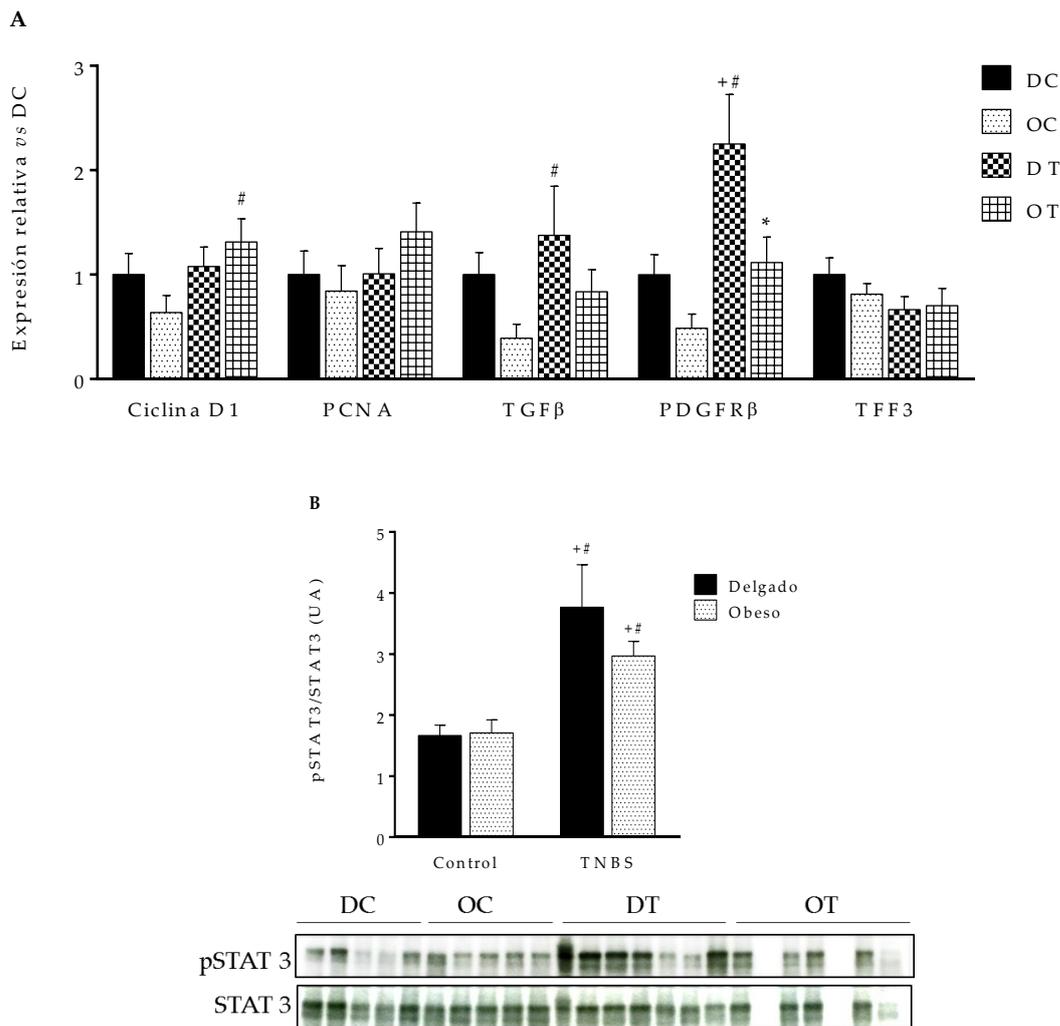


Figura 9. Evaluación del estado proliferativo del epitelio intestinal. A. Expresión de ciclina D1, PCNA, TGFβ, PDGFRβ y TFF3 en colon. B. Determinación de la síntesis y activación de STAT3 por western blot en colon. Los datos se expresan como media ± SEM. + P<0.05 vs DC; # P<0.05 vs OC; * P<0.05 vs DT.

El tejido adiposo en general, y en particular el mesentérico (TAM) en el contexto intestinal, posee funciones endocrinas e inmunomoduladoras importantes, derivadas tanto de los péptidos y otros mediadores producidos y secretados por el propio adipocito y las células del SI infiltradas en el mismo. En este sentido, analizamos la expresión de ciertas adipoquinas y otros mediadores implicados en el proceso inflamatorio en el TAM. Los resultados mostraron una mayor expresión de iNOS en los animales obesos. Asimismo, observamos un aumento significativo de TNFα exclusivamente en el grupo DT así como de IL-1β, aunque en el caso de esta última aparece un destacable incremento asociado a la condición colítica. No se observaron diferencias en TLR4 y ALPL (figura 10A). La

leptina se indujo por la obesidad y mostró la tendencia opuesta por la colitis; la expresión de resistina resultó estar inhibida por obesidad y por la colitis en el grupo DT, mientras que la adiponectina únicamente vio disminuida su expresión en los animales inflamados. La grelina fue quien sufrió el cambio más drástico, siendo vagamente amplificada en los grupos OC, DT y OT (figura 10B).

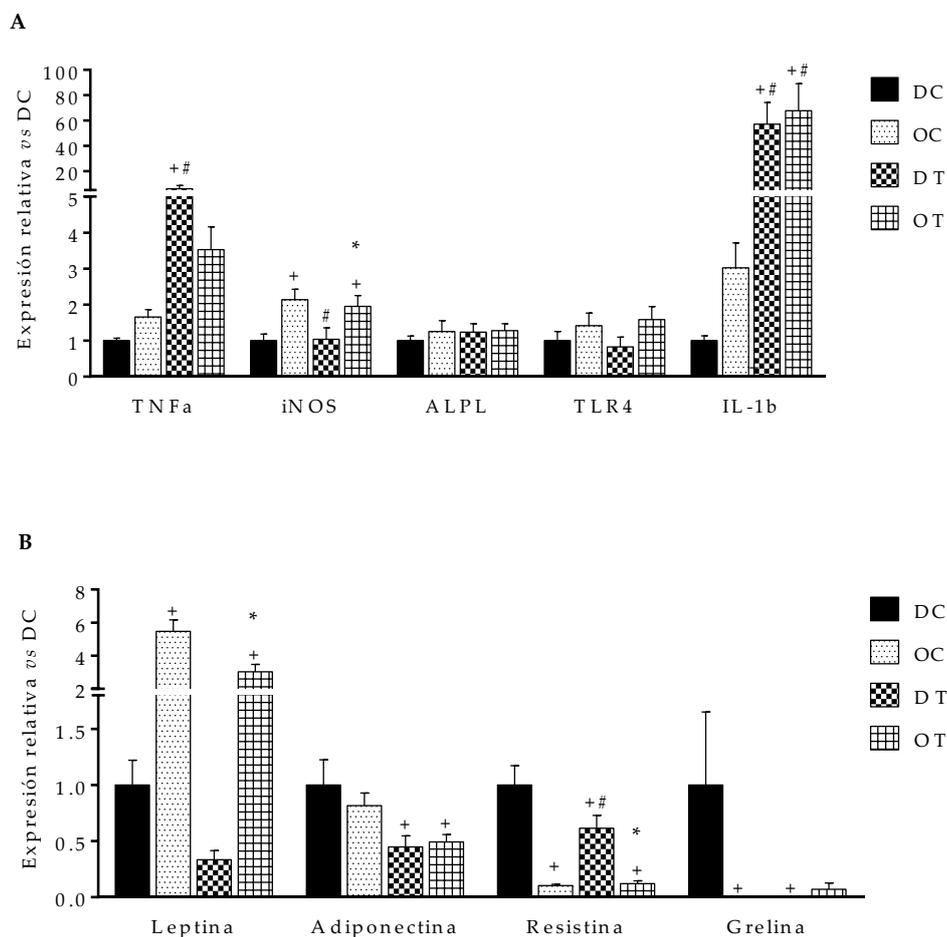


Figura 10. Determinación de marcadores inflamatorios en tejido adiposo mesentérico por qRT-PCR. A. Expresión relativa de TNF α , iNOS, ALPL, TLR4 e IL-1 β . B. Expresión relativa de leptina, adiponectina, resistina y grelina. Los datos se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs DC; # P<0.05 vs OC; * P<0.05 vs DT.

Por último, evaluamos el estado metabólico general de los animales. Como era de esperar, la rata Zucker obesa, ampliamente definida en este contexto, duplicaba las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, ácidos grasos libres o colesterol total, presentando no obstante niveles normoglucémicos. Sorprendentemente, el desarrollo del modelo experimental de colitis por TNBS normalizó esta situación, alcanzando los valores de referencia del grupo DC. Este fenómeno se observó únicamente en este grupo experimental (figura 11A).

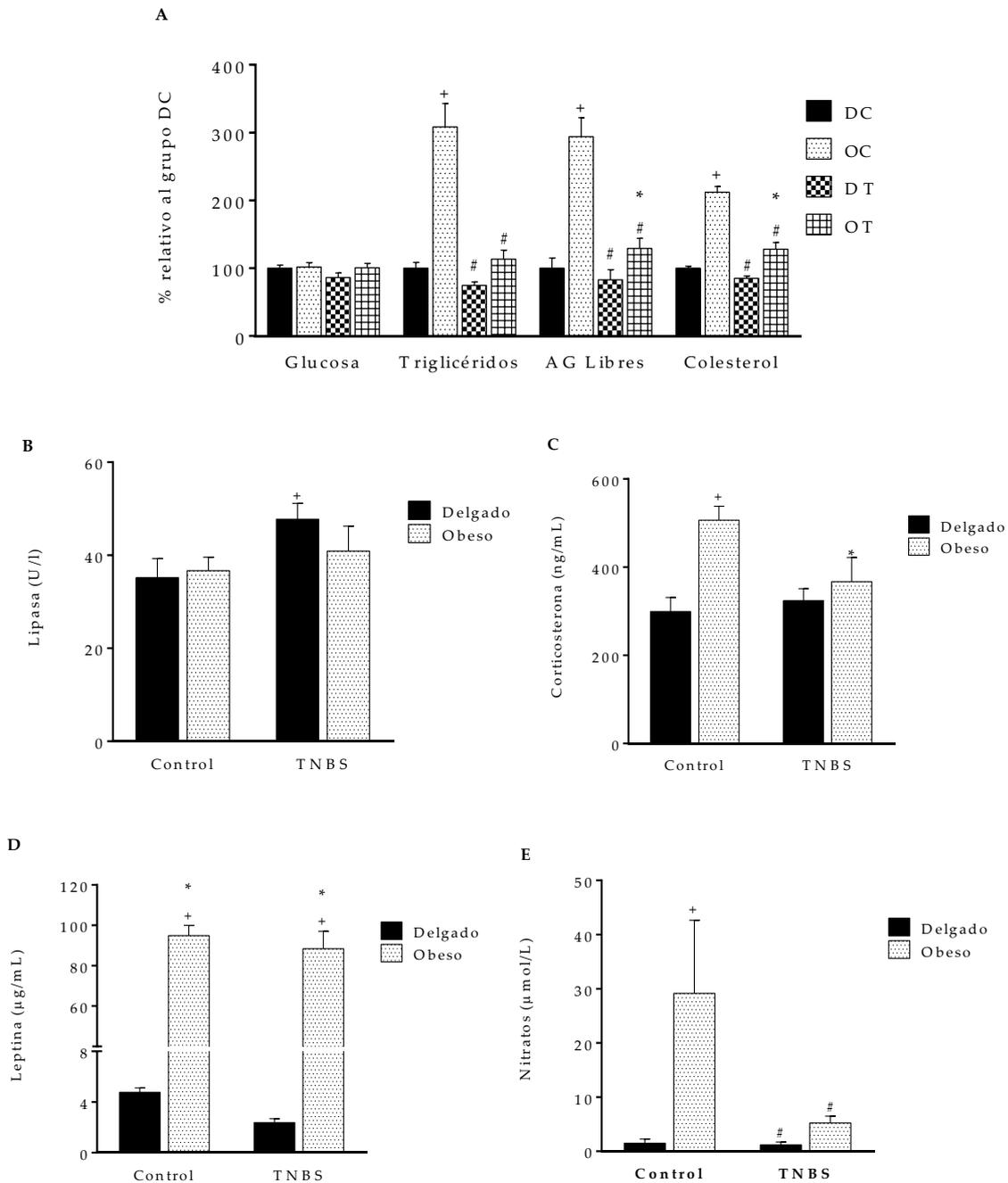


Figura 11. Análisis plasmático del estado metabólico. A. Valores de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol, expresados como porcentaje de cambio con respecto al grupo DC. El valor medio absoluto y la SEM del grupo DC para cada uno de estos parámetros fue, respectivamente: 159.4 ± 7.2 mg/dl; 130.2 ± 11.0 mg/dl; 0.35 ± 0.05 mM; 80.5 ± 2.4 mg/dl. B. Actividad lipasa (U/l). C. Corticosterona (ng/ml). D. Leptinemia (μ g/ml). E. Nitratos en plasma (μ M).

La actividad lipasa resultó incrementada en el grupo DT, mientras que los animales obesos no exhibieron cambio aparente (figura 11B). La concentración plasmática de corticosterona fue significativamente mayor en OC y experimentó una bajada sustancial por el TNBS (figura 11C). La leptina presentó valores

plasmáticos muy superiores en ambos grupos obesos en comparación con DC. La colitis en animales delgados redujo la leptinemia alrededor de un 50 %, aunque sin alcanzar la significancia estadística (figura 11D). Por último, observamos como la concentración plasmática de nitratos resultó mucho mayor en el grupo OC respecto a su control, retornando a la normalidad curiosamente ante la influencia del modelo inflamatorio (grupo OT). Los animales delgados no experimentaron cambios en dicho parámetro a causa de la colitis (figura 11E).

2. Estudio del efecto de la administración de leptina en el modelo de colitis aguda en ratones C57BL6/J por DSS.

A la luz de los resultados obtenidos en el primer experimento, no puede afirmarse que la obesidad *per se* haya empeorado el curso de la EII en la rata Zucker, al menos en lo que a inflamación se refiere. Teniendo en cuenta la naturaleza genética del modelo experimental empleado, la siguiente cuestión a resolver sería si la leptina ha sido la responsable del fenómeno y en qué grado. Por tanto, decidimos evaluar las acciones de esta hormona en un organismo sano, en el cual la señalización de leptina no esté alterada, bajo condiciones fisiológicas y de inflamación intestinal.

Para ello, generamos un estado hiperleptinémico mediante la administración de leptina exógena en ratones C57BL6/J y, tras un tiempo prudencial, inducir colitis aguda por DSS. Brevemente, administramos leptina subcutánea monopegilada (0.5 mg/ratón/día), cuya semivida de eliminación es de aproximadamente 20 horas. El modelo de colitis aguda por DSS fue descrito por primera vez por Okayasu en 1990 [609]. La administración de DSS en agua de bebida induce una colitis que se caracteriza esencialmente por la aparición de una diarrea sanguinolenta, ulceraciones y una potente infiltración leucocitaria. El DSS resulta tóxico para las células epiteliales intestinales en general por afectación de la estabilidad de la membrana celular, lo cual tiene consecuencias especialmente significativas cuando se ven afectadas las células madre en la base de las criptas. Esto afecta a la reposición celular normal en este epitelio, lo que compromete de forma importante la función de barrera epitelial, dando lugar al acceso de antígenos de la microbiota a capas subyacentes de la mucosa intestinal, donde van a ser detectados por células inmunitarias de carácter innato. Estas células van a iniciar una respuesta inmunológica protectora que tratará de contener a las bacterias en la luz intestinal, produciendo además quimioquinas que provocarán

el reclutamiento de granulocitos (principalmente neutrófilos), y a su vez la iniciación de una respuesta inmunitaria adaptativa que será más tardía (desde el día 4-5 en adelante) y que será conducida por células T CD4 polarizadas mayoritariamente a los subtipos Th1 y Th17. Este modelo es especialmente útil para estudiar la contribución del sistema inmunitario innato en la inflamación intestinal, dado que se desarrolla con normalidad en ausencia de inmunidad adaptativa en ratones RAG1 KO [610]. Actualmente es probablemente el modelo más utilizado para el estudio de mecanismos patogénicos y para el ensayo de terapias experimentales, posiblemente por su simplicidad y apreciable reproducibilidad. Existe una variante de carácter crónico, consistente en la alternancia de varios ciclos de exposición a DSS y de descanso, así como una tercera opción en la que la exposición es continuada pero utilizando dosis relativamente bajas, que no producen una respuesta aguda marcada. Asimismo, mediante la combinación de DSS y el carcinógeno azoximetano se dispone de un modelo de carcinogénesis intestinal asociada a inflamación [611].

Para incluir ambas variables, leptina e inflamación, se establecieron cuatro grupos experimentales: control, leptina, DSS y DSS-leptina. Como ya se ha descrito en el apartado de material y métodos, los animales sanos y colíticos fueron pareados en la alimentación, y la colitis se indujo tras 7 días de pretratamiento con leptina.

En la primera etapa del experimento, previo a la inducción de colitis por DSS y conocidos los efectos de la leptina en el control de la ingesta y el gasto calórico, los animales exhibieron inicialmente una pérdida de peso que comenzó a estabilizarse a partir del 4 día de administración. El grupo control reprodujo el mismo perfil con un día de desfase, gracias al pareamiento en la ingesta de pienso. No obstante, y pese al pareamiento, el grupo leptina se mantuvo ligeramente por debajo del control debido al aumento del metabolismo basal que genera la hormona, aunque tal diferencia no fue estadísticamente significativo (figura 12A). Transcurridos siete días, y habiendo recuperado la ingesta media/ratón/día, se inició la administración de DSS en el agua de bebida. Los grupos control y leptina, siguieron una evolución paralela y uniforme hasta el final del DSS. Sin embargo, el grupo DSS-leptina fue quien experimentó mayor pérdida de peso desde el día 2. El grupo DSS presentó pérdidas significativas de peso corporal desde el día 5 en adelante, reproduciéndose la evolución que solemos obtener en nuestro laboratorio (figura 12B).

Al margen del peso, se evaluó el estado de las heces, atendiendo a consistencia y presencia de sangre, tanto oculta como visible. Teniendo en cuenta que nuevamente el peso está sesgado por el protocolo experimental, en la medida en que la ingesta está controlada y el tratamiento aumenta el gasto calórico, hay que dar especial importancia al estado de las heces en el desarrollo de la colitis experimental. Si representamos este parámetro, pueden observarse diferencias significativas entre colíticos y no colíticos desde el día 2. Además, los grupos con DSS siguieron distinta evolución que, paradójicamente, fue opuesta a la del peso corporal. Así, el DSS-leptina exhibió heces menos diarreicas y con menor contenido en sangre, alcanzando significancia los días 4, 5 y 6 (figura 12C). Para confirmar este hallazgo, determinamos cuantitativamente la sangre oculta en heces, tomando como muestra el contenido fecal colónico el día del sacrificio. Como era de esperar, este parámetro fue notablemente mayor en el grupo DSS que en el DSS-leptina, aunque no alcanzó significancia estadística. (P=0.069). (Figura 12D)

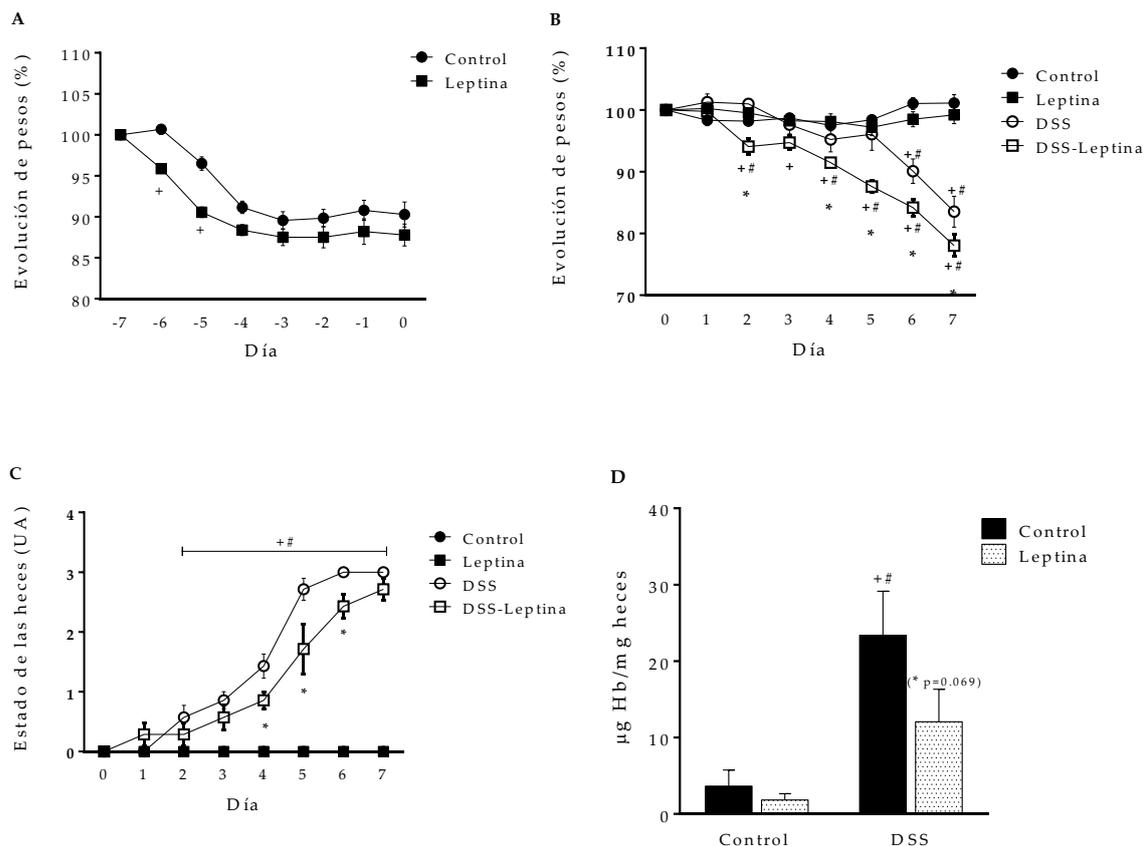


Figura 12. Evolución de pesos y estado de las heces en la colitis inducida por DSS. A. Porcentaje de la variación de pesos en el pretratamiento con leptina, previo al DSS. B. Porcentaje de la variación de pesos durante el DSS. C. Estado de las heces, en relación a consistencia y presencia de sangre. D. Sangre oculta en heces (µg hemoglobina (Hb)/mg

heces). Los datos se expresan con media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

El análisis hematológico de los ratones reveló que la colitis por DSS produjo en el grupo colítico control una bajada significativa en hematocrito (HTC), concentración de hemoglobina (Hb) y eritrocitos circulantes (RBC), de forma coherente con el espectacular sangrado rectal inherente al modelo. La administración de leptina en el contexto colítico, normalizó de manera espectacular los tres parámetros anteriormente citados. Esto último, confirma nuevamente la mejoría de la integridad epitelial que genera la leptina en la colitis experimental por DSS. Asimismo, la presencia de basófilos y neutrófilos se vio incrementada por la colitis, mientras que la leptina normalizó sus valores mientras que ambos grupos colíticos presentaron niveles superiores de plaquetas, en comparación con sus controles respectivos (figura 13).

Figura 13. Análisis hematológico, resultados expresados en relación al grupo control. El valor medio y SEM para el grupo control fueron: hematocrito (HTC) $39.70 \% \pm 1.15$; hemoglobina (Hb) $13.80 \text{ g/dl} \pm 0.11$; eritrocitos (RBC) $8.47 \cdot 10^6/\mu\text{l} \pm 0.23$; trombocrito (PCT) $0.28 \% \pm 0.03$; plaquetas (PLT) $485.29 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 55.22$; basófilos (BAS %) 0.20 ± 0.14 y neutrófilos (NEU%) 1.07 ± 0.36 . Basófilos y neutrófilos vienen dados como el número de células entre el total de polimorfonucleares. Los datos se expresan con media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

A nivel macroscópico, como puede observarse en la imagen 4, el acortamiento y grado de fibrosis del grupo DSS fue notoriamente superior al del grupo DSS-leptina, alcanzando una ratio peso/longitud un 20% mayor (figura 14).



Imagen 4. Alteraciones macroscópicas. Fotografías de colon tomadas tras el sacrificio de los animales.

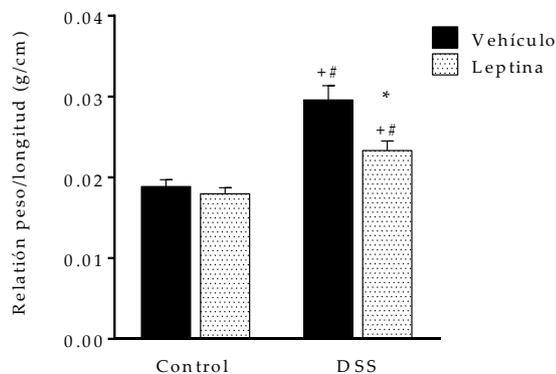


Figura 14. Relación peso/longitud del colon. Los datos se expresan con media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

	Control	Leptina	DSS	DSS-Leptina
Longitud de las criptas (0-2)	0.14 \pm 0.09	0 \pm 0	0.60 \pm 0.19	0.29 \pm 0.18
Infiltración leucocitaria (0-4)	0.14 \pm 0.09	0.33 \pm 0.22	2.65 \pm 0.32	1.79 \pm 0.49
Engrosamiento submucosa (0-2)	0 \pm 0	0 \pm 0	0.80 \pm 0.24	0.29 \pm 0.10
Erosión (0-2)	0 \pm 0	0.11 \pm 0.07	1.15 \pm 0.25	0.43 \pm 0.20
Pérdida estructura criptas (0-2)	01 \pm 0	0 \pm 0	1.50 \pm 0.21	0.86 \pm 0.34
Valoración H&E (UA)	0.29 \pm 0.10	0.44 \pm 0.28	6.70 \pm 0.88 ^{+#}	3.64 \pm 1.06 ^{+#*}

Tabla 3. Valoración de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina. Los datos se expresan con media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

El estudio histológico de secciones transversales de colon mediante tinción clásica de H&E apoya nuevamente las anteriores evidencias obtenidas, según las

RESULTADOS

cuales el tratamiento con leptina de algún modo había conferido protección ante la colitis por DSS (tabla 3, imagen 5).

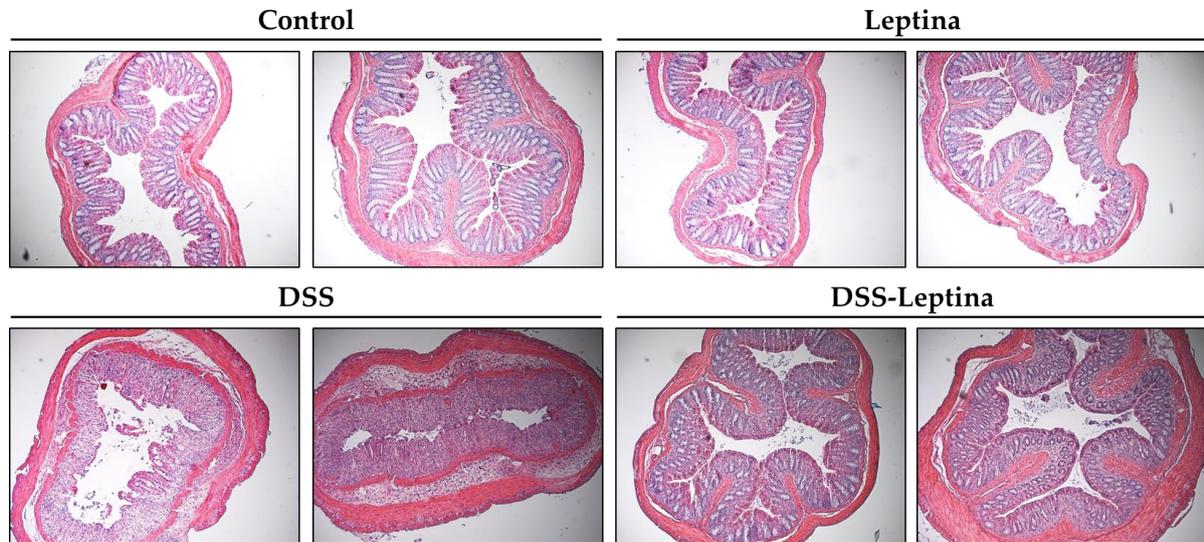
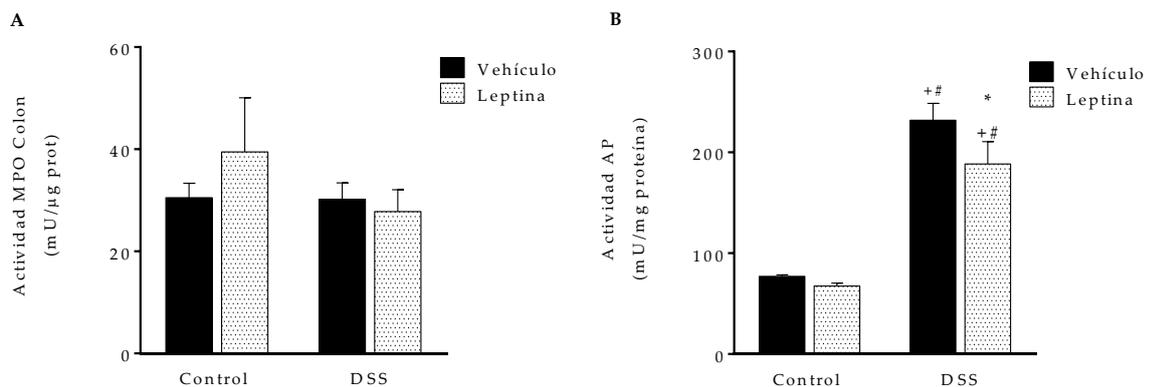


Imagen 5. Estudio histológico del colon. Imágenes (10x) de secciones transversales de tejido colónico sometidas a tinción con hematoxilina y eosina representativas de los diferentes grupos experimentales.

Paradójicamente, la actividad MPO en colon total no se incrementó por la colitis (figura 15A). No obstante, la colitis por DSS potenció la actividad AP colónica, siendo este fenómeno inferior ante la concurrencia de la leptina. No se observaron diferencias en la sensibilidad al levamisol con respecto a los grupos control y leptina, tanto en ausencia como presencia de inflamación (figura 15B y C).



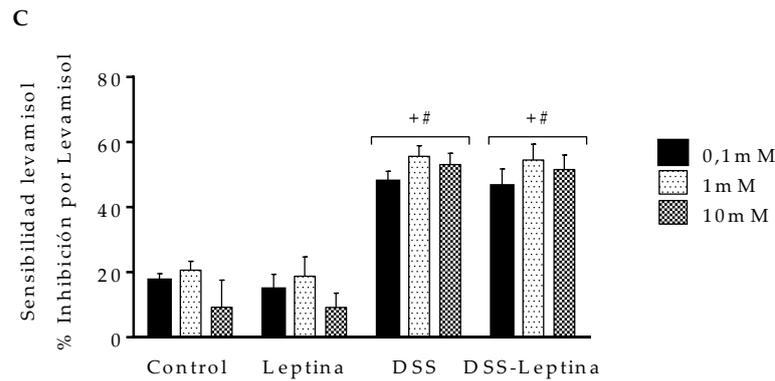
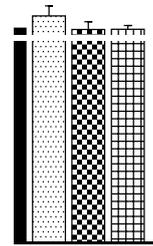


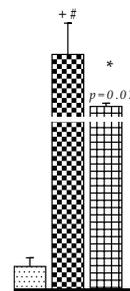
Figura 15. Determinación de actividad MPO y AP en homogenado de colon en la colitis inducida por DSS. A. Actividad MPO (mU/ μ g de proteína). B. Actividad colónica AP (mU/mg proteína). C. Sensibilidad a levamisol, expresado como porcentaje de inhibición de actividad AP. Los datos se expresan con media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Mediante el cultivo de fragmentos de tejido colónico *ex vivo* y la posterior determinación de citoquinas en el medio de cultivo, así como mediante el análisis por qRT-PCR de la expresión génica en otro segmento de este mismo órgano, se evaluó el efecto de la leptina sobre diferentes citoquinas y quimioquinas clásicamente incrementadas en la colitis inducida por DSS. En este sentido, se analizaron aquellas para las que existen evidencias experimentales consistentes que les atribuyen un papel beneficioso sobre la restitución epitelial y la función de barrera a nivel intestinal, lo que a su vez determina un impacto positivo en la evolución de la colitis aguda inducida por DSS. En primer lugar, cabe destacar que la leptina administrada a animales sanos mostró una clara tendencia a incrementar la secreción de IL-13, IL-4, GM-CSF, G-CSF, IL-10, IL-17A, TNF α y ligeramente la de IL-1 β , siendo además el único grupo que mostró un aumento significativo en la secreción de VEGF-A. El DSS potenció la secreción de GM-CSF, G-CSF, IL-10, IL-17A, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-22 y ligeramente IL-12p70, mientras que no modificó, o al menos significativamente, la secreción de IL-13, IL-4, VEGF-A, IL-27 e IL-6. El grupo DSS-leptina exhibió un perfil similar al grupo DSS, salvo para IL12p70, que no experimentó cambio alguno, para IL17A, cuyo incremento fue ligeramente menor ($P=0.07$), y para IL-6, cuya producción fue superior a la del DSS. No obstante, hay que señalar que el grupo DSS-leptina exhibió secreciones intermedias de TNF α , IFN γ e IL-1 β entre controles y DSS, que aún sin ser estadísticamente diferente al colítico, tampoco lo fue con los controles, lo cual invita a pensar que la respuesta inflamatoria fue menos exacerbada en dicho grupo experimental (figura 16).

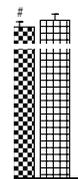
leptina



IL -27



IL -17A



IL -A

Figura 16. Producción de mediadores de la respuesta inflamatoria en explantes de colon obtenidos de ratones sanos y sometidos a colitis aguda inducida por DSS, tratados o no con leptina. **A.** IL12p70, IL-13, IL-4, IL-27. **B.** GM-CSF, G-CFS, IL-10, IL-17A. **C.** TNF α , IFN γ , IL-1 β y VEGF-A. **D.** IL-6 e IL-22. Los datos están expresados en pg de analito/ μ g de proteína del explante, y en forma de media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

Este estudio fue completado por qRT-PCR, donde obtuvimos resultados plenamente coherentes con los anteriores. A nivel genómico, no se observaron diferencias en la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria en los grupos no colíticos. No obstante, tal y como era de esperar, el DSS indujo significativamente la expresión de IFN γ , S100A8, IL-1 β , IL-27, SOCS3, IL-6 e IL-22, aunque curiosamente no detectamos modificación significativa en la de TNF α e IL-17A. Por su parte, el grupo DSS-leptina sí que exhibió aumentos significativos en la expresión de TNF α e IL-17A, además de presentar incrementos menores que el grupo DSS en IFN γ , S100A8, IL-1 β e IL-27. SOCS3 e IL-22 no sufrieron ninguna modulación por la leptina en el contexto colítico (figura 17).

Figura 17. Expresión génica de marcadores inflamatorios en tejido colónico de ratones sanos y sometidos a colitis aguda inducida por DSS, tratados o no con leptina. Los resultados se expresan como incremento relativo al grupo control, utilizando HPRT como gen de referencia, y vienen dados como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

Con objeto de evaluar el estado de otros componentes que conforman la barrera epitelial, analizamos por qRT-PCR la expresión de péptidos antimicrobianos y de proteínas involucradas en las uniones intercelulares (uniones estrechas). Cabe mencionar que en esta ocasión no hallamos indicio alguno de translocación bacteriana, dado que no obtuvimos colonias en homogenados hepáticos y de MLN en diversos medios de cultivo de bacterias (agar LB, agar MacConkey y agar Brucella en cámara de anaerobiosis) y la medida de LPS plasmática y hepática estuvo bajo el límite de detección (datos no mostrados). No obstante, como consecuencia de la colitis, a nivel genómico pudimos ver un aumento notorio de la expresión de Reg3 γ , menos pronunciado en el grupo DSS-leptina, y en Lyz-2, donde el incremento fue equiparable en ambos grupos expuestos a DSS (figura 18A). La leptina administrada a ratones sanos indujo en el colon la expresión de proteínas como ZO-1 o claudina 4 ($P=0.06$), aunque no modificó la expresión de claudina 5 o haptoglobina, la cual sufrió un drástico incremento en los grupos colíticos, alcanzando significancia únicamente en el DSS no tratado. El grupo DSS-leptina obtuvo aumentos significativos en la expresión de claudinas 4 y 5, no así el grupo colítico control, lo cual induce a pensar que la leptina ejerció una modulación biológicamente significativa de la permeabilidad paracelular ante la agresión del DSS (figura 18B). En íleon, el DSS propició una reducción en la expresión de claudina 4 y un aumento de claudina 5, mientras que ZO-1 vio inducida su expresión en el grupo DSS-leptina (figura 19).

La capacidad de restitución de la barrera epitelial es un factor determinante en la evolución y resolución de la colitis aguda inducida por DSS, por lo que asimismo se decidió analizar la expresión de factores de crecimiento y proliferativos en el tejido colónico. Los resultados obtenidos mostraron que el grupo sano tratado con leptina presentaba un aumento significativo de la expresión de PCNA, Myc y VEGF-A, exhibiendo además tendencia al incremento de ciclina D1 y FGF7. Sin embargo, en relación a los grupos colíticos, únicamente FGF7, y en menor grado la ciclina D1, vio potenciada su expresión por la llegada del DSS al tracto colónico, mientras que no ocurrió lo propio en el caso de PCNA, Jun, Myc o VEGF-A (figura 18C).

Figura 18. Expresión génica de componentes relevantes en el mantenimiento de la barrera intestinal y de proliferación epitelial en colon. A. Expresión de los péptidos antimicrobianos Reg3 γ y Lyz-2. B. Expresión de ZO-1, claudinas 4 y 5 y haptoglobina. C. Expresión de PCNA, ciclina D1, FGF7, Jun, Myc y VEGF-A. Los resultados se expresan como incremento relativo al grupo control, utilizando HPRT como gen de referencia, y vienen dados como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

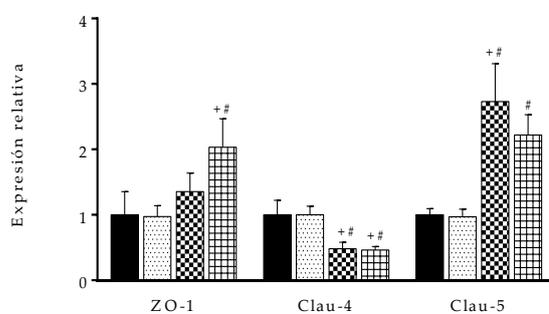


Figura 19. Expresión de ZO-1 y claudinas 4 y 5 en íleon determinada por qRT-PCR. Los resultados se expresan como incremento relativo al grupo control, utilizando HPRT como gen de referencia, y vienen dados como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

Estos resultados, junto a los relativos a las uniones estrechas intercelulares, muestran diferencias lo suficientemente consistentes entre los grupos controles y colíticos que nos permiten pensar que la leptina podría haber conferido cierta protección a la colitis inducida por DSS, en el sentido de que la capacidad proliferativa de la mucosa estaría potenciada y con ello podría estar favoreciendo el proceso de curación frente al daño generado por el DSS. Por ello, decidimos comprobar si a nivel proteico encontrábamos diferencias en la síntesis o activación de determinados factores relacionados con la regeneración del epitelio, pero que es importante recordar, siempre aparecen marcadamente incrementados en la colitis aguda inducida por DSS. STAT3 y su forma activa, la fosforilada (pSTAT3), resulta especialmente interesante dado que además de inducir la proliferación celular, interviene en la generación de péptidos antimicrobianos y mucinas. Por si esto fuera poco, es un factor clave en la cascada de señalización de la leptina, siendo lógicamente activado por la misma. Los resultados obtenidos fueron contundentes: el grupo leptina presentó diferencias significativas mostrando una mayor activación de STAT3, determinada por el cociente entre proteína fosforilada y proteína total, con respecto al grupo control; la administración de DSS incrementó notablemente la activación de STAT3, aunque esta respuesta fue significativamente menor en el grupo colítico tratado con leptina (figura 20).

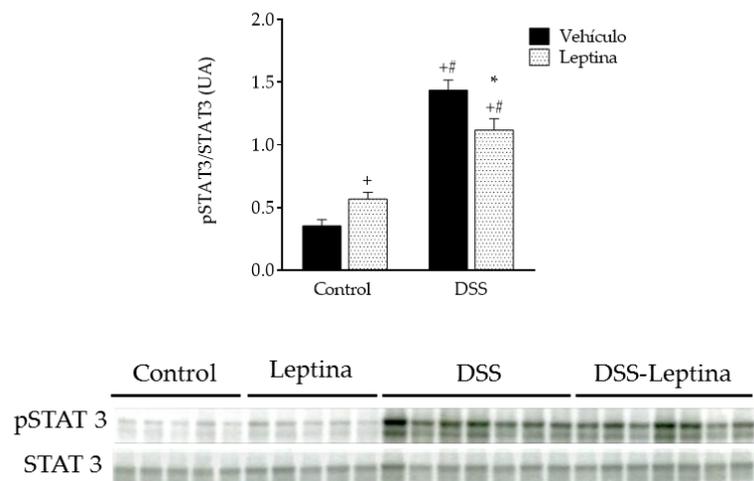


Figura 20. Determinación de la síntesis y activación de STAT3 en colon por western blot. Los datos se expresan como la ratio del área cuantificada de la proteína fosforilada entre la proteína total (pSTAT3/STAT3), y como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Asimismo, analizamos a nivel proteico la síntesis de PCNA, y nuevamente obtuvimos un perfil análogo al observado a nivel genómico por qRT-PCR, apareciendo diferencias notorias en los grupos que recibieron leptina en comparación con los no tratados, control y DSS (figura 21).

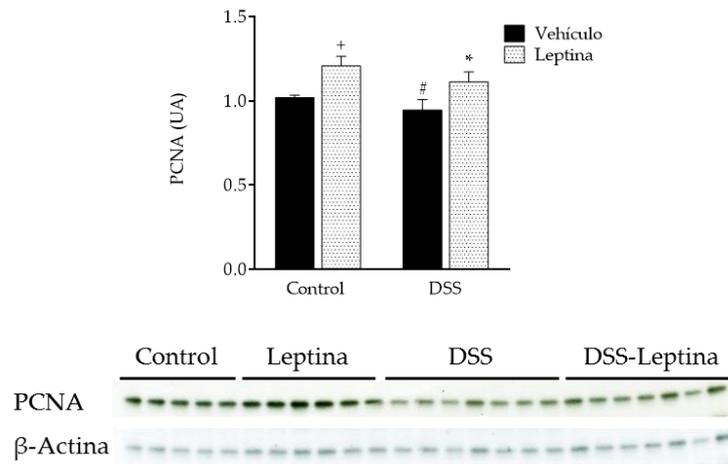


Figura 21. Determinación de la síntesis proteica de PCNA en colon por western blot. Los datos se expresan en relación a β -actina como control de carga proteico, y como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Para concluir, evaluamos el grado de apoptosis en el tejido colónico analizando la síntesis de las proteínas *bcl2-associated x protein* (BAX) y *B cell lymphoma 2* (Bcl-2), las cuales conforman un mecanismo regulativo de la apoptosis, en tanto de BAX presenta un efecto favorecedor de ésta, mientras que Bcl-2 la previene, de manera que la expresión relativa de ambas ejerce un estrecho control sobre la apoptosis. Comprobamos que la relación entre BAX/Bcl-2 estaba incrementada en el grupo DSS, indicando como era de esperar una mayor apoptosis en el colon de estos animales, fenómeno que no fue observado en el resto de grupos experimentales (figura 22).

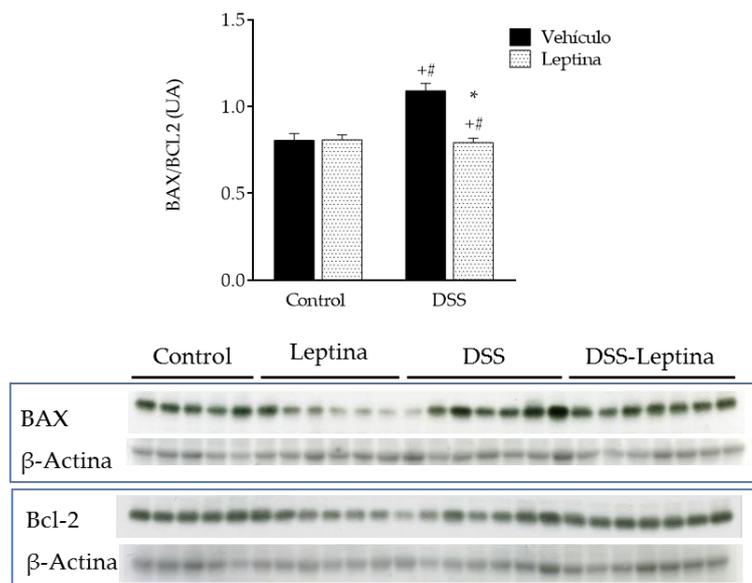


Figura 22. Síntesis de proteínas relacionadas con la apoptosis en el tejido colónico determinada por western blot. Cada proteína fue analizada en una membrana diferente y su cuantificación se realizó en relación a su β -actina como control de carga proteico. Los datos se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Al igual que en la rata Zucker, estimamos oportuno analizar la integridad del glucocálix mediante tinción de cortes histológicos transversales con azul alcian y rojo nuclear. En esta ocasión, las diferencias fueron visualmente evidentes, en tanto que la coloración de mucinas (azul) en el grupo DSS fue muy escasa, mientras que en el grupo DSS-leptina la presencia se hizo manifiesta tanto en lumen como en criptas (figura 23A). En los animales no colíticos no se observaron diferencias dignas de reseñas. Por lo tanto, medimos la expresión de la mucina Muc3 por qRT-PCR, y efectivamente confirmamos la esperable reducción de su expresión en el grupo DSS, fenómeno revertido por la leptina en condiciones inflamatorias. En ausencia de inflamación, los animales tratados con leptina exhibieron cierta disminución en la expresión de Muc3 en tejido colónico (figura 23B).

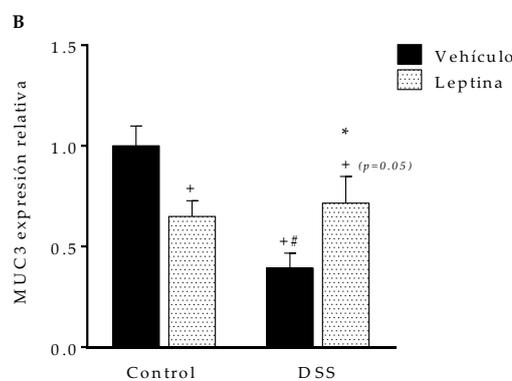
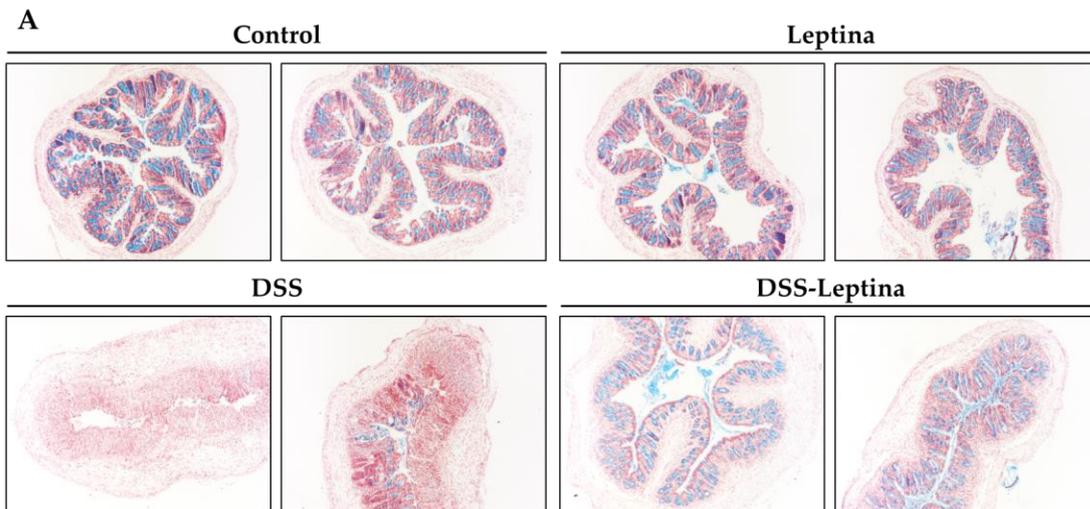


Figura 23. (ponlo como estñe en el TNBS) Integridad del glucocálix en el epitelio intestinal en el modelo de colitis inducida por DSS. A. Tinción con azul alcian de cortes histológicos transversales de colon. **B.** Expresión génica de MUC3 determinada por qRT-PCR, dada en forma relativa al grupo control. Los resultados se expresan como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Asimismo, decidimos evaluar la expresión del receptor de la leptina (LepR) por si de algún modo ésta estuviera modificada ón debido al aporte exógeno de su ligando. En colon y TAM la leptina fue capaz de incrementar su expresión solo ante inflamación concomitante. Por otro lado, en íleon la leptina aumentó la expresión de LepR al ser administrada a animales sanos, mientras que no moduló el incremento de la misma ejercido por la inflamación secundaria al DSS (figura 24).

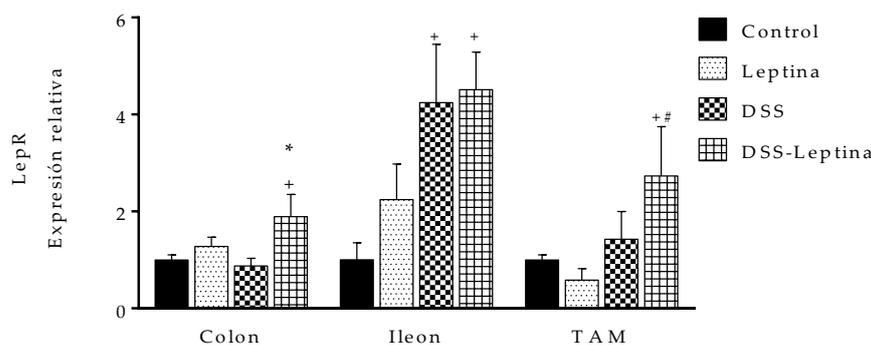


Figura 24. Grado de expresión del LepR en colon, íleon y TAM evaluado por qRT-PCR. Los datos se expresan en forma relativa al grupo control y como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Además del LepR, analizamos la expresión de adipocinas y otros marcadores de inflamación en el TAM. Los cambios observados en la expresión de citoquinas parecen deberse principalmente a la administración de leptina, exceptuando la expresión de la propia leptina y de apelina, las cuales exhibieron una drástica reducción tanto por la administración de leptina como por la colitis experimental. Adiponectina y resistina vieron fuertemente disminuida su expresión debido a la influencia de la leptina, alcanzando significancia estadística en el grupo DSS-leptina. Grelina y visfatina no mostraron cambios dignos de reseñar (figura 25).

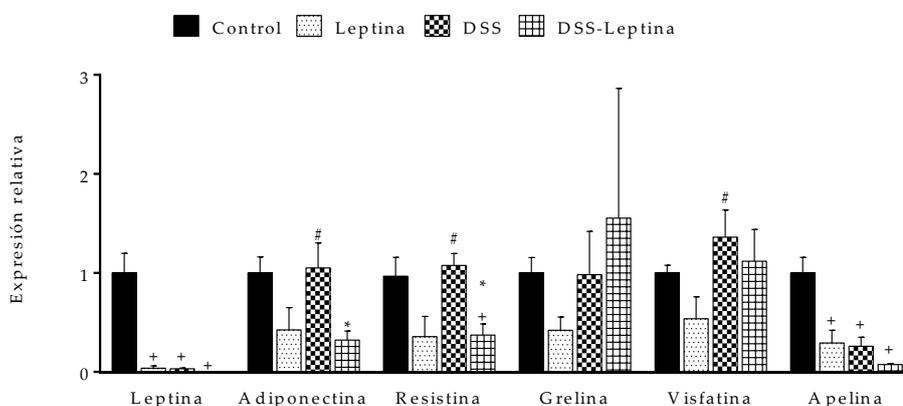


Figura 25. Perfil de adipocinas en el TAM. Expresión de leptina, adiponectina, resistina, grelina, visfatina y apelina determinadas por qRT-PCR. Los resultados se expresan en relación al grupo control y como media \pm SEM. + $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs leptina; * $P < 0.05$ vs DSS.

Asimismo, evaluamos la expresión de Ccl-2, TNF α , IL-10 e IL-17A, y de Ly6G (*lymphocyte antigen 6G*) y F4/80 como marcadores orientativos de la infiltración de neutrófilos y macrófagos, respectivamente, en el TAM. Únicamente hallamos diferencias significativas en la expresión de Ly6G, cuya expresión estaba fuertemente inducida en los animales colíticos, aunque en menor grado en DSS-leptina, quizá reflejo de la menor intensidad del proceso inflamatorio en este grupo experimental (figura 26).

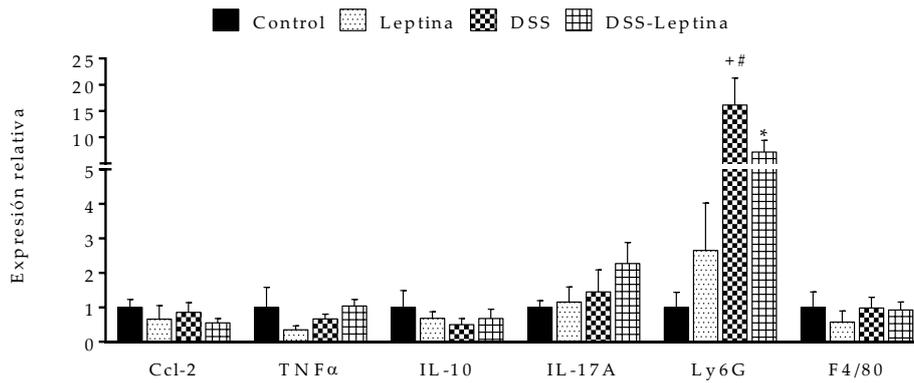


Figura 26. Marcadores inflamatorios en el TAM. Expresión de Ccl-2, TNF α , IL-10, IL17A, Ly6G Y F4/80 determinados por qRT-PCR. Los resultados se expresan en relación al grupo control y como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

El resultado más llamativo de los recién mostrados en el TAM es quizás la drástica inhibición en los niveles de expresión de leptina. Por ello, estimamos oportuno determinar la concentración plasmática de los grupos que no recibieron el tratamiento hormonal, dado que por razones técnicas no es posible discernir en el análisis entre leptina endógena y exógena (figura 27A). Efectivamente, la leptinemia había disminuido aproximadamente un 90% a causa de la colitis aguda por DSS, fenómeno ya observado, aunque en menor grado, en la rata Zucker. Dada la regulación ejercida por la leptina sobre el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, inhibiendo la liberación de la hormona liberadora de corticotropina o CRH en la hipófisis, quisimos comprobar si la hipoleptinemia del grupo DSS se habría podido traducir en un incremento en los niveles circulantes de corticosterona. En este sentido, no hallamos más que un ligero descenso, no significativo, en los grupos tratados con leptina, pero en ningún caso aparecieron diferencias vinculables con el proceso inflamatorio intestinal (figura 27B).

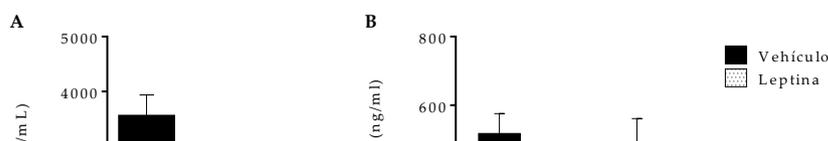


Figura 27. Determinación plasmática de leptina (A) y corticosterona (B) mediante ELISA. Los datos se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs control.

Dadas las propiedades inmunomoduladoras de la leptina, decidimos analizar sus acciones inmunológicas a nivel linfocitario. A nivel de MLN, se observó un descenso de ~40% en linfocitos T CD4⁺ sobre el total de células T CD3⁺, en el grupo DSS (figura 28A). A su vez, se determinó la producción de IFN γ sobre el gate de la población celular CD3⁺ CD4⁺, hallando un incremento superior al 50% en dicha proporción como consecuencia de la colitis (figura 29A). Ambos fenómenos, desarrollados ante la inflamación inducida por DSS, desaparecen en su totalidad ante la administración de leptina.

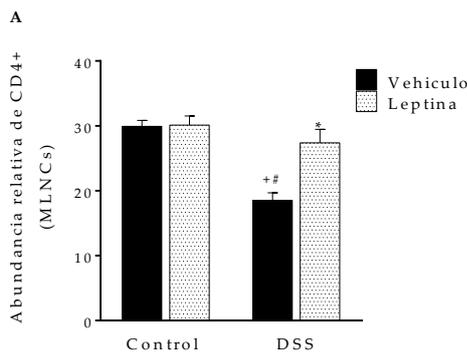


Figura 28. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T CD4⁺ en linfocitos totales obtenidos de los MLN. A. Porcentaje de células T CD3⁺CD4⁺ (gate linfocitario FSC-SSC). B. Gráficas de puntos representativas del resultado en A. Los resultados se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

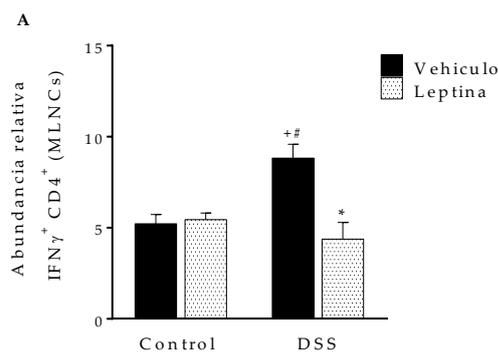
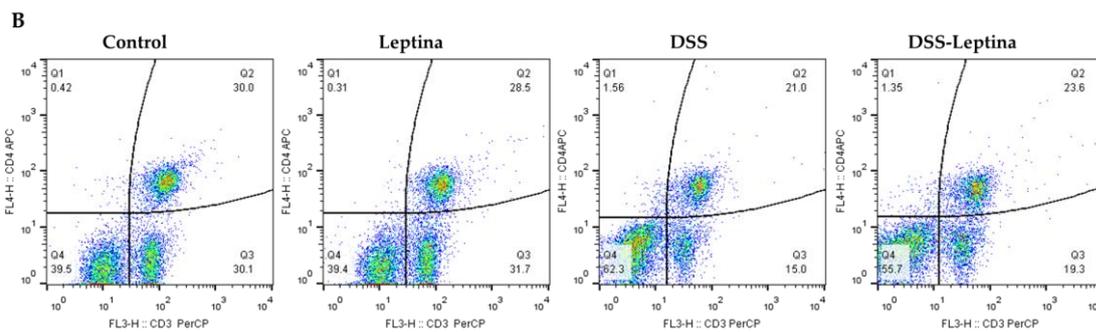
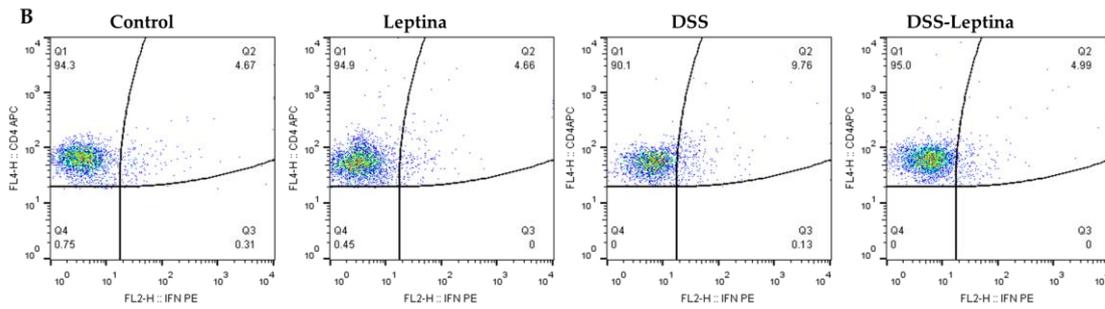


Figura 29. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T CD4⁺ productoras de IFN γ entre las células CD3⁺CD4⁺ de los MLN. A. Porcentaje de células T IFN γ ⁺CD4⁺ (gate CD3⁺CD4⁺) en MLN. B. Gráficas de puntos representativas del resultado en A. Los resultados se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.



En el bazo, los resultados obtenidos tras realizar este mismo análisis por citometría fueron similares, encontrando diferencias significativas en el grupo DSS, el cual nuevamente presentó un descenso relativo de las células T CD4⁺ dentro de la población linfocitaria (figura 30A). No obstante, no encontramos diferencias en la producción de IFN γ , lo que sugiere que las diferencias generadas por la leptina en el contexto colítico se circunscriben al entorno próximo a la zona mesentérica (figura 31A).

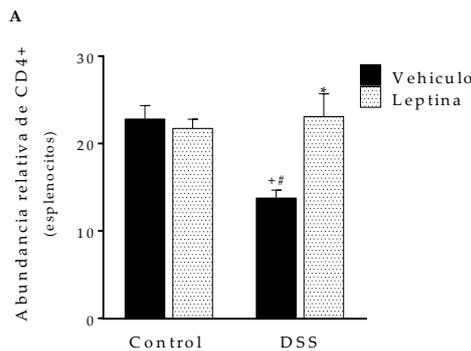
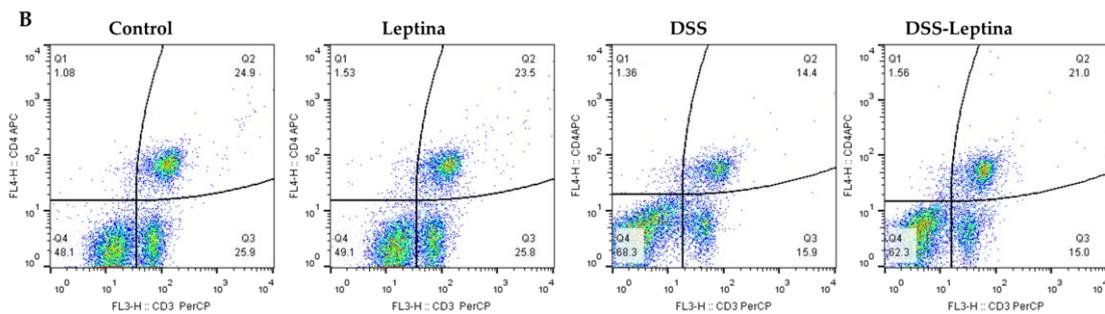


Figura 30. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T CD4⁺ en el bazo. **A.** Porcentaje de células T CD3⁺CD4⁺. **B.** Gráficas de puntos representativas del resultado en A. Los resultados se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.



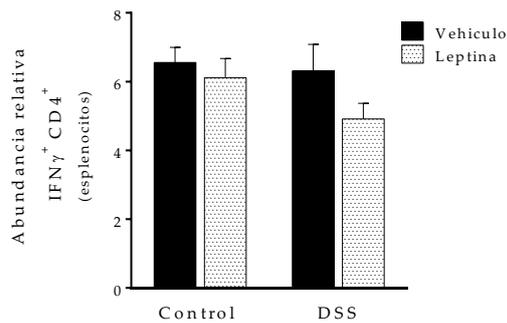


Figura 31. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa (%) de células T CD4⁺ productoras de IFN γ en el bazo. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

De forma paralela al estudio realizado mediante citometría de flujo, realizamos un cultivo primario de células obtenidas del bazo de estos roedores. Los esplenocitos fueron a su vez estimulados con concanavalina A (ConA), LPS o cultivados sin estímulo alguno, con objeto de comparar, respectivamente, la producción de citoquinas provenientes de linfocitos o macrófagos, con la producción basal. Posteriormente, se cuantificó en el medio de cultivo mediante ELISA, la concentración de citoquinas como TNF α , IFN γ , IL-17A e IL6. Salvo el caso del TNF α , el resto de citoquinas ensayadas en el medio de células no estimuladas quedaron bajo el límite de detección, por lo que las gráficas presentadas a continuación hacen mención a células sometidas a estímulo. De forma global, puede observarse que la mayor producción de TNF α procede principalmente de los esplenocitos estimulados con ConA, lo cual no es sorprendente dado que la población linfocitaria predomina cuantitativamente frente a macrófagos (figura 32A). No obstante, cabe destacar que al estimular las células con LPS, la producción de TNF α fue significativamente mayor en el grupo DSS en comparación con el resto, que no difirieron entre sí, mientras que la producción de IL-6 no se vio alterada (figura 32B). Resulta interesante que al realizar la estimulación linfocitaria con ConA, la producción de TNF α siguiera un perfil diferente al presentado por macrófagos, y, además, fuese significativamente menor en el grupo DSS-leptina. Sin embargo, en este mismo sobrenadante la producción de IL-17A fue mayor en el DSS-leptina, lo cual invita a pensar que la leptina habría favorecido la polarización de linfocitos hacia un fenotipo más de tipo Th17 que Th1 (figura 32C), como previamente ha sido descrito [612]. De hecho, la administración de leptina a animales sanos generó una activación linfocitaria de tipo Th17 tal, que ante estimulación con ConA, produjeron una cantidad de IL-17A comparable a la del grupo colítico no tratado. Paradójicamente, los niveles de IFN γ quedaron bajo el límite de detección en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con ConA de grupos colíticos, siendo

únicamente detectado en grupos control y leptina, sin presentar diferencias entre sí (figura 32D).

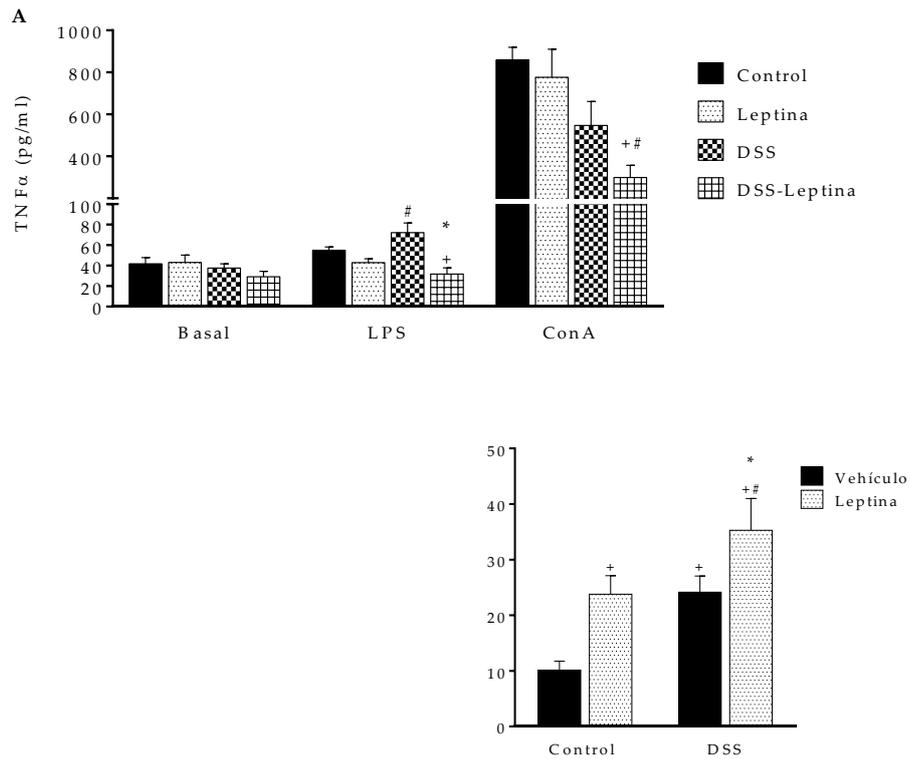


Figura 32. Producción de citoquinas en cultivo primario de esplenocitos procedentes de ratones sanos y colíticos, tratados o no con leptina, cuantificada mediante ELISA. A. Determinación de TNF α en el sobrenadante de células sin estímulos o medida basal, y estimuladas con LPS o ConA. B. Determinación de IL-6 en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con LPS. C y D. Determinación de IL-17A e IFN γ , respectivamente, en el sobrenadante de células estimuladas con ConA. Las concentraciones vienen dadas en pg/ml y los resultados se expresan como media \pm SEM. + P<0.05 vs control; # P<0.05 vs leptina; *P<0.05 vs DSS.

Conjuntamente, los resultados mostrados hasta ahora sugieren una menor afectación inflamatoria, intestinal y sistémica, en los animales colíticos que recibieron la leptina. Con objeto de corroborar dicha afirmación, se realizó un estudio por imagen de la respuesta inflamatoria sistémica, haciendo uso del reactivo L012 Wako® y del dispositivo IVIS Spectrum. En estas condiciones se observa una señal luminiscente directamente proporcional a la presencia de ROS

típicamente asociados a los focos inflamatorios. Como puede observarse en la figura 33, curiosamente el ratón sano como consecuencia de la exposición a leptina, mostró un notable incremento de la señal. Sin embargo, y en consonancia con el cuerpo de resultados anteriormente descrito en el segundo punto de estos resultados, el ratón perteneciente al grupo DSS-leptina exhibió una señal luminiscente menor que el ratón DSS.

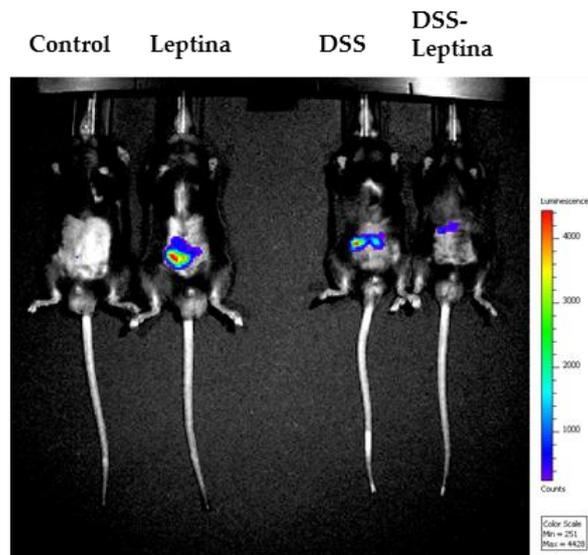


Figura 33. Imagen tomada en IVIS Spectrum que indica la presencia de en el animal anestesiado. El estudio fue realizado el día 5 de DSS, anterior al día de sacrificio.

DISCUSIÓN

La leptina fue descubierta en 1994 como una hormona reguladora del metabolismo producida por el tejido adiposo, la primera de las posteriormente denominadas adipoquinas [48]. Efectivamente la leptina es producida y secretada mayoritariamente por el tejido adiposo, hasta el punto de que los niveles de leptina se correlacionan con la masa de tejido adiposo corporal, y la masa de los adipocitos con los niveles intracelulares de mRNA de leptina y la secreción de la proteína [613]. Es bien conocido que los niveles plasmáticos de leptina están modulados por la ingesta de comida, de forma que disminuyen notablemente con el ayuno total o parcial, y aumentan después del consumo suficiente de alimento [614, 615]. La hiperleptinemia postprandial constituye precisamente una de las señales anorexígenas clave en la regulación de la homeostasis energética [615]. Estos descubrimientos suscitaron un entusiasmo inicial considerable al abrir la puerta a una posible intervención farmacológica en la obesidad en humanos. Sin embargo, pronto se pudo constatar que la regulación energética era mucho más compleja de lo que se pensó inicialmente, y que los individuos obesos manifiestan tolerancia a la hiperleptinemia crónica [616]. Las ratas Zucker obesas utilizadas en la presente tesis doctoral se caracterizan precisamente por una marcada obesidad, manifiesta desde la 3-5 semana de vida, asociada a una mutación heredada con carácter autosómico recesivo en el *LepR* que les confiere resistencia a la leptina. Los animales acusan hiperfagia, muy pronunciada en edad temprana, además de dislipemia aterogénica, resistencia a la insulina, esteatosis hepática y hepatomegalia, disfunción endotelial e hipertensión arterial en edad avanzada [608]. El fenotipo es comparable al de los ratones *db/db*, que carecen de receptores de leptina activos y presentan hiperleptinemia secundaria a la falta de señalización, y al de los ratones *ob/ob*, que no producen leptina aunque este fenotipo puede revertirse con la administración de ésta [617].

La obesidad como tal, así como más específicamente la obesidad abdominal y el acúmulo de grasa abdominal asociada a la inflamación intestinal, han sido relacionadas con la EII [618, 619]. La obesidad se asocia de hecho a varias enfermedades de carácter inflamatorio, como la aterosclerosis, hipertensión, cáncer y enfermedades autoinmunes [97], y constituye en sí misma un estado de inflamación basal [620, 621]. Blain y col. hallaron una mayor tendencia a recaída y a hospitalización, así como a afectación perianal, en pacientes obesos [339]. Por el contrario, Hass y col. en un estudio de casos y controles sólo encontraron diferencias relevantes en cuanto a tiempo hasta la primera intervención quirúrgica, que sólo alcanzó carácter significativo al comparar pacientes obesos con pacientes con déficit de peso (es decir, $BMI > 25$ y $BMI < 18$ kg/m^2 ,

respectivamente) [622]. La obesidad se ha relacionado con la necesidad de cirugía asimismo en la población infantil con EC [337, 623].

La obesidad abdominal parece presentar una correlación significativa con el estado inflamatorio general que se produce en el síndrome metabólico, pero apenas no se ha estudiado este aspecto específicamente en la EII [624]. En la enfermedad de Crohn se produce típicamente una hipertrofia del tejido adiposo en las zonas adyacentes a los segmentos afectados por la inflamación, descrita originalmente por el propio Burrill Crohn. En inglés se suele hablar de '*creeping fat*', que podría traducirse como "grasa de penetración lenta". Se trata de un tejido adiposo atípico con características proinflamatorias [625]. Además, existen algunos informes de casos según los cuales los pacientes sometidos a cirugía bariátrica experimentan una mejoría en su EII, lo que puede asociarse presumiblemente a la reducción de la masa adiposa [340]. Pero existen también casos publicados en los que la EII se agrava o surge de *novo* después de este tipo de intervención [626].

En este sentido, algunos estudios contradicen la asociación positiva entre obesidad y EII. De hecho, tradicionalmente los pacientes de EII no eran obesos ni presentaban sobrepeso [627]. En las últimas décadas el incremento global de obesidad y sobrepeso en la población general se ha traducido también en un aumento en los pacientes de EII, pero no está claro hasta qué punto este hecho constituye un factor de riesgo. La cuestión se complica porque el efecto de la obesidad/sobrepeso puede ser distinto según el caso. La evidencia más sólida se ha obtenido en pacientes de EC de 50-70 años donde la obesidad era manifiesta en el momento del diagnóstico[628]; por el contrario, en la CU y en pacientes de EC jóvenes el riesgo puede ser nulo o incluso negativo.

Varias adipoquinas presentan una correlación con la actividad inflamatoria intestinal, incluyendo la leptina, adiponectina, resistina, visfatina, grelina, y apelina {Tilg, 2006 #3410;Sennello, 2006 #302;Ates, 2008 #2302 ;Konrad, 2007 #2303 ;Valentini, 2009 #8 }, producidas principalmente por el tejido adiposo, y en concreto por el TAM. Así, leptina, resistina, grelina y adiponectina están aumentadas en el TAM de CD [431, 629]. El tejido adiposo es además una fuente significativa de lipoclorhidrinas, productos halogenados derivados de la reacción de los lípidos tisulares con el ácido hipocloroso generado por la mieloperoxidasa, producida a su vez por leucocitos activados, fundamentalmente neutrófilos [630]. La MPO está elevada en la IBD y en modelos de colitis, pero también en el TAM [478, 631].

Así pues, parece existir una relación relevante entre la obesidad y el TAM y el riesgo e intensidad de EII, aunque la evidencia disponible está lejos de ser suficiente.

Sin embargo, existen otros sitios productores de leptina en el organismo, que incluyen el estómago, la placenta y el epitelio intestinal inflamado [544]. En la inflamación intestinal las fuentes de leptina descritas incluyen el TAM, y especialmente la *creeping fat*, las células T de la lámina propia y los propios enterocitos, además de las fuentes extraintestinales ya mencionadas [544, 629, 632]. Se ha propuesto que la translocación bacteriana puede estimular la síntesis y liberación de leptina de *creeping fat* a través de la producción de PPAR- γ [633]. Varios estudios han constatado la existencia de hiperleptinemia en pacientes con EII, lo que puede justificar la anorexia que frecuentemente se produce en estos pacientes y que, unido a las dificultades absortivas, se traducen a menudo en malnutrición clínica [634, 635]. También se ha observado un aumento de los niveles plasmáticos de leptina en modelos experimentales de EII [636]. Además de las implicaciones estrictamente metabólicas, la leptina puede desempeñar un papel relevante en el desarrollo de la inflamación colónica, ya que se trata de una hormona con importantes funciones reguladoras sobre el sistema inmunológico. La importancia de las mismas queda reflejada en el hecho de que los individuos con deficiencia congénita de leptina presentan un aumento de la mortalidad por infecciones infantiles [637]. Entre otras, la leptina inhibe la apoptosis de células T y facilita la diferenciación a Th1, promueve el daño epitelial, inhibe las células Treg, estimula el desarrollo y actividad de células dendríticas, facilita el reclutamiento y activación de neutrófilos, estimula las células NK, etc. [638-640]. En conjunto, se trata de acciones proinflamatorias, por lo que la hiperleptinemia podría estar implicada en la respuesta inflamatoria, e incluso constituir una diana terapéutica.

Esta cuestión se complica aún más por el hecho de que, en el intestino, la estimulación inmunológica puede contribuir a la respuesta inflamatoria pero también contribuir a limitarla, en la medida en que refuerce la FBI [641]. En efecto, el intestino se comporta como una barrera frente a los contenidos y microorganismos lumbinales, permitiendo al mismo tiempo la captación de agua, electrolitos y nutrientes. El debilitamiento de esta barrera da lugar a la entrada de dichos componentes al interior de la mucosa, y en último término a sangre (translocación) [642-644]. Las consecuencias de este fenómeno son potencialmente múltiples, y van desde el estado de un estado de sepsis franca a obesidad/síndrome metabólico, inflamación hepática, trastornos del sistema

nervioso central, etc. [645] Una de estas posibilidades es el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria intestinal en pacientes genéticamente susceptibles. Por otra parte, la leptina presenta acciones de carácter indudablemente protector frente a la inflamación, como la estimulación de la secreción de mucus o efectos sobre la proliferación y reparación epitelial [588-590]. Por tanto, no es posible anticipar una respuesta clara a priori en relación con el carácter protector o lesivo de la leptina en la inflamación intestinal.

Dado que las deficiencias genéticas de leptina y de su receptor son muy raras en humanos, carecemos de datos sobre su posible implicación en el desarrollo de EII [637, 646-650]. Los ratones ob/ob son resistentes a la inducción de colitis con DSS o TNBS, lo que sugiere una implicación positiva de la leptina en la respuesta inflamatoria [651]. Es interesante constatar que el trasplante de tejido adiposo de ratones WT normalizó el fenotipo de los ratones ob/ob, lo que apoya dicha hipótesis, además de señalar la importancia del TAM como fuente de leptina en la modulación de la colitis [652]. La propia administración de leptina tuvo efectos similares, aunque en este estudio no se examinó el efecto de la leptina en ratones WT, es decir, no se puede descartar que la leptina tenga efectos nocivos en la inflamación intestinal independientemente de la presencia o ausencia de la hormona antes del tratamiento. El potencial colitogénico de la leptina se corrobora en el estudio de Siegmund y col., que utilizaron el modelo de colitis por transferencia linfocitaria utilizando poblaciones linfocitarias desprovistas de Treg obtenidas a partir de ratones ob/ob y WT[653]. Los primeros tardaron más tiempo significativamente en inducir la respuesta inflamatoria, lo que es coherente con el papel proinflamatorio de la hormona. Resultados similares obtuvieron Reis y col., quienes emplearon ratones knockout condicionales específicos para el LepR en células T, de manera que la colitis por transferencia a ratones Rag-/- cursó en ausencia de otras alteraciones metabólicas. La consecuencia de esta delección repercutió negativamente en la diferenciación de células T hacia el fenotipo Th17, confiriendo nuevamente resistencia al desarrollo de colitis. Sin embargo, la falta de señalización de leptina en células T incrementó la susceptibilidad en el modelo infeccioso por *C. rodentium* [612]. Por otra parte, la administración de un antagonista pegilado del receptor de leptina tiene efectos protectores en la colitis que se desarrolla en ratones IL-10-/- [654], aunque el doble knockout IL-10-/- ob/ob no modifica la aparición ni la severidad de la colitis espontánea[655]. Sin embargo, en un estudio publicado en *Peptides* utilizando el modelo de colitis por ácido acético la leptina tuvo efectos antiinflamatorios, en abierta contradicción con la evidencia anteriormente expuesta [656]. La leptina ha mostrado efectos protectores

en otros modelos que cursan con inflamación. Así, en el modelo de sepsis inducida por punción y ligación ileocecal, alargó la supervivencia de los roedores hiperleptinémicos, al tiempo que el ratón ob/ob presentó mayor tasa de mortalidad [657].

Se ha observado que la administración intraperitoneal de leptina aumenta la permeabilidad epitelial, y en líneas celulares de epitelio intestinal el efecto es asimismo de aumento de permeabilidad, de forma muy similar al TNF e IFN- γ desde el punto de vista mecanístico [658]. Sin embargo, los ratones con silenciamiento genético del receptor de leptina en el epitelio intestinal son más susceptibles al daño producido por la ameba *Entamoeba histolytica*, lo que sugiere más bien un papel protector frente a las lesiones epiteliales [586, 587]. Es interesante destacar que este fenotipo no se reproduce cuando se silencia la expresión del receptor de leptina en células hematopoyéticas, lo que en principio excluye que su causa sea un defecto en la respuesta inmunológica, que es del tipo Th1 y por tanto presumiblemente dependiente de la leptina. A pesar de ello, uno de los mecanismos implicados es un reclutamiento ineficiente de neutrófilos [659]. La resistencia del epitelio por la leptina parece explicarse por la modulación de genes relacionados con la apoptosis vía STAT3[585], y se ha extendido a la resistencia a *Cl. difficile* [660].

En la presente tesis doctoral utilizamos ratas Zucker obesas como modelo de obesidad por resistencia a la leptina con objeto de evaluar la influencia de este fenotipo en la colitis experimental inducida por TNBS. Como se ha indicado, la obesidad tendería en principio a potenciar la respuesta inflamatoria, mientras que la ausencia de señalización de la leptina tiene efectos difíciles de predecir. El estado de los animales, caracterizado mediante múltiples parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares, indica que el estado de los mismos es globalmente mejor en las ratas Zucker obesas que en los animales control, al menos en relación a marcadores inflamatorios. Así, las ratas obesas presentaron menores niveles de MPO, iNOS y TNF, así como tendencia ($p \approx 0,12$) a menor expresión colónica de IFN- γ , IL-1 β e IL-17A, y a una menor fosforilación/activación de STAT3. Cabe destacar que la leptina es fundamental para la diferenciación de linfocitos Th17, principales productores de IL-17A [612]. La ausencia de cambios en IL-10 es sorprendente, habida cuenta de que esta citoquina normalmente se induce en la colitis; sin embargo, sí se observó un aumento de los niveles de Foxp3, marcador de células Treg, principales productoras de IL-10. Las ratas Zucker obesas presentaron una menor pérdida relativa de peso corporal con la

colitis que las delgadas, en torno a un 50%, pero no absoluta ya que la pérdida de peso absoluta fue de 34 g. Aunque normalmente esto indica una menor afectación sistémica por la colitis, teniendo en cuenta que el consumo de comida fue idéntico en ambos grupos, la interpretación más probable es que este dato sea simplemente el resultado del menor gasto energético de las ratas Zucker obesas con respecto a las delgadas.

Por contra, las ratas Zucker obesas presentaron un mayor engrosamiento colónico, con tendencia a mayor área intestinal afectada por necrosis, y una mayor permeabilidad. Además, subjetivamente la apariencia de las ratas obesas fue peor que la de las delgadas. Por tanto, aunque globalmente puede considerarse que las ratas Zucker obesas son relativamente resistentes a la colitis por TNBS, no es menos cierto que la ausencia de señalización por leptina parece tener algunas consecuencias perjudiciales. No hubo cambios por otra parte en varios parámetros relevantes, incluyendo IDM, COX2, IL-10, Reg3 γ , o actividad AP. Ésta última está típicamente aumentada en la colitis experimental debido a una mayor expresión colónica de la isoforma no específica de tejido (TNAP, codificada por el gen *Alpl*), lo que a su vez se explica tanto por la inducción en el epitelio intestinal como por su presencia en los leucocitos que se infiltran en la mucosa. Debido a que esta isoforma, concretamente sus subtipos renal y óseo, es más sensible a la inhibición por levamisol, la actividad AP en el intestino inflamado es típicamente inhibida en mayor grado por este compuesto que la del tejido sano. En este caso se produjeron ambos fenómenos, es decir, aumento de la actividad AP y de su sensibilidad a la inhibición por levamisol; sin embargo, las ratas obesas presentaron una menor inhibición por levamisol, sin cambios en la actividad enzimática, lo que constituye un hallazgo atípico, aunque en principio es coherente con un menor grado de inflamación en las ratas Zucker obesas. La expresión (mRNA) de *Alpl* fue mucho menor en las ratas obesas con colitis que en las delgadas, hasta el punto que no hubo cambios significativos como consecuencia de la inflamación colónica. No hubo cambios en la expresión de IAP, como se esperaba. Dado que el mecanismo de incremento de actividad AP en el epitelio es postraduccionnal (sin alteración por tanto de los niveles de mRNA), los cambios en *Alpl* apuntan a una menor infiltración leucocitaria, aunque no puede descartarse un efecto adicional a nivel epitelial de la ausencia de señalización por leptina. En este sentido, es interesante constatar que los ratones con colitis por DSS tratados con leptina presentan menor actividad AP colónica, pero sin que se afecte la sensibilidad al levamisol in vitro. Una posible interpretación de estos datos es que la leptina afecta positivamente al

cambio de isoforma TNAP en el epitelio, pero se trata lógicamente de un extremo especulativo.

Otro factor a considerar es la falta de correlación entre actividad MPO y nivel de mRNA de S100A8 en colon; ambos son proteínas expresadas principalmente por neutrófilos, que son los principales leucocitos que se infiltran en la mucosa intestinal en los primeros estadios de la colitis, y en concreto en el modelo de colitis por TNBS en rata[661]. El hecho de que la expresión de S100A8 no se modifique en las ratas Zucker obesas con colitis, mientras que la actividad MPO disminuye significativamente, puede explicarse por un efecto predominante sobre la activación más que la infiltración de neutrófilos.

Contrariamente a lo publicado por otros autores, la colitis no modificó los niveles de leptina en plasma, que presentaron a lo sumo una cierta tendencia a disminuir en las ratas delgadas (los niveles fueron un 50% menores, pero sin alcanzar diferencias significativas debido a la distorsión introducida por los valores tan elevados en las ratas obesas –la diferencia pasa a ser significativa en la comparación uno a uno–), mientras que las obesas no experimentaron cambio alguno y permanecieron elevados. La expresión de leptina en TAM estaba elevada en ratas obesas Zucker respecto a las delgadas, como era de esperar, y disminuyó con la colitis. Otras adipocinas mostraron un comportamiento coincidente, al menos en parte; así, las ratas colíticas presentaron niveles menores de adiponectina, resistina y grelina, aunque es necesario destacar que los niveles de las dos últimas fueron casi nulos en las ratas obesas aun sin colitis, tal vez por la elevada ingesta de comida u otras alteraciones metabólicas. Estos resultados indican que el TAM se vio involucrado en la respuesta inflamatoria, lo que se corresponde con la inducción de IL-1 β y TNF α en este tejido (pero no iNOS).

La colitis por TNBS tuvo efectos muy marcados a nivel metabólico en ratas obesas, con disminución espectacular de los niveles plasmáticos de AGL, TG y colesterol total. Dichos efectos no se produjeron en absoluto en las ratas delgadas, y de hecho suponen una normalización de estos parámetros, que estaban elevados en las ratas obesas control. Aunque en principio podría existir una cierta relación con la disminución de la ingesta asociada a la colitis, se ha descrito que la respuesta de la rata Zucker obesa al ayuno es la contraria, es decir, de incremento aún mayor de la hiperlipemia [662]. Dado que el síndrome de Cushing suele acompañarse de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, es probable que el exceso de corticosterona sea parcialmente responsable de este fenotipo en las ratas Zucker obesas; en tal caso, su normalización en las ratas con colitis podría deberse

igualmente al descenso de la corticosterona en sangre. A su vez, este efecto puede estar relacionado con la inducción de la enzima 11 β -hidroxiesterol deshidrogenasa 1 en tejido adiposo [663]. Es importante tener en cuenta que, pese a que la colitis experimental supone una situación de estrés, no se aprecian normalmente cambios en los niveles plasmáticos de corticosterona, al menos en el momento del sacrificio de los animales (datos pendientes de publicación).[664, 665]. Los niveles plasmáticos de nitratos, que reflejan la producción endógena de NO, presentaron un perfil muy similar, estando muy elevados en ratas obesas control, y reduciéndose hasta normalizarse con la colitis. El primer dato concuerda con el estado inflamatorio basal que caracteriza la obesidad, pero el efecto de la colitis es paradójico, aunque hay que señalar que la inflamación intestinal no se tradujo en cambios en este parámetro en este caso, aunque sí en otros. La interpretación de estos datos no es sencilla, pero dado que la leptina inhibe la producción de CRH, cabe esperar una activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en las ratas Zucker obesas [666-668]. Con objeto de verificar la producción local de esteroides en el colon y los efectos de los corticoides a este nivel se midió la expresión de Cyp11a1 y Gilz, respectivamente. Los resultados sugieren que no existen cambios en la síntesis, pero sí en la respuesta, porque los niveles de mRNA de Gilz están disminuidos en las ratas Zucker obesas. Aunque no se midieron otras dianas, estos datos sugieren que el aumento de corticosterona produce cierto grado de tolerancia, lo que puede explicar al menos en parte los niveles altos de nitratos (pero obviamente no la hiperlipemia). En este sentido, es interesante recordar que el único estudio que hasta la fecha ha documentado efectos protectores de la leptina sobre la colitis señaló que el mecanismo dependía de la estimulación de receptores de glucocorticoides, ya que el efecto protector se veía inhibido por mifepristona [656].

La necesidad de aplicar el análisis por Western blot abundantemente en los experimentos contenidos en la presente tesis doctoral nos llevó a buscar alternativas a los genes de normalización comúnmente utilizados, concretamente mediante el empleo de la tecnología stain-free de la empresa BioRad, que puede constituir una alternativa válida asimismo frente al rojo Ponceau [669]. El objetivo último es aumentar la fiabilidad de la cuantificación de los resultados obtenidos con esta técnica, que no es originalmente una técnica cuantitativa. Los resultados obtenidos nos permitieron validar esta técnica, y corroborar al mismo tiempo los problemas asociados al uso de ciertos genes/proteínas de los considerados *'housekeepers'*, es decir, de expresión constante, ya que pudimos constatar variaciones sustanciales en la expresión de GAPDH en ratas Zucker obesas. Ello

nos condujo a la utilización prioritaria de SF/Ponceau, aunque problemas técnicos derivados de un accidente que tuvo lugar en el laboratorio, con inundación de varias de las habitaciones, nos forzó a utilizar preferentemente el segundo.

Dado que la leptina ha sido relacionada con la FBI, realizamos algunas determinaciones al respecto. Las ratas Zucker obesas presentaron mayor translocación de bacterias a ganglios mesentéricos in vivo, aunque no a hígado, así como tendencia a mayor captación de FITC-dextrano in vitro. No hubo cambios en la translocación de LPS a plasma de sangre portal en las ratas control, pero sí en las ratas Zucker obesas con colitis, que registraron un aumento significativo de la translocación. Es importante considerar sin embargo que el valor correspondiente a OC puede haber quedado enmascarado por la turbidez del plasma debida a la hiperlipemia, por lo que la lectura no es del todo fiable en este grupo experimental. De hecho, los datos obtenidos a partir del tejido hepático parecen sugerir una mayor exposición al LPS vía portal en las ratas obesas, con inducción de *Alpl*, aunque no de *Lbp* ni *Tlr4*. Los 3 marcadores se ven incrementados sin embargo por la colitis (excepto *Tlr4* en ratas Zucker delgadas). La colitis produjo un aumento, aunque no siempre significativo, de los parámetros de permeabilidad/translocación: aumento de translocación bacteriana a hígado y ganglios mesentéricos, de LPS a plasma portal, y de FITC-dextrano in vitro. Aunque los valores fueron siempre superiores en las ratas obesas, las diferencias nunca llegaron a ser significativas. Globalmente estos datos sugieren que las ratas Zucker obesas presentan defectos en su FBI. Teniendo en cuenta que no se registraron cambios en diversos marcadores de permeabilidad, como *Cldn4* o *ZO1*, o de proliferación celular, como ciclina D1 o PCNA, ni de defensa antibacteriana, como *Reg3γ*, *Lyz1* o *Lyz2*, el aumento de permeabilidad/translocación debe atribuirse a cambios regulatorios que no impliquen cambios de expresión en estos genes y/o a la modulación de otros elementos de la FBI, como el sistema inmunológico mucosal, la secreción de mucus o la motilidad. Hay que recalcar por otra parte que no se consiguió amplificar varios genes considerados, incluyendo ocludina, *Cldn1*, *Muc2*, *Muc3*, lipocalina 2, β -defensinas 1 y 2, y *Lyc-2*. Los niveles plasmáticos de zonulina fueron mayores en las ratas Zucker obesas con colitis que en las no colíticas; este efecto se observó también en las ratas delgadas, pero no llegó a ser significativo. La zonulina es un importante regulador de la permeabilidad del intestino delgado, actuando vía sanguínea tras su liberación por el colon, por lo que constituye un marcador plasmático de permeabilidad intestinal. Por tanto, es posible que el

defecto de FBI observado in vivo pueda deberse al menos en parte a este mecanismo.

Una explicación plausible de nuestros resultados es que la ausencia de señalización por leptina produce una adaptación del sistema inmunológico y/o del conjunto de elementos que conforman la barrera intestinal, de forma que el organismo se hace menos sensible a la respuesta inflamatoria. Estos resultados no excluyen la posibilidad de que la leptina tenga efectos sustancialmente diferentes en animales en los que la señalización permanece intacta. Con objeto de comprobar este extremo planteamos el siguiente experimento utilizando leptina exógena. Para aumentar la eficacia del tratamiento utilizamos una forma pegilada de la hormona. La pegilación facilita la asociación no covalente de las proteínas a proteínas portadoras en plasma, fundamentalmente albúmina, constituyendo una reserva de liberación lenta a la fracción soluble y bioactiva. La pegilación consiste en la unión por proceso químico de uno o varios PEG a otra molécula mediante enlaces resistentes, lo que implica que será el pegilado el que se absorba, distribuya, una al receptor y se elimine [670, 671{Cao, 1990 #490}]. Este proceso admite una gran cantidad de variantes, existiendo diversos precedentes en la farmacología de moléculas pegiladas como los factores estimulantes del crecimiento de macrófagos y granulocitos, interferones, la IL-2, etc. Las ventajas fundamentales de los pegilados se resumen en una menor susceptibilidad a la degradación enzimática, mayor estabilidad física y térmica, aumento de la solubilidad en agua, reducción del aclaramiento plasmático con el correspondiente aumento de la semivida de eliminación, reducción de la inmunogenicidad y de la antigenicidad y mejoría del perfil de toxicidad. El tamaño y peso molecular del PEG empleado determinará sus características farmacológicas, entre las cuales puede destacarse la reducción del aclaramiento (conseguida a través de reducción del filtrado glomerular, resistencia a la proteólisis y a la fagocitosis) y de las velocidades de absorción y distribución. En definitiva, se consigue un aumento notable de la biodisponibilidad [672, 673]. El resultado neto es una ralentización de la eliminación de la leptina y por tanto una potenciación de sus efectos biológicos. Lógicamente el modelo de ratas Zucker obesas no es adecuado para este tipo de experimento, dado que el receptor de leptina no responde a la hormona endógena, que de hecho está aumentada en estos animales. Elegimos ratones normales (no obesos) a los que se les indujo una colitis aguda por adición de DSS al agua de bebida. La elección del ratón como animal de experimentación tuvo dos razones; una de carácter técnico, dado que las herramientas de laboratorio disponibles para la caracterización de la respuesta inmunológica e

inflamatoria en el ratón son netamente superiores a las que existen para la rata. Una segunda de carácter puramente económico, ya que el tratamiento con leptina tendría un coste adicional aproximado entre 20000-30000 euros.

En este segundo experimento se utilizó el modelo de colitis por DSS en lugar de TNBS. Ambos modelos se utilizan profusamente en todo el mundo y son de hecho los más populares, especialmente para ensayar nuevos tratamientos farmacológicos o nutricionales. Existen importantes diferencias mecanísticas y fenotípicas entre ambos. La colitis por TNBS en rata se produce por la generación de antígenos inmunoreactivos en la mucosa intestinal erosionada por el etanol al 50%, tras la haptención de proteínas locales. Se caracteriza por una reacción inmunológica poco diferenciada, transmural y granulomatosa, que tarda semanas en resolverse y tiene un marcado carácter fibrótico. El epitelio se necrosa en el proceso y se regenera paulatinamente a los pocos días [674]. Por su parte, en la colitis por DSS se produce una lesión epitelial inicial, con exposición resultante del interior de la mucosa a los constituyentes de la microbiota, y una respuesta inflamatoria secundaria, que es mucho menos fibrótica y granulomatosa, y en cambio se caracteriza por una mayor pérdida de sangre a través del recto [675]. En ratas la respuesta inmunológica es asimismo poco diferenciada, mientras que en ratones es claramente del tipo Th1 [676]. Aunque el sistema inmunológico adaptativo se ve implicado en ambos casos, se trata de modelos que producen respuestas similares en ausencia de linfocitos [610, 677-679]. El modelo de TNBS en ratones es sustancialmente distinto del modelo en ratas, y tiende a ser menos reproducible, mientras que el modelo de colitis por DSS es el más utilizado en ratones, incluyendo un estudio en ratones ob/ob, ya mencionado. Por todo ello optamos por utilizarlo en nuestro segundo experimento.

Dado que los ratones objeto de estudio tenían receptores funcionales de leptina, la administración de hormona exógena dio lugar a una disminución de la ingesta, como era de esperar, con la consiguiente pérdida de peso corporal. Con objeto de excluir el impacto de este fenómeno sobre el resultado final, se procedió a limitar la ingesta del grupo control, con un desfase de un día. De esta forma la evolución del peso corporal fue muy similar en ambos grupos, aunque se mantuvo en todo momento un cierto efecto residual, achacable a un mayor metabolismo basal en los animales tratados. La administración de DSS se tradujo en el cuadro sintomático esperado, consistente en pérdida de peso, hemorragia rectal, y diarrea, además de un aspecto enfermizo de los animales. La gravedad de la respuesta inflamatoria fue menor en los animales tratados con la leptina pegilada, con base

en múltiples parámetros analizados: engrosamiento del colon, daño histológico, actividad fosfatasa alcalina, sangre en heces y normalización de la anemia asociada, IFN- γ , IL-6 (no significativo), IL-1 β , IL-27, Reg3 γ , fosforilación de STAT3, presencia de células CD4⁺ IFN- γ ⁺ en ganglios mesentéricos, etc. La leptina normalizó la neutrofilia y basofilia producidas por la colitis, aunque no la trombofilia. Se observaron niveles menores de TNF α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17A, IL-12 p70 en cultivos de explantes de colon, aunque sin llegar al umbral de la significancia en ningún caso. Los resultados concernientes a TNF α e IL-17A en explantes contrastan fuertemente con los niveles de mRNA medidos en tejido colónico, que fueron mayores en los animales tratados que en los controles con colitis. No es el único ejemplo de dato atípico en este experimento. Así, la actividad mieloperoxidasa colónica no se vio modificada, lo que resulta totalmente incoherente con el resto de parámetros. Sí se constató un aumento de S100A8, así como un efecto de inhibición del mRNA correspondiente en los animales tratados con leptina, lo que sugiere que el dato de mieloperoxidasa es probablemente erróneo, por razones desconocidas. Otro resultado sorprendente fue la ausencia de producción de IFN- γ en esplenocitos de ratones con colitis, y en general el conjunto de datos obtenidos en esplenocitos, que no mostraron un comportamiento diferente de los cultivos primarios obtenidos de animales con colitis o control, además de una respuesta muy pobre a LPS. Carecemos de explicación para ello.

Los animales tratados con leptina presentaron niveles mayores de mRNA de ZO-1, que a su vez disminuyó con la colitis. La leptina aumentó asimismo los niveles de expresión de Cldn4 y 5, aunque en este caso los genes no se vieron afectados significativamente por la inflamación colónica. No se observaron efectos de la leptina sobre marcadores de proliferación en animales con colitis, pero sí en los controles, con aumento de la expresión de PCNA, Myc, FGF7 y ciclina D1 (no significativo). Uno de los resultados sobresalientes fue la mejora en la producción de mucus en los animales tratados, lo que aumenta la protección del epitelio en la colitis. Los animales colíticos que recibieron leptina presentaron asimismo niveles menores de apoptosis, según indican los niveles de BAX/BCL2; en la medida en que estos datos representen un efecto a nivel epitelial la leptina contribuiría adicionalmente a la reparación de lesiones epiteliales, aunque este mecanismo es obviamente especulativo. Globalmente, estos datos sugieren que el tratamiento con leptina refuerza la FBI, presumiblemente contribuyendo a la protección frente a la colitis. Desafortunadamente no tenemos datos que corroboren directamente este hecho, ya que no se apreciaron cambios en cuanto a translocación de LPS o

bacterias. Los estudios previos disponibles indican que la leptina tiene efectos contrapuestos a nivel epitelial, aumentando la permeabilidad pero al mismo tiempo favoreciendo la proliferación y la respuesta regenerativa. Por tanto, nuestros resultados coinciden en lo sustancial aunque con importantes discrepancias.

Al igual que en el experimento en ratas Zucker, la inflamación no se acompañó de un aumento en los niveles plasmáticos de leptina, que por el contrario se vieron marcadamente reducidos, en torno a un 90%. No se midieron las muestras de los animales que recibieron leptina, al dar reacción cruzada. Al igual que en las ratas, la colitis no produjo cambios en los niveles de corticosterona. El tratamiento con leptina dio lugar a niveles menores de corticoides, aunque sin llegar a la significancia, lo que es acorde con la regulación negativa que ejerce la leptina a nivel hipotalámico, aunque es probable que en estos animales la corticosterona tenga un origen periférico, como se ha comentado anteriormente [667, 668, 680]. La expresión del receptor de leptina se vio incrementada en colon, íleon y TAM de animales colíticos tratados con leptina, y sólo en el íleon de los colíticos no tratados. En el íleon, que no estaba afectado por la inflamación, se observó también una inducción de *Cldn5* y una disminución de *Cldn4*. Estos datos indican que la colitis por DSS tiene efectos en regiones no inflamadas, lo que se ha descrito anteriormente [681, 682]. La expresión de leptina en el TAM fue anulada totalmente tanto por el tratamiento con leptina exógena como por la inflamación del colon (al igual que ocurría en ratas). En general no hubo alteraciones en los niveles de mRNA de otras adipoquinas, con excepción de la apelina, que se vio inhibida en ratones con colitis, lo que representa un perfil claramente diferente del observado en ratas con colitis por TNBS. Por su parte, la leptina exógena dio lugar a una disminución de los niveles de mRNA de adiponectina, resistina y apelina, pero no grelina ni visfatina. Nuestros resultados no indican que el TAM presentase un estado de activación inmunológica, más allá de la elevación del marcador neutrofílico Ly6g.

Estos resultados son coherentes con los publicados por Cakir y col., que observaron una menor respuesta inflamatoria en ratas con colitis aguda inducida por ácido acético [656]. Globalmente puede interpretarse que la leptina tiene efectos antiinflamatorios intestinales, los cuales pueden achacarse a mecanismos de refuerzo de la FBI, aunque este extremo es necesariamente especulativo en nuestro estudio. Sin embargo, Singh y col. obtuvieron igualmente efectos antiinflamatorios utilizando un antagonista pegilado como en nuestro caso para

obtener efectos duraderos tras cada administración [654, 683]. El modelo utilizado en este caso es el de colitis espontánea en ratones *knock out* para IL-10, que se caracteriza por una inflamación crónica de baja intensidad asociada a una respuesta inmunológica de tipo Th1. Una posible explicación a esta discrepancia es el diferente papel que desempeñan en los diferentes modelos los sistemas innato y adaptativo, en la medida en que los modelos de colitis por DSS y por ácido acético tienen un menor componente del segundo (aunque no se ha investigado formalmente este extremo en el modelo del ácido acético, su corta duración, de 2-4 días, hace poco probable que el sistema adaptativo se vea implicado de forma significativa). Se trata no obstante de una explicación insatisfactoria y que deja la cuestión sin resolver.

Nuestros resultados, al igual que los estudios previos disponibles, indican que el papel de la leptina en la inflamación intestinal es sin duda complejo, como queda de manifiesto por el hecho de que el mismo equipo obtenga resultados sustancialmente equivalentes, esto es, de protección frente a la inflamación colónica, en presencia y ausencia de la leptina como modulador biológico. Sin embargo, podemos extraer algunas conclusiones. En primer lugar, las ratas Zucker obesas parecen presentar un defecto en su FBI que se ve potenciada con la colitis, mientras que los ratones tratados con leptina aparentemente se ven reforzados a este nivel. Los datos obtenidos son insuficientes, sobre todo por la ausencia de translocación en los ratones, que es relativamente frecuente. Aunque se ha descrito que la leptina produce lesiones epiteliales y aumento de la permeabilidad, también se ha establecido que aumenta la secreción de mucus y la reparación epitelial, como se ha indicado anteriormente.

En segundo lugar, el efecto de la leptina exógena fue más claramente beneficioso que el de la resistencia a la leptina, en la medida en que las ratas Zucker obesas presentaron algunos parámetros desfavorables frente a los controles, es decir, indicativos de una mayor afectación inflamatoria. Este hecho puede deberse a la adaptación fisiológica que experimentan las ratas Zucker obesas, y que es presumiblemente análoga a la que se produce en ratones *ob/ob* y *db/db* que, como ellas, son resistentes a la colitis experimental.

En tercer lugar, nuestros datos no confirman en absoluto que la leptina esté elevada en la inflamación intestinal, o que los enterocitos secreten leptina hacia la luz del intestino en la colitis. La tendencia es más bien la contraria.

En función de todo lo anterior, el papel de la leptina en la EII/colitis experimental queda aún sin establecer. La evidencia disponible, incluyendo los datos generados en el contexto de esta tesis doctoral, indican que tanto la ausencia de señalización de leptina como la estimulación de los receptores puede tener efectos atenuantes sobre la respuesta inflamatoria. La cuestión se complica además por el hecho de que existen estudios que contradicen la hiperproducción de leptina en la EII. Es probable por tanto que el efecto pueda depender de condicionantes como el tipo de respuesta inflamatoria/enfermedad (EC/CU), la presencia o no de obesidad, el estadio de la enfermedad, etc.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La técnica "stain-free" supera a la tinción reversible con rojo ponceau, y ambos son más consistentes que la inmunodetección de proteínas constitutivas usadas como control de carga en el Western Blot.
2. En la rata Zucker obesa, que presentan resistencia a la leptina, la respuesta inflamatoria al TNBS está globalmente atenuada pero con un mayor grado de lesión epitelial. Por su parte, el tratamiento de ratones sanos con leptina exógena tiene efectos netamente protectores frente a la colitis por DSS, que se asociaron a una mejor FBI.
3. La leptina tiene por tanto un papel complejo en el desarrollo de colitis experimental, de forma que sus efectos pueden ser protectores o perjudiciales dependiendo del contexto. Nuestras observaciones son coherentes con las publicadas con otros autores utilizando animales con déficit de señalización por leptina (ratones ob/ob y db/db), ratas tratadas con leptina, ratones tratados con antagonista de leptina y otros.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Stain-Free gels outperform Ponceau reversible staining, and both are more consistent than the immunodetection of housekeeping proteins as a loading control for Western blotting.
2. In the Zucker rat, a well established model of genetic obesity featured by leptin resistance, the TNBS-induced inflammatory response is notably reduced, but this correlates with an enhanced epithelial damage. Besides, exogenous leptin administration to healthy mice has beneficial effects on the subsequently induced DSS model of colitis, due to an improved intestinal barrier function.
3. Leptin plays a complex role on the experimental colitis, given that its effects are both protective or harmful depending on the context. Our results are in good agreement with those published by other authors making use of animals with an impaired leptin signaling (ob/ob mice and db/db mice), rats treated with exogenous leptin, mice exposed to leptin antagonists, and others.

ANEXOS

1. INDICE DE ABREVIATURAS

ALPL	<i>fosfatasa alcalina no específica de tejido</i>
AP	<i>fosfatasa alcalina</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APCs	<i>células presentadoras de antígenos</i>
APO	<i>apolipoproteína</i>
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BAX	<i>bcl2-associated x protein</i>
BCL2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>
CCK	<i>colecistoquina</i>
CD	<i>Crohn's Disease</i>
CLAU	<i>Claudina</i>
CMH	<i>complejo mayor de histocompatibilidad</i>
ConA	<i>concanavalina A</i>
COX2	<i>ciclooxigenasa-2</i>
CRH	<i>hormona liberadora de corticotropina</i>
CRP	<i>proteína C reactiva</i>
CU	<i>colitis ulcerosa</i>
DAI	<i>disease activity index</i>
DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i>
DC	<i>delgado control</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPP-4	<i>dipeptidil peptidasa-4</i>
DSS	<i>sulfato de dextrano sódico</i>
EC	<i>Enfermedad de Crohn</i>
EDC	<i>Endocrine disruptors</i>
EII	<i>Enfermedad Inflamatoria Intestinal</i>
FABPs	<i>fatty acid binding proteins</i>
FBI	<i>Función de barrera intestinal</i>
FBS	<i>suero bovino fetal</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
GLP-1	<i>glucagon like peptide-1</i>

GWAS	<i>genome-wide association study</i>
H&E	<i>hematoxilina y eosina</i>
Hb	<i>hemoglobina</i>
HFD	<i>high fat diet</i>
HP	<i>haptoglobina</i>
HPRT	<i>hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa</i>
HTC	<i>hematocrito</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IECs	<i>intestinal epithelial cells</i>
IFN	<i>interferón</i>
IL-	<i>interleukina</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRS	<i>sustrato del receptor de la insulina</i>
JAK	<i>Janus Kinasa 2</i>
JNK	<i>quinasas c-Jun N-terminal</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LepR	<i>Receptor de leptina</i>
LepRb	<i>Isoforma b del LepR</i>
LPS	<i>lipopolisacárido</i>
LXRs	<i>liver X receptors</i>
LYZ	<i>Lisozima</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAT	<i>mesenteric adipose tissue</i>
MBF	<i>mucosal barrier function</i>
MCP1	<i>proteína quimiotáctica de monocitos-1</i>
MLN	<i>mesenteric lymph nodes</i>
MPO	<i>mieloperoxidasa</i>
mRNA	<i>RNA mensajero</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NEU	<i>neutrófilos</i>
NF- κ B	<i>factor nuclear kappa B</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKT	<i>células T natural killer</i>
NLR	<i>receptores tipo NOD -nucleotide-binding-oligomerisation-NOD-like receptors</i>

NO	<i>óxido nítrico</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCT	<i>trombocrito</i>
PI3K	<i>fosfoinositol-3-kinasa</i>
PLT	<i>plaquetas</i>
PPAR	<i>receptor nuclear activado por la proliferación de peroxisomas</i>
RAG	<i>gen activador de la recombinación</i>
RBC	<i>eritrocitos</i>
REG	<i>regenerating islet-derived protein</i>
RLR	<i>receptores tipo RIG</i>
ROCK	<i>Rho-kinasa</i>
ROS	<i>radicales libres de oxígeno</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SI	<i>Sistema Inmunológico</i>
SOCS	<i>supressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVF	<i>stromal-vascular fraction</i>
TAM	<i>tejido adiposo mesentérico</i>
TGFbeta	<i>factor de crecimiento transformante β</i>
TLRs	<i>Receptores tipo Toll</i>
TNBS	<i>ácido trinitrobenceno sulfónico</i>
TNFalpha	<i>factor de necrosis tumoral α</i>
Treg	<i>células T reguladoras</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>factor de crecimiento asociado al endotelio</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i>
ZO	<i>zonula occludens</i>

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haslam, D.W. and W.P.T. James, *Obesity*. The Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-1209.
2. Shabana and S. Hasnain, *Obesity, More than a 'Cosmetic' Problem. Current Knowledge and Future Prospects of Human Obesity Genetics*. Biochem Genet, 2015.
3. El-Sayed Moustafa, J.S. and P. Froguel, *From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(7): p. 402-13.
4. Hall, K.D., et al., *Energy balance and its components: implications for body weight regulation*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(4): p. 989-94.
5. Contreras, C., et al., *The brain and brown fat*. Ann Med, 2015. **47**(2): p. 150-68.
6. Berthoud, H.R., H. Zheng, and A.C. Shin, *Food reward in the obese and after weight loss induced by calorie restriction and bariatric surgery*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1264**: p. 36-48.
7. Richard, D., *Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(8): p. 489-501.
8. Harris, R.B., *Role of set-point theory in regulation of body weight*. FASEB J, 1990. **4**(15): p. 3310-8.
9. Horvath, T.L., et al., *Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14875-80.
10. Greenhill, C., *Obesity: Gut microbiota, host genetics and diet interact to affect the risk of developing obesity and the metabolic syndrome*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(11): p. 630.
11. Festi, D., et al., *Gut microbiota and metabolic syndrome*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(43): p. 16079-94.
12. Chassaing, B. and A.T. Gewirtz, *Gut microbiota, low-grade inflammation, and metabolic syndrome*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 49-53.
13. D'Aversa, F., et al., *Gut microbiota and metabolic syndrome*. Intern Emerg Med, 2013. **8 Suppl 1**: p. S11-5.
14. Tilg, H., *Obesity, metabolic syndrome, and microbiota: multiple interactions*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44 Suppl 1**: p. S16-8.
15. Nieuwdorp, M., et al., *Role of the microbiome in energy regulation and metabolism*. Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1525-33.
16. Cani, P.D., *Metabolism in 2013: The gut microbiota manages host metabolism*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(2): p. 74-6.
17. Dinan, T.G. and J.F. Cryan, *Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?* Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(9): p. 713-9.
18. Luna, R.A. and J.A. Foster, *Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression*. Curr Opin Biotechnol, 2015. **32**: p. 35-41.
19. Manichanh, C., et al., *The gut microbiota in IBD*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012. **9**(10): p. 599-608.
20. Geurts, L., et al., *Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics*. Benef Microbes, 2014. **5**(1): p. 3-17.
21. Delzenne, N.M., A.M. Neyrinck, and P.D. Cani, *Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome*. Microb Cell Fact, 2011. **10 Suppl 1**: p. S10.
22. Desbonnet, L., et al., *Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression*. Neuroscience, 2010. **170**(4): p. 1179-88.
23. Ocon, B., et al., *Active hexose-correlated compound and Bifidobacterium longum BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis*. Eur J Nutr, 2013. **52**(2): p. 457-66.
24. Hales, C.N. and D.J. Barker, *The thrifty phenotype hypothesis*. Br Med Bull, 2001. **60**: p. 5-20.

25. Dulloo, A.G., et al., *The thrifty 'catch-up fat' phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth trajectories to obesity and metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2006. **30 Suppl 4**: p. S23-35.
26. Dulloo, A.G., *Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: a thrifty phenotype that predisposes individuals with catch-up growth to insulin resistance and obesity*. Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 90-7.
27. Zoeller, R.T., et al., *Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4097-110.
28. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement*. Endocr Rev, 2009. **30**(4): p. 293-342.
29. Das, U.N., *Obesity: genes, brain, gut, and environment*. Nutrition, 2010. **26**(5): p. 459-73.
30. Maric, G., et al., *The role of gut hormones in appetite regulation (review)*. Acta Physiol Hung, 2014. **101**(4): p. 395-407.
31. Exley, M.A., et al., *Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity*. J Endocrinol, 2014. **223**(2): p. R41-8.
32. Lanthier, N. and I.A. Leclercq, *Adipose tissues as endocrine target organs*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(4): p. 545-58.
33. Sohn, J.W., *Network of hypothalamic neurons that control appetite*. BMB Rep, 2015. **48**(4): p. 229-33.
34. Newbold, R.R., *Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life*. Am J Clin Nutr, 2011. **94**(6 Suppl): p. 1939S-1942S.
35. Janesick, A. and B. Blumberg, *Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2011. **93**(1): p. 34-50.
36. Berthoud, H.R., *Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss?* Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(6): p. 888-96.
37. Avena, N.M., P. Rada, and B.G. Hoebel, *Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(1): p. 20-39.
38. Bello, N.T., L.R. Lucas, and A. Hajnal, *Repeated sucrose access influences dopamine D2 receptor density in the striatum*. Neuroreport, 2002. **13**(12): p. 1575-8.
39. Yu, Y.H., et al., *Metabolic vs. hedonic obesity: a conceptual distinction and its clinical implications*. Obes Rev, 2015. **16**(3): p. 234-47.
40. Murray, S., et al., *Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(9): p. 540-52.
41. Versini, M., et al., *Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(9): p. 981-1000.
42. Wang, P., et al., *The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue*. J Cell Physiol, 2008. **216**(1): p. 3-13.
43. Lehr, S., S. Hartwig, and H. Sell, *Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders*. Proteomics Clin Appl, 2012. **6**(1-2): p. 91-101.
44. Vague, J., *The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease*. Am J Clin Nutr, 1956. **4**(1): p. 20-34.
45. Carey, V.J., et al., *Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study*. Am J Epidemiol, 1997. **145**(7): p. 614-9.
46. Ohlson, L.O., et al., *The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913*. Diabetes, 1985. **34**(10): p. 1055-8.

47. Pouliot, M.C., et al., *Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels.* Diabetes, 1992. **41**(7): p. 826-34.
48. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
49. Denroche, H.C., et al., *Leptin therapy reverses hyperglycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes, independent of hepatic leptin signaling.* Diabetes, 2011. **60**(5): p. 1414-23.
50. Fujikawa, T., et al., *Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17391-6.
51. Ottaway, N., et al., *Diet-induced obese mice retain endogenous leptin action.* Cell Metab, 2015. **21**(6): p. 877-82.
52. Hida, K., et al., *Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10610-5.
53. Bluher, M., *Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance.* Endocrine, 2012. **41**(2): p. 176-82.
54. Kloting, N., et al., *Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects.* Diabetologia, 2011. **54**(7): p. 1819-23.
55. Youn, B.S., et al., *Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 372-7.
56. Heiker, J.T., et al., *Vaspin inhibits kallikrein 7 by serpin mechanism.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(14): p. 2569-83.
57. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance.* Science, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
58. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.* Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
59. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
60. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
61. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
62. Yu, C., et al., *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle.* J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50230-6.
63. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
64. Glass, C.K. and S. Ogawa, *Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 44-55.
65. Joseph, S.B., et al., *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors.* Nat Med, 2003. **9**(2): p. 213-9.
66. Furuhashi, M. and G.S. Hotamisligil, *Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets.* Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(6): p. 489-503.
67. Hotamisligil, G.S., et al., *Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein.* Science, 1996. **274**(5291): p. 1377-9.
68. Shum, B.O., et al., *The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation.* J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2183-2192.
69. Maeda, K., et al., *Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes.* Cell Metab, 2005. **1**(2): p. 107-19.

70. Ferrante, A.W., Jr., *Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation*. J Intern Med, 2007. **262**(4): p. 408-14.
71. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
72. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
73. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
74. Konner, A.C. and J.C. Bruning, *Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(1): p. 16-23.
75. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
76. Hosoi, T., et al., *Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice*. PLoS One, 2010. **5**(9).
77. Vijay-Kumar, M., et al., *Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice*. J Inflamm (Lond), 2011. **8**(1): p. 2.
78. Kopp, A., et al., *Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(4): p. 648-56.
79. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
80. Kamei, N., et al., *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26602-14.
81. Inouye, K.E., et al., *Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2242-50.
82. Kirk, E.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1254-61.
83. Ahmad, R., et al., *Interaction of osteopontin with IL-18 in obese individuals: implications for insulin resistance*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63944.
84. Chapman, J., et al., *Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13959.
85. Nomiyama, T., et al., *Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2877-88.
86. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3466-79.
87. Miyazaki, T., J. Kurokawa, and S. Arai, *AIMing at metabolic syndrome. -Towards the development of novel therapies for metabolic diseases via apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)*. Circ J, 2011. **75**(11): p. 2522-31.
88. Kurokawa, J., et al., *Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 12072-7.
89. Franchi, L., R. Munoz-Planillo, and G. Nunez, *Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes*. Nat Immunol, 2012. **13**(4): p. 325-32.
90. Stienstra, R., et al., *Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(37): p. 15324-9.
91. Stienstra, R., et al., *The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity*. Cell Metab, 2010. **12**(6): p. 593-605.
92. Wen, H., et al., *Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 408-15.

93. Strissel, K.J., et al., *T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(10): p. 1918-25.
94. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissue lymphocytes: types and roles*. J Physiol Biochem, 2009. **65**(4): p. 423-36.
95. Kaminski, D.A. and T.D. Randall, *Adaptive immunity and adipose tissue biology*. Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 384-90.
96. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
97. Winer, S., et al., *Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 921-9.
98. Zuniga, L.A., et al., *IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6947-59.
99. Duffaut, C., et al., *Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1608-14.
100. Rocha, V.Z. and E.J. Folco, *Inflammatory concepts of obesity*. Int J Inflam, 2011. **2011**: p. 529061.
101. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.
102. Lira, F.S., et al., *Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF-kappaB pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Cytokine, 2012. **57**(1): p. 98-106.
103. Priceman, S.J., et al., *Regulation of adipose tissue T cell subsets by Stat3 is crucial for diet-induced obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(32): p. 13079-84.
104. Nishimura, S., et al., *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 914-20.
105. Ohmura, K., et al., *Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 193-9.
106. Winer, D.A., et al., *B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 610-7.
107. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
108. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. J Clin Gastroenterol, 1986. **8**(5): p. 594-8.
109. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. Dis Colon Rectum, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
110. Gyde, S.N., et al., *Malignancy in Crohn's disease*. Gut, 1980. **21**(12): p. 1024-9.
111. Ekbo, A., et al., *Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement*. Lancet, 1990. **336**(8711): p. 357-9.
112. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. Gastroenterol Clin North Am, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
113. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. Gut, 1970. **11**(11): p. 928-40.
114. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. Scand J Gastroenterol, 1992. **27**(6): p. 501-7.
115. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. J Pathol, 1983. **140**(3): p. 209-19.

116. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(3): p. 289.
117. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
118. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 850-7.
119. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1967. **2**(2): p. 129-36.
120. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. J Pediatr, 2003. **143**(4): p. 525-31.
121. Askling, J., et al., *Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden*. Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1179.
122. Lindberg, E., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(3): p. 259-64.
123. Hildebrand, H., et al., *Chronic inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991. **13**(3): p. 293-7.
124. White, J.M., et al., *Inflammatory bowel disease in African American children compared with other racial/ethnic groups in a multicenter registry*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(12): p. 1361-9.
125. Castro, M., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003)*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(9): p. 1246-52.
126. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. Am J Gastroenterol, 1980. **74**(4): p. 332-6.
127. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1989. **97**(4): p. 900-4.
128. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 310-6.
129. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002559.
130. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. J Gastrointestin Liver Dis, 2009. **18**(2): p. 137-8.
131. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
132. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
133. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1978. **75**(3): p. 368-72.
134. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 549-53.
135. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. Springerplus, 2012. **1**(1): p. 47.
136. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. BMJ, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
137. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(8): p. 849-53.

138. Chassaing, B., et al., *Crohn disease--associated adherent-invasive E. coli bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 966-75.
139. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
140. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(5): p. 913-24.
141. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(6): p. 1398-408.
142. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. Digestion, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
143. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. Ann Intern Med, 1963. **59**: p. 133-44.
144. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]*. Gastroenterol Hepatol, 2001. **24**(5): p. 228-35.
145. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease*. Gut, 1994. **35**(5): p. 696-700.
146. Probert, C.S., et al., *Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire*. Gut, 1993. **34**(11): p. 1547-51.
147. Park, J.B., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease in Korea*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(12): p. 1146-51.
148. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(2): p. 84-8.
149. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. Gastroenterology, 1984. **86**(3): p. 449-52.
150. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1983. **88**: p. 14-6.
151. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.
152. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
153. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. BMJ, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
154. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
155. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
156. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
157. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(6): p. 715-22.
158. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e58.

159. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(2): p. 204-12.
160. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e819.
161. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(1): p. 99-109.
162. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
163. Blanco-Kelly, F., et al., *CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11520.
164. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
165. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
166. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
167. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
168. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(6): p. 372-85.
169. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. *J Dig Dis*, 2014. **15**(12): p. 641-6.
170. Human Microbiome Jumpstart Reference Strains, C., et al., *A catalog of reference genomes from the human microbiome*. *Science*, 2010. **328**(5981): p. 994-9.
171. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
172. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. **75**(3): p. 245-51.
173. De Cruz, P., et al., *Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(2): p. 372-90.
174. Wills, E.S., et al., *Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90981.
175. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 44-54.
176. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
177. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(1): p. 179-84.
178. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. *J Immunol*, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
179. Lindsay, J.O., et al., *Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2006. **55**(3): p. 348-55.
180. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1617-23.

181. Grehan, M.J., et al., *Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora*. J Clin Gastroenterol, 2010. **44**(8): p. 551-61.
182. Anderson, J.L., R.J. Edney, and K. Whelan, *Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(6): p. 503-16.
183. Sha, S., et al., *Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children*. Aliment Pharmacol Ther, 2014. **39**(10): p. 1003-32.
184. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
185. Engel, G.L., *Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon*. Gastroenterology, 1969. **57**(3): p. 362-5.
186. Alexander, T., *An objective study of psychological factors in ulcerative colitis in children*. Appl Ther, 1965. **7**(10): p. 837-9.
187. Robertson, D.A., et al., *Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1989. **30**(5): p. 623-6.
188. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(6): p. 985-90.
189. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
190. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. Gastroenterology, 1987. **93**(1): p. 91-7.
191. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. Gut, 2008. **57**(1): p. 50-8.
192. Wlk, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 505-15.
193. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4968-76.
194. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. Stress, 2008. **11**(3): p. 225-34.
195. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(3): p. G555-64.
196. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. Behav Res Ther, 1991. **29**(2): p. 167-77.
197. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease*. Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(12): p. 1289-96.
198. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease*. J Psychosom Res, 2004. **56**(6): p. 687-96.
199. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. Epidemiology, 1992. **3**(1): p. 47-52.
200. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998. **10**(3): p. 243-9.

201. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 741-5.
202. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
203. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(6): p. 599-603.
204. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. J Nutr, 1991. **121**(4): p. 547-55.
205. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. N Engl J Med, 1989. **320**(5): p. 265-71.
206. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. Nutr Rev, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
207. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
208. Bergstrand, O. and G. Hellers, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1983. **18**(7): p. 903-6.
209. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls*. Br Med J, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
210. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13927.
211. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
212. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.
213. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
214. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.
215. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(6): p. 776-81.
216. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
217. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. Am J Dig Dis, 1966. **11**(11): p. 858-64.
218. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(1): p. 81-6.
219. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6317): p. 706.
220. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 168.
221. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4.
222. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52.
223. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.
224. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(6): p. 824-30.
225. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8.
226. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(2): p. 73-8.

227. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(4): p. 288-9.
228. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(8): p. 664-71.
229. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
230. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 707-15.
231. Duggan, A.E., et al., *Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. Gut, 1998. **43**(4): p. 494-8.
232. Ekbohm, A., *Appendectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* Gut, 1998. **43**(4): p. 451.
233. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2002. **51**(6): p. 808-13.
234. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7.
235. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
236. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 241-53.
237. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
238. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. Steroids, 2002. **67**(2): p. 119-26.
239. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 270-82.
240. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
241. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
242. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
243. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
244. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
245. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
246. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
247. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
248. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
249. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
250. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.

251. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.
252. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
253. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
254. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
255. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG*. Scand J Immunol, 2009. **69**(3): p. 181-7.
256. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 33.
257. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
258. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
259. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(2): p. 195-204.
260. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 298-306.
261. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 373-81.
262. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
263. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C31-41.
264. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38168-78.
265. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
266. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
267. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
268. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
269. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
270. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.

271. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
272. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 840-6.
273. Ogura, Y., et al., *Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis*. *Gut*, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
274. Lala, S., et al., *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(1): p. 47-57.
275. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
276. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
277. Watanabe, T., et al., *NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(8): p. 800-8.
278. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
279. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. *Science*, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
280. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23729-40.
281. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(2): p. 112-8.
282. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
283. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
284. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
285. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.
286. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
287. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 29-39.
288. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
289. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(6): p. 641-9.
290. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. *J Leukoc Biol*, 1994. **55**(5): p. 662-75.
291. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 307-13.
292. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
293. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 342-7.

294. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
295. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 362-7.
296. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **286**(3): p. G367-76.
297. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(11): p. 1739-47.
298. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
299. Rhee, S.H., et al., *Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13610-5.
300. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 50-65.
301. Baumgart, D.C., et al., *Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells*. *Gut*, 2005. **54**(2): p. 228-36.
302. Papadakis, K.A., et al., *Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4985-90.
303. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
304. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
305. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
306. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
307. Martin, B., et al., *Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3391-8.
308. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
309. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G648-54.
310. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
311. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 701-9.
312. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(43): p. 36099-109.
313. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
314. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(5): p. 720-8.

315. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 1966. **45**(5): p. 391-412.
316. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
317. Kotler, D.P., *Cachexia*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(8): p. 622-34.
318. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. *J Infect Dis*, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
319. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. *Dig Dis Sci*, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
320. Dyer, N.H. and A.M. Dawson, *Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery*. *Br J Surg*, 1973. **60**(2): p. 134-40.
321. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. *Q J Med*, 1972. **41**(164): p. 419-36.
322. Means, R.T., Jr., *Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases*. *Curr Opin Hematol*, 1995. **2**(3): p. 210-3.
323. Schreiber, S., et al., *Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(10): p. 619-23.
324. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 649-63.
325. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. *Dig Dis Sci*, 1989. **34**(9): p. 1457-61.
326. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. *South Med J*, 1981. **74**(3): p. 359-61.
327. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. *Dig Dis Sci*, 1979. **24**(4): p. 282-5.
328. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. **19**(7): p. 757-60.
329. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
330. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. *Lancet*, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
331. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* *Leuk Lymphoma*, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
332. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
333. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
334. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 451-9.
335. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(6): p. 318-25.
336. Steed, H., S. Walsh, and N. Reynolds, *A brief report of the epidemiology of obesity in the inflammatory bowel disease population of Tayside, Scotland*. *Obes Facts*, 2009. **2**(6): p. 370-2.
337. Long, M.D., et al., *Prevalence and epidemiology of overweight and obesity in children with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(10): p. 2162-8.
338. Hou, J.K., B. Abraham, and H. El-Serag, *Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 563-73.

339. Blain, A., et al., *Crohn's disease clinical course and severity in obese patients*. Clin Nutr, 2002. **21**(1): p. 51-7.
340. Lascano, C.A., et al., *Management of ulcerative colitis in the morbidly obese patient: is bariatric surgery indicated?* Obes Surg, 2006. **16**(6): p. 783-6.
341. Teixeira, L.G., et al., *The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 204.
342. Paik, J., et al., *High-fat diet-induced obesity exacerbates inflammatory bowel disease in genetically susceptible Mdr1a^{-/-} male mice*. J Nutr, 2013. **143**(8): p. 1240-7.
343. Bischoff, S.C., *'Gut health': a new objective in medicine?* BMC Med, 2011. **9**: p. 24.
344. Fishman, L., et al., *Increased prevalence of constipation and fecal soiling in a population of obese children*. J Pediatr, 2004. **145**(2): p. 253-4.
345. Zulet, M.A., et al., *Vitamin A intake is inversely related with adiposity in healthy young adults*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2008. **54**(5): p. 347-52.
346. Ozata, M., et al., *Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity*. Clin Biochem, 2002. **35**(8): p. 627-31.
347. Huerta, M.G., et al., *Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children*. Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1175-81.
348. Botella-Carretero, J.I., et al., *Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity*. Clin Nutr, 2007. **26**(5): p. 573-80.
349. Guerrero-Romero, F. and M. Rodriguez-Moran, *Low serum magnesium levels and metabolic syndrome*. Acta Diabetol, 2002. **39**(4): p. 209-13.
350. Liu, S., et al., *Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women*. Diabetes Care, 2005. **28**(12): p. 2926-32.
351. Wortsman, J., et al., *Decreased bioavailability of vitamin D in obesity*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(3): p. 690-3.
352. Sabate, J.M., et al., *High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis*. Obes Surg, 2008. **18**(4): p. 371-7.
353. Schwiertz, A., et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(1): p. 190-5.
354. Amar, J., et al., *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 559-72.
355. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
356. Hampel, H., N.S. Abraham, and H.B. El-Serag, *Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications*. Ann Intern Med, 2005. **143**(3): p. 199-211.
357. Torgerson, J.S., et al., *Gallstones, gallbladder disease, and pancreatitis: cross-sectional and 2-year data from the Swedish Obese Subjects (SOS) and SOS reference studies*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(5): p. 1032-41.
358. Chandrasekharan, B. and S. Srinivasan, *Diabetes and the enteric nervous system*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(12): p. 951-60.
359. Turnbaugh, P.J. and J.I. Gordon, *The core gut microbiome, energy balance and obesity*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 17): p. 4153-8.
360. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
361. Goodrich, J.K., et al., *Human genetics shape the gut microbiome*. Cell, 2014. **159**(4): p. 789-99.
362. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.

363. Greenhill, C., *Nutrition: high-fat diet and dysbiosis accelerate tumorigenesis in mice*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(11): p. 638.
364. Henao-Mejia, J., et al., *Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 179-85.
365. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
366. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *The gut microbiome as therapeutic target*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(2): p. 202-12.
367. Ellekilde, M., et al., *Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5922.
368. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
369. Vrieze, A., et al., *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 913-6 e7.
370. Rabot, S., et al., *Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism*. FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4948-59.
371. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
372. Vors, C., et al., *Postprandial Endotoxemia Linked With Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese Versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(9): p. 3427-35.
373. Jialal, I. and U. Rajamani, *Endotoxemia of metabolic syndrome: a pivotal mediator of meta-inflammation*. Metab Syndr Relat Disord, 2014. **12**(9): p. 454-6.
374. Ghoshal, S., et al., *Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 90-7.
375. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71.
376. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
377. Yoshida, H., et al., *Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells*. J Nutr, 2001. **131**(11): p. 2943-50.
378. Fujiyama, Y., et al., *Butter feeding enhances TNF-alpha production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(11): p. 1838-45.
379. Zhou, L. and J.A. Foster, *Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015. **11**: p. 715-23.
380. Rook, G.A., C.L. Raison, and C.A. Lowry, *Microbiota, immunoregulatory old friends and psychiatric disorders*. Adv Exp Med Biol, 2014. **817**: p. 319-56.
381. Gargano, L.M. and J.M. Hughes, *Microbial origins of chronic diseases*. Annu Rev Public Health, 2014. **35**: p. 65-82.
382. Neufeld, K.A. and J.A. Foster, *Effects of gut microbiota on the brain: implications for psychiatry*. J Psychiatry Neurosci, 2009. **34**(3): p. 230-1.
383. Sellmann, C., et al., *Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(11): p. 1183-92.
384. Pfeffer-Gik, T. and A. Levine, *Dietary clues to the pathogenesis of Crohn's disease*. Dig Dis, 2014. **32**(4): p. 389-94.

385. Berg, R.D. and A.W. Garlington, *Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model*. Infect Immun, 1979. **23**(2): p. 403-11.
386. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?* Surgery, 2002. **131**(3): p. 241-4.
387. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease*. Gut, 2012. **61**(1): p. 78-85.
388. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. Science, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
389. Deitch, E.A., *Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(2): p. 92-8.
390. Brun, P., et al., *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G518-25.
391. van Deventer, S.J., et al., *Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2520-6.
392. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
393. Shen, L., L. Su, and J.R. Turner, *Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 443-9.
394. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 737-43.
395. Verdam, F.J., et al., *Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(12): p. E607-15.
396. Teixeira, T.F., et al., *Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors*. Clin Nutr, 2012. **31**(5): p. 735-40.
397. Brignardello, J., et al., *Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(11-12): p. 1307-14.
398. Johnson, A.M., et al., *High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122195.
399. Stenman, L.K., R. Holma, and R. Korpela, *High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(9): p. 923-9.
400. Ghasemi, A., et al., *Low serum magnesium levels in elderly subjects with metabolic syndrome*. Biol Trace Elem Res, 2010. **136**(1): p. 18-25.
401. Osanai, M., et al., *Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(1): p. 250-8.
402. Pachikian, B.D., et al., *Changes in intestinal bifidobacteria levels are associated with the inflammatory response in magnesium-deficient mice*. J Nutr, 2010. **140**(3): p. 509-14.
403. Sturniolo, G.C., et al., *Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2001. **7**(2): p. 94-8.
404. Zhong, W., et al., *The role of zinc deficiency in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(5): p. G625-33.
405. Zhong, W., et al., *Inactivation of hepatocyte nuclear factor-4{alpha} mediates alcohol-induced downregulation of intestinal tight junction proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(3): p. G643-51.
406. Lambert, J.C., et al., *Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(3): p. 880-6.

407. Kong, J., et al., *Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(1): p. G208-16.
408. Li, Y.C., Y. Chen, and J. Du, *Critical roles of intestinal epithelial vitamin D receptor signaling in controlling gut mucosal inflammation*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015. **148**: p. 179-83.
409. Liu, W., et al., *Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(9): p. 3983-96.
410. Froicu, M. and M.T. Cantorna, *Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury*. *BMC Immunol*, 2007. **8**: p. 5.
411. Wood, R.J., et al., *Intestinal calcium absorption in the aged rat: evidence of intestinal resistance to 1,25(OH)₂ vitamin D*. *Endocrinology*, 1998. **139**(9): p. 3843-8.
412. Fujita, H., et al., *Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 1912-21.
413. Banim, P.J., et al., *The aetiology of symptomatic gallstones quantification of the effects of obesity, alcohol and serum lipids on risk. Epidemiological and biomarker data from a UK prospective cohort study (EPIC-Norfolk)*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **23**(8): p. 733-40.
414. Erlinger, S., *Gallstones in obesity and weight loss*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000. **12**(12): p. 1347-52.
415. Pacchioni, M., et al., *Association of obesity and type II diabetes mellitus as a risk factor for gallstones*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(10): p. 2002-6.
416. Shiffman, M.L., et al., *Gallstones in patients with morbid obesity. Relationship to body weight, weight loss and gallbladder bile cholesterol solubility*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1993. **17**(3): p. 153-8.
417. Lai, Y.S., et al., *Mass-Spectrometry-Based Serum Metabolomics of a C57BL/6J Mouse Model of High-Fat-Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease Development*. *J Agric Food Chem*, 2015. **63**(35): p. 7873-84.
418. Hamada, Y., et al., *The alpha-glucosidase inhibitor miglitol affects bile acid metabolism and ameliorates obesity and insulin resistance in diabetic mice*. *Metabolism*, 2013. **62**(5): p. 734-42.
419. Suzuki, T. and H. Hara, *Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats*. *Nutr Metab (Lond)*, 2010. **7**: p. 19.
420. Lorenzo-Zuniga, V., et al., *Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats*. *Hepatology*, 2003. **37**(3): p. 551-7.
421. Jackson, G.D., Y. Dai, and W.A. Sewell, *Bile mediates intestinal pathology in endotoxemia in rats*. *Infect Immun*, 2000. **68**(8): p. 4714-9.
422. Satoh, Y., et al., *Carbamylcholine- and catecholamine-induced intracellular calcium dynamics of epithelial cells in mouse ileal crypts*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(5): p. 1345-56.
423. Stockinger, S., et al., *Interleukin-13-mediated paneth cell degranulation and antimicrobial peptide release*. *J Innate Immun*, 2014. **6**(4): p. 530-41.
424. Farin, H.F., et al., *Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma*. *J Exp Med*, 2014. **211**(7): p. 1393-405.
425. Ernst, M., et al., *Epithelial gp130/Stat3 functions: an intestinal signaling node in health and disease*. *Semin Immunol*, 2014. **26**(1): p. 29-37.
426. Salzman, N.H. and C.L. Bevins, *Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction*. *Semin Immunol*, 2013. **25**(5): p. 334-41.
427. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 710-20.
428. Ayabe, T., et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(2): p. 113-8.

429. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
430. Hodin, C.M., et al., *Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals*. J Pathol, 2011. **225**(2): p. 276-84.
431. Bertin, B., P. Desreumaux, and L. Dubuquoy, *Obesity, visceral fat and Crohn's disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(5): p. 574-80.
432. Song, M.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 739-45.
433. Ramana, K.V. and S.K. Srivastava, *Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages*. Cytokine, 2006. **36**(3-4): p. 115-22.
434. Ma, Y., et al., *Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 380-7.
435. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer*. JAMA, 1984. **251**(1): p. 73-9.
436. Desreumaux, P., et al., *Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. **117**(1): p. 73-81.
437. Sheehan, A.L., et al., *Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice*. Br J Surg, 1992. **79**(9): p. 955-8.
438. Borley, N.R., et al., *The relationship between inflammatory and serosal connective tissue changes in ileal Crohn's disease: evidence for a possible causative link*. J Pathol, 2000. **190**(2): p. 196-202.
439. John, B.J., et al., *Systematic review: adipose tissue, obesity and gastrointestinal diseases*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(11): p. 1511-23.
440. Talley, N.J., S. Howell, and R. Poulton, *Obesity and chronic gastrointestinal tract symptoms in young adults: a birth cohort study*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(9): p. 1807-14.
441. Das, U.N., *Is obesity an inflammatory condition?* Nutrition, 2001. **17**(11-12): p. 953-66.
442. Park, H.S., J.Y. Park, and R. Yu, *Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **69**(1): p. 29-35.
443. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
444. Reinisch, W., et al., *Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2156-64.
445. Van Kemseke, C., J. Belaiche, and E. Louis, *Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission*. Int J Colorectal Dis, 2000. **15**(4): p. 206-10.
446. Zulian, A., et al., *Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease?* Gut, 2012. **61**(1): p. 86-94.
447. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 6-11.
448. Kiguchi, N., et al., *Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(3): p. 311-5.
449. Zarkesh-Esfahani, H., et al., *Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1809-14.
450. Grunfeld, C., et al., *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2152-7.
451. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.

452. Siegmund, B., et al., *Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 552-60.
453. Busso, N., et al., *Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 875-82.
454. Matarese, G., et al., *Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 5909-16.
455. Sanna, V., et al., *Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 241-50.
456. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-25.
457. Buyse, M., et al., *Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line Caco2-BBE*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 28182-90.
458. Buyse, M., et al., *PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine*. J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1483-94.
459. Tarzi, R.M., et al., *Leptin-deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 385-90.
460. Matarese, G., et al., *Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1356-61.
461. Ryo, M., et al., *Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome*. Circ J, 2004. **68**(11): p. 975-81.
462. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
463. Ouchi, N., et al., *Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(6): p. 561-6.
464. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
465. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 901-11.
466. Ouchi, N., et al., *Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue*. Circulation, 2003. **107**(5): p. 671-4.
467. Maeda, N., et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 731-7.
468. Kim, J.Y., et al., *Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2621-37.
469. Xu, A., et al., *The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice*. J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 91-100.
470. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
471. Pang, T.T. and P. Narendran, *The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 143-5.
472. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages*. Circulation, 2001. **103**(8): p. 1057-63.
473. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
474. Kumada, M., et al., *Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages*. Circulation, 2004. **109**(17): p. 2046-9.
475. Ohashi, K., et al., *Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6153-60.

476. Fantuzzi, G., *Adiponectin and inflammation: consensus and controversy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2): p. 326-30.
477. Aprahamian, T., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone ameliorates murine lupus by induction of adiponectin*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 340-6.
478. Olivier, I., et al., *Modifications of mesenteric adipose tissue during moderate experimental colitis in mice*. Life Sci, 2014. **94**(1): p. 1-7.
479. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
480. Yamamoto, K., et al., *Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(6): p. 789-96.
481. Tsang, J.Y., et al., *Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(5): p. 604-9.
482. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
483. Banerjee, R.R., et al., *Regulation of fasted blood glucose by resistin*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1195-8.
484. Qi, Y., et al., *Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3083-90.
485. Steppan, C.M., et al., *Activation of SOCS-3 by resistin*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1569-75.
486. Heilbronn, L.K., et al., *Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(4): p. 1844-8.
487. Lee, J.H., et al., *Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 4848-56.
488. Savage, D.B., et al., *Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans*. Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2199-202.
489. Lehrke, M., et al., *An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans*. PLoS Med, 2004. **1**(2): p. e45.
490. Verma, S., et al., *Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction*. Circulation, 2003. **108**(6): p. 736-40.
491. Kawanami, D., et al., *Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): p. 415-9.
492. Paul, G., et al., *Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(6): p. 471-7.
493. Ernst, M.C. and C.J. Sinal, *Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(11): p. 660-7.
494. Sell, H., et al., *Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2731-40.
495. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28175-88.
496. Parlee, S.D., et al., *Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α* . Endocrinology, 2010. **151**(6): p. 2590-602.
497. Buechler, C., *Chemerin, a novel player in inflammatory bowel disease*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(4): p. 315-6.
498. Lin, Y., et al., *Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(4): p. 355-66.

499. Moschen, A.R., et al., *Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1748-58.
500. Boucher, J., et al., *Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1764-71.
501. Yu, S., et al., *Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients*. Chin Med J (Engl), 2012. **125**(19): p. 3440-4.
502. Daviaud, D., et al., *TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1528-30.
503. Han, S., et al., *Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD*. Regul Pept, 2007. **142**(3): p. 131-7.
504. Gorska, E., et al., *Leptin receptors*. Eur J Med Res, 2010. **15 Suppl 2**: p. 50-4.
505. Wang, M.Y., et al., *A novel leptin receptor isoform in rat*. FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 87-90.
506. Ghilardi, N. and R.C. Skoda, *The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(4): p. 393-9.
507. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
508. Eyckerman, S., et al., *Analysis of Tyr to Phe and fa/fa leptin receptor mutations in the PC12 cell line*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(4): p. 549-56.
509. Bates, S.H., et al., *STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction*. Nature, 2003. **421**(6925): p. 856-9.
510. Cui, Y., et al., *Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 258-69.
511. Gao, Q., et al., *Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4661-6.
512. Starr, R., et al., *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 917-21.
513. Bjorbaek, C., et al., *Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 619-25.
514. Bjorbaek, C., et al., *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30059-65.
515. Bjorbaek, C., et al., *SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40649-57.
516. Zhang, E.E., et al., *Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 16064-9.
517. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 655-63.
518. Leever, S.J., B. Vanhaesebroeck, and M.D. Waterfield, *Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 219-25.
519. Kim, M.S., et al., *Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis*. Nat Neurosci, 2006. **9**(7): p. 901-6.
520. Kitamura, T., et al., *Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake*. Nat Med, 2006. **12**(5): p. 534-40.
521. Matsuzaki, H., et al., *Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11285-90.
522. Tang, E.D., et al., *Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16741-6.
523. Cota, D., et al., *Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake*. Science, 2006. **312**(5775): p. 927-30.
524. Blouet, C., H. Ono, and G.J. Schwartz, *Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis*. Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 459-67.

525. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.
526. Buettner, C., et al., *Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms*. Nat Med, 2008. **14**(6): p. 667-75.
527. Durant, L., et al., *Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 605-15.
528. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
529. Liu, X., et al., *Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6070-6.
530. Chaudhry, A., et al., *CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner*. Science, 2009. **326**(5955): p. 986-91.
531. Sanseverino, I., et al., *STAT3-silenced human dendritic cells have an enhanced ability to prime IFN γ production by both alphabeta and gammadelta T lymphocytes*. Immunobiology, 2014. **219**(7): p. 503-11.
532. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
533. Niemand, C., et al., *Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3263-72.
534. Li, Y., et al., *New insights into the role of STAT3 in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(6): p. 1177-83.
535. Zindl, C.L., et al., *IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(31): p. 12768-73.
536. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
537. Iwasaki, Y., et al., *Interleukin-27 in T Cell Immunity*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 2851-2863.
538. Booth, D. and C.S. Potten, *Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(29): p. 16-20.
539. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
540. Mudter, J., et al., *Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(1): p. 64-72.
541. Ferguson, L.R., et al., *Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population*. Mutat Res, 2010. **690**(1-2): p. 108-15.
542. Sobhani, I., et al., *Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach*. Gut, 2000. **47**(2): p. 178-83.
543. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
544. Sitaraman, S., et al., *Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD*. FASEB J, 2004. **18**(6): p. 696-8.
545. Wang, C., et al., *Secretion of leptin throughout pregnancy and early postpartum period in Japanese monkeys: placenta as another potential source of leptin*. Endocrine, 2005. **27**(1): p. 75-81.
546. Cammisotto, P. and M. Bendayan, *A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone*. Anat Cell Biol, 2012. **45**(1): p. 1-16.
547. Cammisotto, P.G., et al., *Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(2): p. G242-9.

548. Cammisotto, P.G., et al., *Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(7): p. 851-60.
549. Cinti, S., et al., *Leptin in the human stomach*. Gut, 2001. **49**(1): p. 155.
550. Barrenetxe, J., et al., *Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes*. Gut, 2002. **50**(6): p. 797-802.
551. Rajala, M.W., et al., *Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice*. Endocrinology, 2014. **155**(3): p. 748-57.
552. Asakawa, A., et al., *Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1287-92.
553. Kiely, J.M., et al., *Altered intestinal motility in leptin-deficient obese mice*. J Surg Res, 2005. **124**(1): p. 98-103.
554. Martinez, V., et al., *Intracerebroventricular leptin inhibits gastric emptying of a solid nutrient meal in rats*. Neuroreport, 1999. **10**(15): p. 3217-21.
555. Barrachina, M.D., et al., *Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10455-60.
556. Guilmeau, S., et al., *Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1664-72.
557. Gaige, S., A. Abysique, and M. Bouvier, *Effects of leptin on cat intestinal motility*. J Physiol, 2003. **546**(Pt 1): p. 267-77.
558. Ducroc, R., et al., *Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 348-54.
559. Sakar, Y., et al., *Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7935.
560. Hindlet, P., et al., *Long-term effect of leptin on H⁺-coupled peptide cotransporter 1 activity and expression in vivo: evidence in leptin-deficient mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(1): p. 192-201.
561. Nduati, V., et al., *Leptin transcriptionally enhances peptide transporter (hPepT1) expression and activity via the cAMP-response element-binding protein and Cdx2 transcription factors*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1359-73.
562. Hindlet, P., et al., *Reduced intestinal absorption of dipeptides via PepT1 in mice with diet-induced obesity is associated with leptin receptor down-regulation*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 6801-8.
563. Kiely, J.M., et al., *Altered small intestinal absorptive enzyme activities in leptin-deficient obese mice: influence of bowel resection*. J Pediatr Surg, 2006. **41**(7): p. 1243-9.
564. Doi, T., et al., *Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **281**(3): p. R753-9.
565. Stan, S., et al., *Effect of human recombinant leptin on lipid handling by fully differentiated Caco-2 cells*. FEBS Lett, 2001. **508**(1): p. 80-4.
566. Hoda, M.R., et al., *Apical leptin induces chloride secretion by intestinal epithelial cells and in a rat model of acute chemotherapy-induced colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(5): p. G714-21.
567. FitzGerald, A.J., N. Mandir, and R.A. Goodlad, *Leptin, cell proliferation and crypt fission in the gastrointestinal tract of intravenously fed rats*. Cell Prolif, 2005. **38**(1): p. 25-33.
568. Hardwick, J.C., et al., *Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells*. Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 79-90.
569. Wolinski, J., et al., *Exogenous leptin controls the development of the small intestine in neonatal piglets*. J Endocrinol, 2003. **177**(2): p. 215-22.
570. Sukhotnik, I., et al., *Leptin affects intestinal epithelial cell turnover in correlation with leptin receptor expression along the villus-crypt axis after massive small bowel resection in a rat*. Pediatr Res, 2009. **66**(6): p. 648-53.

571. Sukhotnik, I., et al., *Effect of leptin on intestinal re-growth following massive small bowel resection in rat*. *Pediatr Surg Int*, 2006. **22**(1): p. 9-15.
572. Kiely, J.M., et al., *Impaired intestinal cell proliferation and cell death in leptin-deficient obese mice*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2005. **29**(1): p. 30-5.
573. Liu, Z., et al., *High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin*. *Int J Oncol*, 2001. **19**(5): p. 1009-14.
574. Hong, S.J., et al., *Variation in expression of gastric leptin according to differentiation and growth pattern in gastric adenocarcinoma*. *Cytokine*, 2006. **33**(2): p. 66-71.
575. Aparicio, T., et al., *Leptin stimulates the proliferation of human colon cancer cells in vitro but does not promote the growth of colon cancer xenografts in nude mice or intestinal tumorigenesis in Apc(Min/+) mice*. *Gut*, 2005. **54**(8): p. 1136-45.
576. Tessitore, L., et al., *Leptin expression in colorectal and breast cancer patients*. *Int J Mol Med*, 2000. **5**(4): p. 421-6.
577. Koda, M., et al., *Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(8): p. 902-6.
578. Bolukbas, F.F., et al., *Serum leptin concentration and advanced gastrointestinal cancers: a case controlled study*. *BMC Cancer*, 2004. **4**: p. 29.
579. Aparicio, T., et al., *Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 499-510.
580. Hirose, Y., et al., *Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(5): p. 821-5.
581. Abolhassani, M., et al., *Leptin receptor-related immune response in colorectal tumors: the role of colonocytes and interleukin-8*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9423-32.
582. Aloulou, N., et al., *Involvement of the leptin receptor in the immune response in intestinal cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9413-22.
583. Citalan-Madrid, A.F., et al., *Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms*. *Tissue Barriers*, 2013. **1**(5): p. e26938.
584. Ivanov, A.I., C.A. Parkos, and A. Nusrat, *Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation*. *Am J Pathol*, 2010. **177**(2): p. 512-24.
585. Marie, C.S., et al., *Leptin protects host cells from Entamoeba histolytica cytotoxicity by a STAT3-dependent mechanism*. *Infect Immun*, 2012. **80**(5): p. 1934-43.
586. Duggal, P., et al., *A mutation in the leptin receptor is associated with Entamoeba histolytica infection in children*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(3): p. 1191-8.
587. Guo, X., et al., *Leptin signaling in intestinal epithelium mediates resistance to enteric infection by Entamoeba histolytica*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(3): p. 294-303.
588. Plaisancie, P., et al., *Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cells in the large bowel*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G805-12.
589. El Homsy, M., et al., *Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting PKC, PI3K, and MAPK pathways*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G365-73.
590. Tanigawa, T., et al., *Leptin promotes gastric ulcer healing via upregulation of vascular endothelial growth factor*. *Digestion*, 2010. **81**(2): p. 86-95.
591. Adeyemi, E.O., et al., *Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(27): p. 4154-60.
592. Tasdelen, A., et al., *Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats*. *Hepatogastroenterology*, 2004. **51**(58): p. 994-7.
593. Mastronardi, C.A., W.H. Yu, and S.M. McCann, *Resting and circadian release of nitric oxide is controlled by leptin in male rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(8): p. 5721-6.
594. Kimura, K., et al., *Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **273**(2): p. 745-9.

595. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
596. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. Unit 15 25.
597. Park, H.K. and R.S. Ahima, *Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism*. *Metabolism*, 2015. **64**(1): p. 24-34.
598. Kielland, A., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(6): p. 760-6.
599. Asghar, M.N., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in murine colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(8): p. 1435-47.
600. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 645-57.
601. Welch, C.L. and D.S. Young, *Spectrophotometry of occult blood in feces*. *Clin Chem*, 1983. **29**(12): p. 2022-5.
602. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
603. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
604. Vilaseca, J., et al., *Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis*. *Gut*, 1990. **31**(5): p. 539-44.
605. Viennois, E., et al., *Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA*. *BMC Res Notes*, 2013. **6**: p. 360.
606. Sonnenberg, G.F., et al., *Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1321-5.
607. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
608. Zucker, L.M., Zucker, T.F., *Fatty, a new mutation in the rat*. *J. Hered.*, 1961. **52**: p. 275-278.
609. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
610. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
611. Clapper, M.L., H.S. Cooper, and W.C. Chang, *Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions*. *Acta Pharmacol Sin*, 2007. **28**(9): p. 1450-9.
612. Reis, B.S., et al., *Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation*. *J Immunol*, 2015. **194**(11): p. 5253-60.
613. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
614. Pardo, M., et al., *Peripheral leptin and ghrelin receptors are regulated in a tissue-specific manner in activity-based anorexia*. *Peptides*, 2010. **31**(10): p. 1912-9.
615. Havel, P.J., *Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. **226**(11): p. 963-77.
616. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nat Med*, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
617. Pellemounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
618. Connelly, T.M., et al., *Volumetric fat ratio and not body mass index is predictive of ileocollectomy outcomes in Crohn's disease patients*. *Dig Surg*, 2014. **31**(3): p. 219-24.

619. Fink, C., et al., *Adipose tissue and inflammatory bowel disease pathogenesis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(8): p. 1550-7.
620. Pereira, S.S. and J.I. Alvarez-Leite, *Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes*. *Curr Obes Rep*, 2014. **3**(4): p. 422-31.
621. Mraz, M. and M. Haluzik, *The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation*. *J Endocrinol*, 2014. **222**(3): p. R113-27.
622. Hass, D.J., et al., *The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(4): p. 482-8.
623. Middleton, J.P., et al., *Vitamin D status and bone mineral density in African American children with Crohn disease*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013. **57**(5): p. 587-93.
624. Uko, V., et al., *Impact of abdominal visceral adipose tissue on disease outcome in pediatric Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(12): p. 2286-91.
625. Kaser, A. and H. Tilg, *"Metabolic aspects" in inflammatory bowel diseases*. *Curr Drug Deliv*, 2012. **9**(4): p. 326-32.
626. Ahn, L.B., et al., *Crohn's disease after gastric bypass surgery for morbid obesity: is there an association?* *Inflamm Bowel Dis*, 2005. **11**(6): p. 622-4.
627. Boutros, M. and D. Maron, *Inflammatory bowel disease in the obese patient*. *Clin Colon Rectal Surg*, 2011. **24**(4): p. 244-52.
628. Mendall, M.A., et al., *Is obesity a risk factor for Crohn's disease?* *Dig Dis Sci*, 2011. **56**(3): p. 837-44.
629. Karmiris, K., I.E. Koutroubakis, and E.A. Kouroumalis, *Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin--implications for inflammatory bowel disease*. *Mol Nutr Food Res*, 2008. **52**(8): p. 855-66.
630. Franco-Pons, N., et al., *Fat necrosis generates proinflammatory halogenated lipids during acute pancreatitis*. *Ann Surg*, 2013. **257**(5): p. 943-51.
631. Mustain, W.C., et al., *Inflammatory cytokine gene expression in mesenteric adipose tissue during acute experimental colitis*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83693.
632. Karmiris, K., et al., *Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(2): p. 100-5.
633. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* *Gut*, 2007. **56**(4): p. 577-83.
634. Waluga, M., et al., *Serum adipokines in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(22): p. 6912-7.
635. Faggioni, R., K.R. Feingold, and C. Grunfeld, *Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition*. *FASEB J*, 2001. **15**(14): p. 2565-71.
636. Barbier, M., et al., *Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats*. *Gut*, 1998. **43**(6): p. 783-90.
637. Ozata, M., I.C. Ozdemir, and J. Licinio, *Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(10): p. 3686-95.
638. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. *J Leukoc Biol*, 2000. **68**(4): p. 437-46.
639. Mackey-Lawrence, N.M. and W.A. Petri, Jr., *Leptin and mucosal immunity*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(5): p. 472-9.
640. La Cava, A. and G. Matarese, *The weight of leptin in immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 371-9.
641. Sanchez de Medina, F., et al., *Intestinal inflammation and mucosal barrier function*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(12): p. 2394-404.

642. Wang, H., et al., *Intestinal dysbacteriosis contributes to decreased intestinal mucosal barrier function and increased bacterial translocation*. Lett Appl Microbiol, 2014. **58**(4): p. 384-92.
643. Meng, J., et al., *Morphine induces bacterial translocation in mice by compromising intestinal barrier function in a TLR-dependent manner*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54040.
644. Zareie, M., et al., *Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress*. Gut, 2006. **55**(11): p. 1553-60.
645. Natividad, J.M. and E.F. Verdu, *Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications*. Pharmacol Res, 2013. **69**(1): p. 42-51.
646. Mazen, I., et al., *Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity*. Mol Genet Metab, 2011. **102**(4): p. 461-4.
647. Bluher, S., S. Shah, and C.S. Mantzoros, *Leptin deficiency: clinical implications and opportunities for therapeutic interventions*. J Investig Med, 2009. **57**(7): p. 784-8.
648. Farooqi, I.S., et al., *Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor*. N Engl J Med, 2007. **356**(3): p. 237-47.
649. Clement, K., et al., *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 398-401.
650. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-8.
651. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: A pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-2025.
652. Sennello, J.A., et al., *Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice*. Cytokine, 2006. **36**(5-6): p. 261-6.
653. Siegmund, B., *Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice*. Gut, 2004. **53**(7): p. 965-972.
654. Singh, U.P., et al., *Leptin antagonist ameliorates chronic colitis in IL-10(-)/(-) mice*. Immunobiology, 2013. **218**(12): p. 1439-51.
655. Siegmund, B., et al., *Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(4): p. 782-6.
656. Cakir, B., et al., *The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids*. Peptides, 2004. **25**(1): p. 95-104.
657. Tschop, J., et al., *CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis*. J Neurosci, 2010. **30**(17): p. 6036-47.
658. Le Drean, G., et al., *Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway*. Faseb j, 2014. **28**(3): p. 1059-70.
659. Naylor, C., et al., *Leptin receptor mutation results in defective neutrophil recruitment to the colon during Entamoeba histolytica infection*. MBio, 2014. **5**(6).
660. Madan, R., et al., *Role of leptin-mediated colonic inflammation in defense against Clostridium difficile colitis*. Infect Immun, 2014. **82**(1): p. 341-9.
661. Palmen, M.J., et al., *Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis*. Clin Exp Immunol, 1995. **99**(2): p. 226-232.
662. Peinado-Onsurbe, J., et al., *Effect of 24-h food deprivation on lipoprotein composition and oleoyl-estrone content of lean and obese Zucker rats*. Eur J Nutr, 2001. **40**(4): p. 155-60.
663. Pereira, C.D., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: relevance of its modulation in the pathophysiology of obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(10): p. 869-81.
664. DeBoer, M.D., Y. Li, and S. Cohn, *Colitis causes delay in puberty in female mice out of proportion to changes in leptin and corticosterone*. J Gastroenterol, 2010. **45**(3): p. 277-84.

665. Deiteren, A., et al., *The effect of chemically induced colitis, psychological stress and their combination on visceral pain in female Wistar rats*. *Stress*, 2014. **17**(5): p. 431-44.
666. Giovambattista, A., et al., *Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration*. *Neuroendocrinology*, 2000. **72**(6): p. 341-9.
667. Roubos, E.W., et al., *Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis*. *Gen Comp Endocrinol*, 2012. **177**(1): p. 28-36.
668. Stieg, M.R., et al., *Leptin: A hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology*. *Psychoneuroendocrinology*, 2015. **51**: p. 47-57.
669. Rivero-Gutierrez, B., et al., *Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting*. *Anal Biochem*, 2014. **467**: p. 1-3.
670. Suzuki, T., K. Ikeda, and T. Tomono, *Physicochemical and biological properties of poly(ethylene glycol)-coupled immunoglobulin G. Part II. Effect of molecular weight of poly(ethylene glycol)*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1989. **1**(2): p. 71-84.
671. Suzuki, T., et al., *Physicochemical and biological properties of poly(ethylene glycol)-coupled immunoglobulin G*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **788**(2): p. 248-55.
672. Monfardini, C., et al., *A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification*. *Bioconj Chem*, 1995. **6**(1): p. 62-9.
673. Bailon, P., W.J. Fung, and J.E. Porter, *Strategies for the preparation and characterization of polyethylene glycol (PEG) conjugated pharmaceutical proteins*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1997. **213**: p. 183-POLY.
674. Bell, C.J., D.G. Gall, and J.L. Wallace, *Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(4 Pt 1): p. G622-30.
675. Gaudio, E., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects*. *Dig Dis Sci*, 1999. **44**(7): p. 1458-75.
676. Pérez-Navarro, R., et al., *Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis*. *Life Sciences*, 2005. **76**: p. 1489-1501.
677. Axelsson, L.G., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice*. *Inflamm Res*, 1996. **45**(4): p. 181-91.
678. Fiorucci, S., et al., *Importance of innate immunity and collagen binding integrin alpha1beta1 in TNBS-induced colitis*. *Immunity*, 2002. **17**(6): p. 769-80.
679. Fiorucci, S., et al., *A beta-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(44): p. 15736-41.
680. Gaillard, R.C., et al., *Cytokines, leptin, and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **917**: p. 647-57.
681. Perez-Navarro, R., et al., *Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis*. *Life Sci*, 2005. **76**(13): p. 1489-501.
682. Jacobson, K., K. McHugh, and S.M. Collins, *Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(3): p. 718-22.
683. Singh, U.P., et al., *The emerging role of leptin antagonist as potential therapeutic option for inflammatory bowel disease*. *Int Rev Immunol*, 2014. **33**(1): p. 23-33.