

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Programa Oficial de Posgrado en Inmunología



**IMPLICACIÓN DE LA FOSFATASA ALCALINA
EN LA INFLAMACIÓN INTESTINAL**

Tesis Doctoral

Patricia Martínez-Moya Bernal

2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Patricia Martínez Moyal Bernal
D.L.: GR 621-2014
ISBN: 978-84-9028-847-4

La doctoranda Patricia Martínez-Moya Bernal y los directores de la tesis M^a Dolores Suárez Ortega, Olga Martínez Augustin y Fermín Sánchez de Medina López-Huertas, 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.

Y, a los efectos legales, se firma la siguiente constancia en Granada, a 17 de julio de 2013.

Dra. M^a Dolores Suárez Ortega

Dra. Olga Martínez Augustin

Dr. Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Patricia Martínez-Moya Bernal

D. Alberto Vargas Morales, Profesor Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada, certifica que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Implicación de la fosfatasa alcalina en la inflamación intestinal” ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia Patricia Martínez-Moya Bernal en los laboratorios de este departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 17 de julio de 2013.

Dr. Alberto Vargas Morales

Dña. María Dolores Suárez Ortega, Profesora Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II y Vicerrectora de Investigación de la Universidad de Granada, Dña. Olga Martínez Augustin, Profesora Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada y D. Fermín Sánchez de Medina López-Huertas, Profesor Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como directores, certifican que la Tesis Doctoral “Implicación de la fosfatasa alcalina en la inflamación intestinal”, realizada por la Licenciada en Farmacia Patricia Martínez-Moya Bernal, ha sido llevada a cabo bajo su dirección y reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser defendida y optar al grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 17 de julio de 2013.

Dra. María Dolores Suárez Ortega

Dra. Olga Martínez Augustin

Dr Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

RESUMEN

La fosfatasa alcalina es una enzima “clásica”, conocida desde antiguo a nivel puramente bioquímico, pero también clínico. Por ejemplo, la determinación de los niveles plasmáticos para la detección de colestasis es harto conocida, así como su presencia en múltiples tejidos y tipos celulares, que de hecho le confieren un carácter prácticamente ubicuo. Además, la AP es una enzima muy antigua desde el punto de vista filogenético, puesto que está presente no sólo en el hombre, sino en mamíferos, vertebrados e incluso bacterias. Resulta sorprendente, por tanto, que hasta hace pocos años no se supiera prácticamente nada sobre la función desempeñada por esta enzima [1].

La fosfatasa alcalina (AP) de mamíferos (*orthophosphoric monoester phosphohydrolase-alkaline optimum*, EC 3.1.3.1) es una familia de enzimas (glucoproteínas) que hidrolizan moléculas de fosfato a pH alcalino. Al menos 4 isoformas de AP se han descrito en humanos, la no específica de tejido (TNAP) o isoforma de hueso/hígado/riñón (BAP/LAP/KAP), además de la intestinal (IAP), la de placenta y la de células germinales, que se expresan predominantemente en estos tejidos. La isoforma IAP se expresa en intestino delgado mientras que la TNAP se expresa en intestino grueso [2]. La isoforma TNAP está codificada por un solo gen que da lugar a las isoformas de hígado, hueso y riñón, que difieren a nivel de ARN mensajero (ARNm), ya que el primer exón es distinto en la isoforma ósea (exón 1A) y en las de hígado y riñón (exón 1B) [3, 4]. No obstante, la composición en aminoácidos de las 3 isoformas es idéntica, ya que el primer exón no se traduce. Además, hay diferencias entre estas isoformas en cuanto a sus sensibilidad a inhibidores químicos y al calor, que se atribuyen a diferencias en sus patrones de glucosilación [5]. De hecho, la forma hepática es más resistente a la inhibición por levamisol u homoarginina que las formas riñón y ósea. Las isoformas de placenta e intestinal tienen una similitud del 87-90% a nivel genómico y muestran en general analogías en cuanto a sus sensibilidad a inhibidores químicos [6-8]. Al igual que estas, la forma hepática es resistente al levamisol.

La AP se localiza en la membrana del borde del cepillo del intestino y no ha tenido ninguna función conocida en el intestino hasta hace poco, a pesar de que tradicionalmente se le ha asignado un papel difuso en el transporte intestinal de lípidos y nucleótidos [9, 10]. De hecho, los ratones *knock-out* de IAP presentan una mayor absorción de grasa, pero ninguna

alteración de importancia [11]. La IAP se localiza en partículas lipídicas en el intestino [12]. Por el contrario, la supresión de la TNAP en ratones conduce a la muerte postnatal temprana, por razones no relacionadas con el intestino, aunque estos animales sí presentan alteraciones en la fisiología intestinal [13]. Posteriormente el LPS ha sido identificado como sustrato de la AP [14] y se ha descrito que en ratones *knock-out* de IAP se produce una mayor translocación bacteriana después de episodios de isquemia-reperfusión [15]. Se ha sugerido también que la AP podría tener una función protectora, sustentada por el efecto nocivo del levamisol, un inhibidor de la AP administrado a ratas infectadas con *E. coli* por vía intraperitoneal.

La denominada enfermedad inflamatoria intestinal (EII) hace referencia a dos enfermedades distintas aunque ampliamente relacionadas entre sí, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa [16]. Ambas tienen en común el ser enfermedades inflamatorias del intestino de carácter crónico y recurrente, de tratamiento difícil y cuya etiología es esencialmente desconocida [17]. La incidencia de la EII está en aumento, en especial en España [18, 19] y en general en los países desarrollados. Aunque, como se ha mencionado, se desconoce la etiología de la EII, parece claro que la flora intestinal es determinante en el desarrollo de los acontecimientos que dan lugar a las recaídas. De hecho, se cree que la EII es consecuencia de una respuesta exacerbada e incontrolada a antígenos lumbinales que son inocuos para la población normal.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron la inducción de la actividad AP en diferentes modelos de colitis experimental en rata y ratón [20]. Todos los modelos de inflamación colónica e ileal que se examinaron, caracterizados por un significativo estrés oxidativo e infiltración leucocitaria, dieron lugar a un incremento en la actividad AP en colon (e íleon en el modelo de ileítis). El incremento de la sensibilidad a los inhibidores levamisol y homoarginina, junto con los cambios aparentes en el tamaño molecular y en la sialización de la enzima, apuntaban a un cambio de isoforma, presumiblemente de la forma hepática a la renal. De hecho, se observó un incremento de la expresión de TNAP mediante Western blot.

En consecuencia, existe un incremento de expresión de TNAP en el intestino inflamado que está asociado a un cambio de isoforma dentro de este tipo enzimático, concretamente de la forma hepática (resistente a

levamisol y homoarginina) a la renal u ósea. Este cambio es achacable en parte a la infiltración de neutrófilos y posiblemente otros leucocitos, que expresan este tipo de AP, pero también a una modulación de la expresión que tiene lugar en el epitelio. Se trata por tanto de un marcador de inflamación intestinal. Además, experimentos *in vivo* utilizando el modelo de colitis inducida por TNBS en rata pusieron de manifiesto que el tratamiento con levamisol o con el anticuerpo monoclonal B4-78 tenían cierto carácter protector, lo que sugería un posible papel patológico.

Basado en estos datos, nuestro primer objetivo fue caracterizar el efecto del estrés oxidativo sobre la AP en el epitelio intestinal. Una vez caracterizado, decidimos estudiar el efecto terapéutico de la administración de IAP en modelos de colitis experimental y finalmente obtuvimos unos ratones heterocitogotos para la expresión de TNAP, que utilizamos para caracterizar la implicación de dicha isoforma no sólo en la EI sino también en la mucositis y en la infección bacteriana intestinal.

En una primera aproximación, se estudió el efecto sobre la actividad AP de varios estímulos oxidantes en líneas celulares en cultivo de epitelio intestinal (CACO-2, IEC-18, HT-29 y T-89) *in vitro*. La adición a estas células de terbutilhidroperóxido, peróxido de hidrógeno y monocloramina, provocó un incremento de la actividad AP, que estuvo asociado a un incremento a la sensibilidad a levamisol, homoarginina y al calor. Así mismo se estudió el estado de la glucosilación utilizando inhibidores como la tunicamicina y se estudió el estado de activación de las vías de señalización de las MAPK, NF- κ B, AMPc y calcio. Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos concluir que la TNAP es inducida en células del epitelio intestinal en condiciones de inflamación/estrés celular, por un mecanismo que implica principalmente cambios en el patrón de glucosilación, con un papel menor, si acaso, de variaciones en la transcripción/traducción.

Para llevar a cabo el segundo objetivo indujimos colitis mediante la administración de ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) en ratas. En este caso, el tratamiento con IAP da lugar a la protección frente a la colitis experimental en ratas, asociada a una menor translocación bacteriana. Paralelamente, se realizaron varios modelos de colitis experimental, tanto inducida por TNBS como por la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) en los que se valoró la actividad AP colónica así como la actividad AP en heces y otros parámetros inflamatorios. Tras estos experimentos

podemos concluir que el colon inflamado de distintos modelos animales de colitis expresa mayores niveles de AP, los cuales se deben al incremento de TNAP del tipo renal u oseo, no de IAP y que la colitis experimental en ratas aumenta actividad fosfatasa alcalina luminal, debido a un incremento de TNAP.

El empleo de ratones heterocigotos para la expresión de TNAP nos ha permitido estudiar su implicación en la inflamación intestinal. Para ello llevamos a cabo 4 modelos de colitis experimental (TNBS, DSS agudo, DSS crónico y transferencia linfocitaria), 2 modelos de infección bacteriana intestinal (*Citrobacter rodentium* y *Salmonella Typhimurium*) y un modelo de mucositis gastrointestinal inducida por la administración de 5-fluorouracilo (5-FU).

A diferencia de los ratones IAP^{-/-}, los ratones TNAP^{+/-} son claramente más susceptibles a la inducción de colitis por DSS, tanto en el protocolo agudo como en el crónico, así como por TNBS. Este fenómeno fue muy consistente y claro, por lo que consideremos que los datos son plenamente representativos.

En lo que respecta a los dos modelos de infección, los resultados contrastan abiertamente con los obtenidos en los modelos de inflamación, puesto que en este caso los ratones TNAP^{+/-} resultan ser más susceptibles, de forma comparable a lo que se ha observado en ratones IAP^{-/-} [15].

En el modelo de mucositis por 5-FU se observaron diferencias interesantes entre los ratones TNAP^{+/-} y sus respectivos controles, ya que la neutrofilia característica de la mucositis no llegó a producirse en los ratones TNAP^{+/-}.

Podemos concluir que la delección genética de un alelo de la TNAP tiene importantes efectos en la respuesta a estímulos colitogénicos e infección de carácter opuesto: disminuye la susceptibilidad a la colitis mientras que aumenta la sensibilidad a la infección por *S. Typhimurium* y *C. rodentium*.

1. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
2. Eliakim, R., et al., *Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. G425-34.
3. Matsuura, S., F. Kishi, and T. Kajii, *Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 993-1000.
4. Weiss, M.J., et al., *Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7182-6.
5. Martins, M.J., M.R. Negrao, and C. Hipolito-Reis, *Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated*. Clin Biochem, 2001. **34**(6): p. 463-8.
6. Henthorn, P.S., et al., *Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 12011-9.
7. Mulivor, R.A., L.I. Plotkin, and H. Harris, *Differential inhibition of the products of the human alkaline phosphatase loci*. Ann Hum Genet, 1978. **42**(1): p. 1-13.
8. Ali, N.N., J. Rowe, and N.M. Teich, *Constitutive expression of non-bone/liver/kidney alkaline phosphatase in human osteosarcoma cell lines*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(4): p. 512-20.
9. Young, G.P., et al., *Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum*. Am J Physiol, 1981. **241**(6): p. G461-8.
10. Eliakim, R., et al., *Sulphydryl blocker-induced rat colitis is ameliorated by intravenous injection of antibody to colonic surfactant-like particle*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(1): p. 16-23.
11. Nakano, T., et al., *Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(1): p. G207-14.
12. Mahmood, A., J.S. Shao, and D.H. Alpers, *Rat enterocytes secrete SLPs containing alkaline phosphatase and cubilin in response to corn oil feeding*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(2): p. G433-41.
13. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 432-46.

14. Poelstra, K., et al., *Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1163-9.
15. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3551-6.
16. Korzenik, J.R. and D.K. Podolsky, *Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 197-209.
17. Sands, B.E., *Inflammatory bowel disease: past, present, and future*. J Gastroenterol, 2007. **42**(1): p. 16-25.
18. Pajares, J.M. and J.P. Gisbert, *Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review*. Rev Esp Enferm Dig, 2001. **93**(1): p. 9-20.
19. Lopez San Roman, A. and F. Bermejo, *Inflammatory bowel disease in Spain: problems grow*. Rev Esp Enferm Dig, 2004. **96**(5): p. 291-6.
20. 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.

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	3
I. FOSFATASA ALCALINA	5
1. Generalidades.....	5
2. Genética.....	5
2.1. Genes de la fosfatasa alcalina.....	5
2.2. Expresión génica.....	8
2.3. Regulación génica.....	9
3. Estructura y dominios funcionales.....	10
3.1. Estructura tridimensional.....	10
3.2. Modificaciones post-transcripcionales.....	12
3.2.1. Glicosilación.....	12
3.2.2. Localización ectoplásmica.....	13
4. Propiedades enzimáticas.....	14
4.1. Inhibición enzimática.....	14
4.2. Especificidad de sustrato.....	14
5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)	15
6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)	18
7. Importancia clínica de la fosfatasa alcalina.....	19
II. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	21
1. Generalidades.....	21

2. Epidemiología.....	22
3. Etiología y factores de riesgo.....	23
3.1. Factores genéticos.....	24
3.2. Factores ambientales.....	27
3.3. Factores inmunológicos.....	33
4. Fisiopatología.....	34
5. Vías de señalización implicadas en la EII.....	38
5.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB)	38
5.2. Mitogen-activated protein kinasas (MAPK)	40
5.3. JAK-STAT.....	41
5.4. PPAR-γ.....	41
6. Tratamiento de la EII.....	42
6.1. Tratamiento farmacológico.....	42
6.1.1. Aminosalicilatos.....	42
6.1.2. Antibióticos.....	43
6.1.3. Glucocorticoides.....	43
6.1.4. Tiopurinas.....	44
6.1.5. Metotrexato.....	45
6.1.6. Inhibidores de la calcineurina: ciclosporina y tacrólimo.....	46
6.1.7. Terapia biológica: terapia anti-TNF-α.....	46
6.2. Tratamiento nutricional.....	47
6.3. Tratamiento quirúrgico.....	47
6.4. Otros tratamientos.....	47
6.4.1. Abandonar el hábito tabáquico.....	48

6.4.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	48
6.4.3. Terapia génica.....	48
7. Modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal.....	48
7.1. Inducidos químicamente.....	48
7.1.1. Colitis inducida por ácido acético.....	48
7.1.2. Colitis inducida por iodoacetamida.....	49
7.1.3. Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)	49
7.1.4. Colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)	50
7.2. Espontáneos.....	51
7.3. Transgénicos.....	51
7.4. Transferencia celular adoptiva.....	52
III. INFECCIÓN BACTERIANA INTESTINAL.....	53
1. Generalidades.....	53
2. Microbiota intestinal.....	53
3. Interacciones entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal.....	54
3.1. Inmunidad innata y microbiota intestinal.....	55
3.1.1. Receptores toll-like (TLRs).....	55
3.1.2. Receptores NOD-like (NLRs).....	57
3.2. Inmunidad adaptativa y microbiota intestinal.....	59
4. Disbiosis.....	59
5. Modelos experimentales de infección bacteriana intestinal.....	61
5.1. <i>Citrobacter rodentium</i>	62

5.2. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Typhimurium.....	63
6. Microbiota intestinal y EII.....	64
IV. MUCOSITIS.....	65
1. Generalidades.....	65
2. Epidemiología.....	65
3. Factores de riesgo.....	66
4. Fisiopatología de la mucositis.....	67
5. Evaluación de la mucositis.....	68
6. Tratamiento de la mucositis.....	69
7. Modelos experimentales de mucositis.....	70
MATERIAL Y MÉTODOS	71
I. REACTIVOS.....	73
II. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	73
III. MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN INTESTINAL.....	74
1. Modelos experimentales de colitis.....	74
1.1. Colitis aguda inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)	74
1.2. Colitis aguda inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)	75
1.3. Colitis crónica inducida por DSS.....	76
1.4. Modelo de transferencia celular adoptiva.....	77
2. Infección bacteriana intestinal.....	78

2.1. Infección por <i>Citrobacter rodentium</i> (<i>C. rodentium</i>).....	78
2.2. Infección por <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i>).....	78
3. Modelo experimental de mucositis gastrointestinal.....	78
3.1. Mucositis inducida por 5-fluorouracilo (5-FU)	78
IV. EVALUACIÓN PATOLÓGICA DE LOS MODELOS <i>IN VIVO</i>	79
1. Determinaciones en los segmentos intestinales.....	79
2. Cuantificación macroscópica del daño colónico y determinación del área dañada	79
3. Histología: tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica	81
4. Cuantificación del índice de inflamación colónica de animales infectados <i>C.rodentium</i>	82
5. Cuantificación de la elongación de las criptas en el modelo de <i>C.rodentium</i>	82
6. Índice endoscópico de la actividad de la colitis.....	82
7. Translocación bacteriana.....	83
V. LÍNEAS CELULARES DE EPITELIO INTESTINAL	83
VI. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	84
VII. TÉCNICAS GENERALES.....	85
1. Obtención de plasma.....	85
2. Determinación de la concentración de proteínas.....	86
3. Determinación de actividades enzimáticas.....	86

3.1. Actividad mieloperoxidasa (MPO)	87
3.2. Actividad fosfatasa alcalina (AP)	87
3.3. Actividad leucina aminopeptidasa.....	88
3.4. Actividad maltasa.....	88
3.5. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH).....	89
4. Determinación de la secreción de citoquinas.....	89
5. Citometría de flujo.....	89
6. Preparación de muestras para Western blot.....	90
7. Western blot.....	90
8. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción (RT)	91
9. Análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (qRT-PCR)	93
10. Northern blot.....	93
11. Análisis estadístico.....	94
ESTUDIOS PREVIOS.....	95
RESULTADOS.....	99
I. CARACTERIZACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	101
II. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL EN RATAS CON COLITIS INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE TNBS.....	110
III. CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES HETEROCIGOTOS PARA LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO.....	118

IV. IMPORTANCIA DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN LA INFLAMACIÓN INTESTINAL.....	126
1. Importancia de la TNAP en la EII.....	126
1.1. Importancia de la TNAP en la colitis aguda inducida por DSS.....	126
1.2. Importancia de la TNAP en la colitis crónica inducida por DSS.....	133
1.3. Importancia de la TNAP en la colitis aguda inducida por TNBS.....	139
1.4. Importancia de la TNAP en la colitis inducida por transferencia celular adoptiva.....	144
2. Importancia de la TNAP en la infección bacteriana intestinal.....	147
2.1. Importancia de la TNAP en la infección intestinal por <i>Citrobacter rodentium</i>	147
2.2. Importancia de la TNAP en la infección por <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Typhimurium.....	151
3. Importancia de la TNAP en la mucositis gastrointestinal.....	152
3.1. Importancia de la TNAP en la mucositis inducida por 5-FU.....	152
DISCUSIÓN.....	157
CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES.....	171
SUMMARY.....	175
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189

ANEXO	247
Abreviaturas.....	249
Índice de tablas.....	251
Índice de figuras.....	252
Difusión científica de los resultados.....	260
Comunicaciones orales y en forma de póster.....	260
Publicaciones científicas.....	263
Artículos publicados.....	265

OBJETIVOS

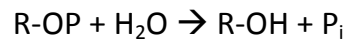
1. Caracterizar el efecto del estrés oxidativo sobre la fosfatasa alcalina en el epitelio intestinal.
2. Estudiar el efecto terapéutico de la administración de fosfatasa alcalina en modelos de colitis experimental.
3. Caracterizar la implicación de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en modelos experimentales de inflamación intestinal.

INTRODUCCIÓN

I. FOSFATASA ALCALINA

1. Generalidades

Las fosfatasas alcalinas (APs) de mamífero (*orthophosphoric monoester phosphohydrolase-alkaline optimun*, EC.3.1.3.1) constituyen una familia de enzimas que catalizan la siguiente reacción general:



La hidrólisis de R-OP da lugar a fosfato inorgánico (P_i) y un alcohol, azúcar, fenol, etc. (R-OH). Pertenecen a la familia de las fosfomonoesterasas y son las únicas de su familia que no son específicas de sustrato, ya que son capaces de hidrolizar una gran variedad de sustratos, al menos *in vitro*. Además se denominan alcalinas ya que la forma más eficaz de llevar a cabo esta reacción es por encima del pH neutro, pH: 8-11.

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico así como reacciones de transfosforilación en presencia de grandes concentraciones de aceptores de fosfato. Estas enzimas están presentes extensamente en la naturaleza y se encuentran en muchos organismos, desde bacterias hasta el hombre [1]. La función catalítica es un mecanismo que se ha conservado en las APs de bacterias, comparándolas con las APs de mamífero éstas tienen una mayor actividad específica y un mayor valor de K_m ; tienen un mayor pH alcalino óptimo, una estabilidad al calor menor, se encuentran ancladas en la membrana y se inhiben por L-aminoácidos y péptidos a través de un mecanismo no competitivo. Estas propiedades, sin embargo, difieren enormemente entre las diferentes isoformas de AP de mamífero y de hecho *in vivo* tienen diferentes funciones [2].

2. Genética

2.1. Genes de la fosfatasa alcalina

En humanos, las fosfatasas alcalinas están codificadas por cuatro genes que tradicionalmente se han designado según los tejidos en los que se expresan mayoritariamente, aunque actualmente la nomenclatura de los genes se está empleando con más frecuencia (Tabla 1). El gen de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) se expresa mayoritariamente en hígado, hueso y riñón (su nombre alternativo es AP de Hígado/Hueso/Riñón o H/H/R), y en la placenta durante el primer trimestre de embarazo y a bajas concentraciones en numerosos tejidos. Las otras tres isoformas, como la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), la fosfatasa alcalina de células

germinales o fosfatasa alcalina similar a la placentaria (GCAP) y la fosfatasa alcalina intestinal (IAP), se expresan fundamentalmente en estos tejidos, de ahí que se les denomine APs específicas de tejido [3].

En el hombre, el gen que codifica la TNAP (ALPL) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1, banda p34-p36 [4] y es aproximadamente cinco veces más largo que los genes de las APs específicas de tejido, debido en parte al primer intrón (20 kb) el cual separa el exón I, que solamente contiene secuencias 5' no transcritas, del exón II que contiene parte de estas secuencias así como un codón de iniciación. El gen ALPL se localiza en la parte distal del cromosoma 1, banda p36.12, específicamente en la posición: 21581174-21650208, por lo que tiene una longitud de 63.034 pares de bases (bp). Posteriormente se identificaron los genes de la TNAP homóloga de rata (*Alpl*) [5] así como de ratón (*Akp2*) [6-8]. Los genes ALPL y *Akp2* están compuestos por 13 exones, los dos primeros exones (Ia y Ib) son exones no codificantes y están separados por el exón II, que contiene el codón de iniciación de la transcripción ATG (Figura 1). El último exón contiene el codón de terminación y la región 3' no transcrita del ARNm. El resto de las secuencias exónicas están interrumpidas por intrones en posiciones análogas a aquellas de las APs específicas de tejido, aunque estos intrones son más largos. Los exones las APs de humano y rata comparten un 66% de homología en cuanto a sus bases mientras que no comparten la secuencia del exón Ib. Se han descrito los principales sitios de iniciación de la transcripción en humanos [5, 9] y ratón [6]. Cabe destacar, que los exones Ia y Ib son incorporados al ARNm de forma excluyente, ya que cada exón tiene su propia secuencia promotora. Esto da lugar a dos ARNm, que codifican polipéptidos idénticos, con diferentes secuencias 5' no transcritas [10-12].

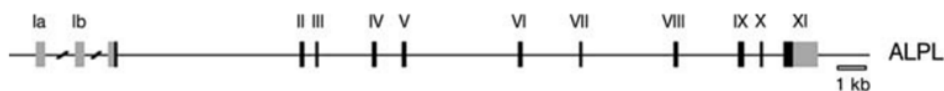


Figura 1. Organización genómica del gen ALPL. En negro los exones y en gris las regiones 5' y 3' no transcritas [13].

Los genes de las APs específicas de tejido ALPP, ALPP2 y ALPI se localizan en el cromosoma 2, bandas q34-q37 [14, 15] y se encuentran muy cerca (Tabla 1). Sus estructuras son casi idénticas, constan de 11 exones interrumpidos por pequeños intrones (74-425 bp) situados en posiciones análogas, todo ello comprimido en menos de 5 kb de ADN genómico [16-18]. La similitud en la estructura de estas tres APs sugiere una evolución

divergente de estos genes en la reorganización genómica, que dio lugar a tres *loci* relacionados - ALPP, ALPP2, ALPI – que están situados en este orden desde el centrómero al telómero en la misma región del brazo largo del cromosoma 2 (2q34-q37). Las regiones específicas de los intrones, y también las regiones 3' no transcritas del exón XI, muestran las principales diferencias en la secuencia y estas regiones han sido útiles para el desarrollo de sondas específicas.

Especie	Gen	Proteína	Nombre común	Localización cromosómica
Humanos	ALPL	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo hígado-hueso-riñón	chr1:21581174-21650208
	ALPP	PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria	chr2:233068964-233073097
	ALPP2	GCAP	Fosfatasa alcalina de células germinales	chr2:233097057-233100922
Ratón	ALPI	IAP	Fosfatasa alcalina intestinal	chr2:233146369-233150245
	<i>Akp2</i>	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo hígado-hueso-riñón	chr4:136199753-136254338
	<i>Akp3</i>	IAP	Fosfatasa alcalina intestinal	chr1:87031694-87555136
	<i>Akp5</i>	EAP	Fosfatasa alcalina embrionaria	chr1:86990248-86993641
	<i>Akp-ps1</i>	N/A	Pseudo AP	chr1: 86968828-86972484
Rata	<i>Akp6</i>	AKP6	Secuencia RIKEN, nuevo locus	chr1:87002298-87005230
	<i>Alpl</i>	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo hígado-hueso-riñón	chr5:156511778-156568766
	<i>Alpi</i>	IAPI	Fosfatasa alcalina intestinal I	chr9:86076305-86079772
	<i>Alpi2</i>	IAPII	Fosfatasa alcalina intestinal II	chr9:86107650-86110746

Tabla 1. Genes de fosfatasa alcalina en las diferentes especies.

En ratones, además del gen *Akp2*, que se localiza en el cromosoma 4, se han encontrado 4 *loci* de la AP en el cromosoma 1 (Tabla 1); el locus *Akp3* codifica la isoforma intestinal (IAP); el gen *Akp5* que codifica la isoforma embrionaria (EAP); el pseudogén no transcrito *Akp-ps1*; y finalmente un nuevo *locus* identificado en la base de datos después de completar el proyecto del genoma humano [19]. Narisawa y col. lo han denominado *Akp6* y han determinado que codifica una isoforma similar a la IAP aunque con propiedades catalíticas diferentes. Los genes *Akp3*, *Akp5* y *Akp-ps1* tienen una longitud de unas 5 kb y están compuestos por 11 exones separados por 10 intrones con una organización muy similar a la de los genes humanos de las APs específicas de tejido. El exón más pequeño en todos los casos es el exón VII (73 bp) y el más largo en todos los casos el exón XI, que codifica el C-terminal del final de la molécula así como un dominio 3' no transcrito (640 bp de longitud en *Akp5* y 1180 bp en *Akp3*). Las moléculas de ARNm de todas

las isoformas en humanos y ratón, tienen una longitud de 2,4-3,0 kb y codifican péptidos de 518-535 aminoácidos. El genoma de la rata alberga el gen de la TNAP (*Alpl*) [5], que produce un ARNm de cerca de 2,5 kb [20, 21], y dos genes de la IAP, *Alpi* y *Alpi2* [22-25]. Estos genes dan lugar a ARNms de 2,7 kb (IAP I) y 3,0 kb (IAP II) [26]. No se han identificado en roedores la PLAP ni la GCAP, por lo que la IAP parece ser la única AP específica de tejido [6, 27].

2.2. Expresión génica

La TNAP se expresa en multitud de tejidos. Estudios en ratón han revelado que el gen *Akp2* está presente en el estado embrionario unicelular [28, 29]. Por lo que la detección de la TNAP se puede utilizar como marcador de células madre embrionarias en estado indiferenciado [30]. La TNAP se encuentra en los nervios periféricos de ratones en desarrollo [31] y en la región lumbosacra de la medula espinal [32] y en especial en la zona nodal (nódulos de Ranvier y paranódulos) de diversas especies, roedores, carnívoros y humanos [33]. En todos los vertebrados, la TNAP predomina en el tejido esquelético en desarrollo. En ratones, la expresión de *Akp2* comienza en el desarrollo esquelético en el día embrionario 13 [34]. Mediante técnicas inmunológicas, se ha observado que la TNAP puede localizarse en la superficie de los pre-osteoblastos y también en la membrana basolateral de los osteoblastos. También se encuentra en algunos condrocitos y en células hipertróficas en el cartílago. También se ha detectado TNAP por inmuno-reactividad en otros tejidos blandos como el borde del cepillo de los túbulos renales proximales y en las membranas de los canalículos biliares en el hígado [35]. También en los odontoblastos y en la pulpa dental [36]. Las células peritubulares de los testículos [37], los pericitos [38] y las células mioideas de la pared intestinal también son ricas en TNAP así como las células endoteliales [39], aunque un estudio del musculo esquelético indica que la expresión de TNAP es elevado en el endotelio arterial pero no en el endotelio venoso [40]. También se expresa la TNAP en las células pre-B y pre-T [41-43], leucocitos y particularmente neutrófilos [44, 45]. En colon, se expresa la TNAP, que es secretada por los colonocitos en las partículas similares a surfactante (SLP) [46]. Así mismo, nuestro grupo de investigación ha observado la presencia de la TNAP a nivel colónico [47].

La GCAP se localiza en la membrana celular de las células germinales primarias y la expresan durante su migración hacia la zona genital. Incluso cuando las gónadas no son identificables (primer trimestre del embarazo), se puede identificar la GCAP en la zona genital [48].

La PLAP se expresa en las células del sincitiotrofoblasto de la placenta desde la octava semana de gestación y durante todo el embarazo [49]. El grupo de Garattini y col., demostró mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que la PLAP también está presente en extractos de hígado y en intestino [50]. Además la PLAP está presente en el intestino neonatal [51] y en el colon adulto [52].

La IAP, como su propio nombre implica, se expresa en el intestino delgado de muchas especies. En el adulto, se encuentra asociada al borde del cepillo del epitelio intestinal y a las SLPs [46, 53-55]. En las ratas, el ARNm de la IAP I se puede encontrar en el duodeno y en yeyuno, mientras que el de la IAP II solo se expresa en el duodeno [56]. En humanos, la IAP y la PLAP se co-expresan en el intestino neonatal [51] así como en el colon [52]. La IAP también puede expresarse en el riñón humano, representando un 25% de la actividad en el riñón, siendo el 75% restante la TNAP [57]. En ratones, los genes *Akp3* y *Akp5* se expresan en el intestino delgado, así como el *Akp6* [29, 58].

2.3. Regulación génica

La expresión del gen de la TNAP está regulada por dos exones líderes, la y lb, dando lugar a dos ARNms por *splicing* alternativo que solamente difieren en una región 5' no transcrita [6, 59]. El empleo de un promotor u otro se ha deducido a través del estudio de los ADNcs aislados de diferentes tejidos. En osteoblastos, el promotor la se utiliza preferentemente, dando lugar al ARNm de la TNAP ósea. En estas células, el promotor lb, que da lugar al ARNm de la TNAP hepática, se encuentra silenciado. El promotor lb es el que se utiliza principalmente en hígado y riñón [12]. El ARNm de la isoforma de hueso es el más transcrito en neutrófilos periféricos y neutrófilos cultivados *in vitro* [60]. El promotor la está también activo en células madre embrionarias, mientras que el lb está silenciado en condiciones basales. En todos los animales, el transcrito derivado del primer promotor se encuentra en la mayoría de los tejidos, aunque a diferentes niveles, mientras que el dirigido por el segundo promotor se expresa específicamente a grandes niveles sólo en el corazón [59].

El ácido retinoico, la dexametasona y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) promueven la transcripción de la TNAP utilizando el promotor la. Se ha observado en ratones que la transcripción de la TNAP en tejidos que no la expresan se reprime *in vivo* mediante la metilación del promotor la [61-64]. El promotor lb se activa por la

dexametasona [12], el dibutiril AMP cíclico y también por todos los ácidos *trans*-retinoico [65, 66]. Así mismo, se han identificado varios factores de transcripción implicados en la expresión de la TNAP como FKHR (factor de transcripción *forkhead*) [67] y Sp3 [68]. Dos miembros de la familia Smad están implicados en la regulación de la expresión de la TNAP, Smad 1 inhibe al promotor de la TNAP [69] mientras que Smad 3 promueve la expresión de la TNAP y la mineralización en líneas celulares osteoblasticas [70, 71].

La expresión de la IAP está regulada por diferentes componentes dietéticos, factores de desarrollo y hormonales, como la vitamina D3 [23] y la cortisona o la cortisona con tiroxina [72]. Los principales factores de transcripción que regulan la expresión génica de la IAP son el receptor de la hormona tiroidea y el factor KLF4 (*gut-enriched Kruppel-like*) [73-75]. En la diferenciación y proliferación intestinal intervienen además dos factores de transcripción de la familia Cdx (*Caudal-related homebox*): Cdx1 y Cdx2. En el promotor de la IAP hay un lugar de unión Cdx, Cdx1 es un específico y potente activador del promotor de la IAP, mientras que Cdx2 inhibe la acción de Cdx1 [76]. Por otra parte, la expresión génica de la IAP está epigenéticamente regulada por el butirato a través de la acetilación de histonas en lugares específicos del promotor de la IAP [77, 78].

3. Estructura y dominios funcionales

3.1. Estructura tridimensional

Durante años la cristalografía ha intentado dilucidar la estructura de la molécula de la AP de *Escherichia coli* (ECAP) [79], siendo la única fuente de información estructural de APs, actualmente sólo se ha descrito la estructura tridimensional de la PLAP humana [80] (Figura 2). Como se había predicho por comparación, el núcleo central de la PLAP, que consiste en un hoja- β extendida y α -hélices rodeando, es una estructura muy similar a la de la ECAP. La estructura completa de la PLAP es un dímero y cada monómero contiene 484 residuos, cuatro átomos metálicos, un ion fosfato y 603 moléculas de agua.

Al disponer de la estructura de la PLAP se han elaborado modelos de las isoenzimas GCAP, IAP y TNAP, desvelando que todas las características nuevas descubiertas en la PLAP están conservadas en estas isoenzimas de humano también [81]. El sitio activo de la serina está conservado en todas las especies en las que ha sido secuenciada la AP hasta la fecha.

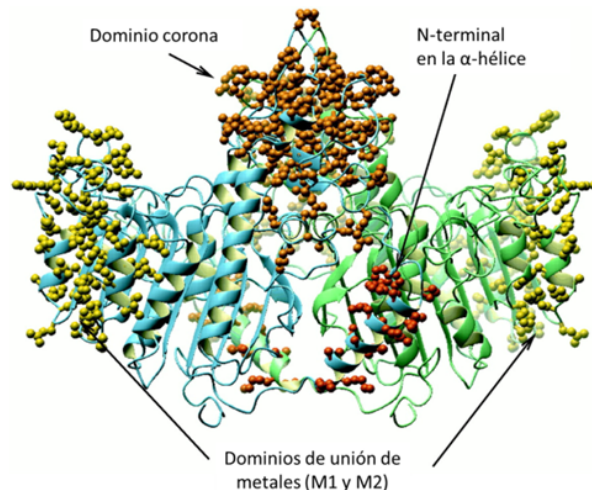


Figura 2. Vista frontal de la estructura tridimensional de la PLAP [80], en la que se observa el monómero I en azul, el monómero II en verde, el N-terminal de la α -hélice en rojo, el dominio corona en naranja y dos de los dominios de unión a metales en amarillo.

Mediante comparación por alineamiento de las secuencias se ha descrito que la PLAP y la GCAP son idénticas en un 98%, sin inserciones o depleciones con respecto a la PLAP; la IAP y la PLAP son idénticas en un 87%, con un 91% de homología sin inserciones o depleciones con respecto a la PLAP; la TNAP y la PLAP son idénticas en un 57%, con un 74% de homología además la TNAP tiene cuatro inserciones de un residuo, una inserción de tres residuos y la depleción de dos residuos con respecto a la PLAP.

Los estudios de estructura-actividad comparando la PLAP con la ECAP han encontrado una función conservada para los residuos que estabilizan los sitios activos de los iones Zn1, Zn2 y Mg, como los residuos Asp357, His153, Ser155, Glu311, Asp316, His320, Asp357, His358, His360 e His432 [82]. Además se ha descrito un dominio de unión adicional no catalítico, M4, al que parece que se une el calcio y que no aparece en la ECAP [80-83]. Por otra parte, todas las APs de mamífero poseen cinco residuos de cisteína (Cys101, Cys121, Cys183, Cys467 y Cys474 en PLAP) por subunidad, no homólogas a ninguna de las 4 cisteínas que aparecen en la ECAP. Estas forman dos enlaces disulfuro, Cys121-Cys183 y Cys467-Cys474, mientras que el residuo Cys101 continua libre [82].

El brazo N-terminal de la PLAP tiene un dominio adicional α -hélice que no está presente en la estructura de la ECAP y que no aparece en el segundo monómero, éste interacciona con una superficie de 555 Å, sugiriendo una dimerización de la enzima. Los residuos del brazo N-terminal

interaccionan con la Arg370 del asa 366-375 y con la Asn106 y la Arg117 del segundo monómero.

El asa flexible de la parte superior de la enzima constituye el dominio corona de la PLAP y está formado por la inserción de segmentos de 60 residuos (366-430) de cada monómero. Consiste en la interacción de dos laminas- β pequeñas, cada una compuesta de tres bandas paralelas y rodeadas de 6 asas flexibles y grandes que contienen una α -hélice pequeña [80]. La variabilidad en la inhibición no competitiva [1, 82, 84-86], la estabilidad al calor [87] y su comportamiento alostérico [88], se ha atribuido a diferentes residuos localizados en este dominio.

La secuencia de la superficie de la PLAP está poco conservada, de hecho sólo tiene un 8% en común con la ECAP. La PLAP posee algunos elementos de estructura secundaria adicionales, que consisten en un fragmento adicional N-terminal en la α -hélice (residuos 9 y 25), una α -hélice y una hebra- β en una región divergente (residuos 208-280) así como una organización diferente de la pequeña lámina- β en los dominios 365-430. En el sitio activo sólo se han preservado los residuos que son esenciales para la catálisis, como por ejemplo la serina catalítica y los tres lugares de unión de los iones, M1 (ocupado por Zn^{2+} , llamado Zn1), M2 (ocupado por Zn^{2+} , llamado Zn2) y M3 (ocupado por Mg^{2+}). La mitad de la superficie de la enzima corresponde con 3 regiones claramente definidas cuyas secuencias varían mucho entre las APs humana y no existen en las APs que no son de mamíferos. Se trata del segmento N-terminal en la α -hélice, que hemos comentado arriba, un asa interfacial conocido como dominio corona y un cuarto dominio de unión de metales (M4).

3.2. Modificaciones post-transcripcionales

3.2.1. Glicosilación

Las APs son glicoproteínas que actúan como ectoenzimas y se encuentran ancladas en la membrana celular a través del glicosilfosfatidilinositol [89, 90]. Estas isoformas presentan diferencias en cuanto a su estructura glicosilada, no sólo entre las isoformas de hueso/hígado/riñón, sino también con respecto a la intestinal y la placentaria [91]. La glicosilación es una de las modificaciones post-transcripcionales más comunes, estas cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas tienen su papel en las propiedades funcionales de las glicoproteínas [92]. Existen dos tipos principales de glicoproteínas, con unión N-glicosídica o con unión O-glicosídica. Las glicoproteínas con unión N-glicosídica se enlazan mediante residuos de asparragina en motivos Asp-X-Ser/Thr y las de enlace O-

glicosídica mediante serina o treonina. Se ha descrito que las isoformas de hueso, hígado y riñón son N-glicosiladas, aunque aún no se conoce el número de sitios de unión [93], y que la N-glicosilación es esencial para la actividad de la TNAP pero no para la IAP o la PLAP [93]. Se cree que las principales diferencias entre las isoformas de la podrían deberse a cambios en la O-glicosilación.

En función de la glicosilación, se han identificado mediante cromatografía líquida de alta resolución 4 isoformas de la AP ósea en humanos (B/I, B1x, B1 y B2). Éstas no presentaron el mismo patrón de migración en geles nativos, sugiriendo que difieren en carga y tamaño; sin embargo, al ser tratadas con neuroaminidasa, que elimina el residuo de ácido siálico, mostraron un patrón de migración común. Además, las diferencias en cuanto a la unión a lectina desaparecieron tras el tratamiento con N-glicosidasa F, que elimina los glicanos unidos por enlace N-glicosídico [94]. Estas observaciones confirman que de hecho la estructura central de las isoformas de hueso es la misma, de acuerdo con el hecho de que resulta de la expresión de un solo gen ALPL y que difieren solamente en las modificaciones post-transcripcionales.

3.2.2. Localización ectoplásmica

Mientras la ECAP se localiza en el espacio periplásmico de la bacteria, las APs de mamífero se encuentran ancladas en la membrana mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Este residuo GPI se añade después de la transcripción al péptido nascente mediante una reacción de transamidación que implica la eliminación de un tramo de 29 aminoácidos hidrofóbicos del C-terminal y la concomitante transferencia del GPI pre-anclado al nuevo aminoácido del C-terminal. La secuenciación y el análisis de los aminoácidos de la PLAP mostró que el nuevo extremo C-terminal de la cadena del polipéptido maduro es el Asp484 de la proenzima[95]. Un análisis más profundo del péptido mostró que es un peptidoglicano que contiene un residuo de etanolamina, un residuo de glucosamina y dos residuos de hexosa neutral. El inositol se une al grupo α -carboxilo del ácido aspártico a través de la etanolamina. La localización del inositol en el Asp484 de la proenzima indica que el péptido de 29 residuos es eliminado de la proteína nascente durante la condensación post-transcripcional con el fosfatidilinositol-glicano.

En el apartado dedicado a la IAP se describe más detalladamente como la IAP se ancla en la membrana apical de los enterocitos.

4. Propiedades enzimáticas

4.1. Inhibición enzimática

Las APs de mamífero poseen la propiedad cinética, no compartida con las de bacterias, de ser inhibidas estereoespecíficamente por L-aminoácidos y péptidos a través de un mecanismo no competitivo [96]. La L-fenilalanina inhibe la actividad de la IAP y la PLAP a una concentración 30 veces inferior a la necesaria para inhibir a la TNAP. Por el contrario, la TNAP es inhibida por la L-homoarginina a una concentración 10-20 veces inferior a la necesaria para inhibir a la IAP y a la PLAP. Además se han descrito otros LINK \l "_ENREF_340" \o "Bitton, 2003 #3864" ¶[340-343] han demostrado un papel importante del estrés N.CITE.DATA [97, 98] y L-homoarginina [99], así como compuestos no relacionados como el levamisol, el L-estereoisómero del tetramisol, [100] y la teofilina [101]. La inhibición se da por mecanismo no competitivo excepcional y aunque su implicación biológica aún no se conoce, estos inhibidores resultan muy útiles en la práctica clínica para determinar las diferentes isoformas de APs [102, 103].

4.2. Especificidad de sustrato

Las APs de mamífero poseen una amplia especificidad de sustrato y son capaces de hidrolizar o transfosforilar una amplia variedad de compuestos fosforilados *in vitro*. Sin embargo, hasta la fecha, solo unos pocos compuestos han sido identificados como sustratos naturales de algunas isoformas de APs [104, 105].

Se ha propuesto que la TNAP hidroliza el pirofosfato (PP_i), inhibidor de la mineralización, para facilitar la precipitación mineral y el crecimiento, [106-108], como se explicará más adelante en el apartado dedicado a la TNAP. El piridoxal-5-fosfato (PLP) también puede ser sustrato para la TNAP presente en los leucocitos [109, 110]. Se han relacionado los ataques epilépticos que sufren los pacientes con hipofosfatasa con anomalías en el metabolismo del PLP. Otros sustratos descritos son el monofluorofosfato, que puede ser hidrolizado por la TNAP [101, 111], así como algunas cadenas acilo grasas que pueden ser hidrolizadas por las APs de mamífero.

Las APs podrían estar implicadas en el metabolismo de los nucleótidos. De hecho, la TNAP purificada de osteocitos es capaz de hidrolizar ATP, ADP, AMP, pirofosfato, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, β -glicerofosfato y bis-(*p*-nitrofenil)fosfato así como el *p*-nitrofenilfosfato [112].

Las APs aisladas de intestino de ratón, son capaces de catalizar la síntesis de PP_i a partir de P_i durante la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato, ATP, ADP, PP_i o pNPP [113].

Como se describe más detalladamente en el siguiente apartado, se ha descrito que la IAP es capaz de hidrolizar el LPS bacteriano [114].

5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)

La IAP es una glicoproteína anclada en la membrana apical a través de un glicosil-fosfatidil-inositol [115]. En el lumen de los enterocitos, la lisofosfatidil colina acelera la expresión de IAP de la parte apical del enterocito hacia el lumen [116]. La fosfatidil colina se genera justo después de la ingesta mediante la hidrólisis de la fosfatidilcolina biliar por la fosfolipasa 2 [117]. La IAP se incorpora en las membranas en los alrededores de las gotitas de lípidos intracelulares y en las partículas similares a surfactante que son secretadas basolateralmente por los enterocitos después de la absorción de las grasas [118]. Este mecanismo participa en la secreción de la IAP del lumen intestinal al torrente sanguíneo.

En el intestino delgado de los roedores, los niveles de ARNm de IAP y la actividad siguen un gradiente ascendente desde las criptas a las vellosidades, en relación con el grado de diferenciación de las células epiteliales intestinales, de hecho se ha utilizado su medida como un marcador de diferenciación [119, 120]. La actividad AP en el colon incrementa gradiente desde la superficie de las criptas, reflejando también el estado de diferenciación [121, 122].

Entre los factores que regulan la IAP, las hormonas del eje corticopituitario (hidrocortisona, cortisona y hormona adenoroticotropa) y las hormonas tiroideas son los inductores más fuertes de la IAP [123, 124]. La prostaglandina E2 también estimula la IAP *in vivo* [125]. El estrés por calor induce a la IAP, así como la proteína de choque térmico HSP 72 en las células epiteliales intestinales; esto ha llevado a algunos autores a considerar a la IAP como una proteína de choque térmico [126]. Por el contrario, las citoquinas inflamatorias IL- 1β y TNF- α inhiben la expresión de la IAP en las células epiteliales intestinales [127].

Se conocen diferentes funciones de la fosfatasa alcalina intestinal [128] (Figura 3):

- Regulación de la absorción de lípidos: los triglicéridos son hidrolizados en ácidos grasos libres (AGL) y glicerol mediante la lipasa

pancreática en el yeyuno superior. Se han propuesto dos mecanismos para el proceso por el cual los AGL se absorben en los enterocitos, uno consiste en la difusión pasiva a través de la membrana apical y otro es dependiente de transportadores de membrana [129, 130]. Narisawa y col. generaron un ratón deficiente en *Akp3* (IAP), cuando estos animales eran alimentados con una dieta rica en grasas (11%) durante un largo periodo de tiempo, los ratones crecían más rápido y mostraron un transporte acelerado de las partículas de grasa a través del epitelio intestinal y niveles elevados de triglicéridos [131]. Por lo que concluyeron que la IAP es un factor regulador negativo en la absorción intestinal aunque el mecanismo exacto aún no se conoce.

La absorción de grasa en los enterocitos induce la rápida y específica internalización de la IAP anclada en la membrana apical mediante un mecanismo de endocitosis que implica la formación de vesículas de clatrina y posiblemente dominios raft lipídicos [132, 133]. Los papeles intracelulares de la IAP internalizada aún no se conocen, pero parece que está involucrada en la formación de quilomicrones [134].

- Regulación en la secreción duodenal de bicarbonato y del pH de superficie: el hecho de que la IAP esté presente en el duodeno y su elevado pH óptimo (pH >8) en el lumen [2], sugieren que la IAP puede estar involucrada en la regulación de la secreción de bicarbonato y del pH. De hecho, datos recientes sugieren que la IAP es un quimiosensor que regula el pH duodenal y contribuye a la protección de la mucosa contra los ácidos gástricos [125, 135].

- Desfosforilación del LPS bacteriano y reducción de su toxicidad: el LPS es un producto de las bacterias Gram negativas que cuando alcanza el torrente sanguíneo produce inflamación y shock séptico [136], y que puede estar relacionado con alteraciones metabólicas en concentraciones menores (cita). La toxicidad del LPS reside en la fracción difosforil-lípido A y en su estado de fosforilación [137]. La IAP posee propiedades detoxificantes en células endoteliales y en peces cebra tratados con LPS [114]. Células transfectadas que sobre-expresaban IAP fueron más resistentes a la toxicidad del LPS que las células control [138]. Estos estudios demuestran que la IAP es capaz de desfosforilar el LPS y reducir su toxicidad *in vivo*.

- Reducción de la translocación bacteriana y protección frente a la inflamación inducida por LPS: el LPS se une específicamente al receptor *toll-like* 4 (TLR-4) e induce inflamación mediante la activación de diferentes vías [139, 140]. El LPS desfosforilado no es capaz de activar el TLR-4 y puede incluso bloquear este receptor. Cuando la actividad IAP es baja, las concentraciones de LPS son mayores así como la estimulación de TLR-4

mediada por LPS. La subsecuente estimulación de genes inflamatorios lleva a la inflamación y la translocación bacteriana [128]. La depleción del gen IAP incrementa las alteraciones intestinales mediadas por LPS así como la infiltración neutrofílica en los peces cebra [114]. Por lo que *in vivo* la IAP controla la inflamación intestinal provocada por los componentes bacterianos y el paso de bacterias a través de la mucosa intestinal.

-Tolerancia intestinal a la flora comensal: en los peces cebra en condiciones *germ-free* (libres de bacterias), la diferenciación del epitelio intestinal es incompleta y la expresión de la IAP es baja [141]; la actividad de la IAP incrementa con la introducción de bacterias Gram negativas vivas o muertas o simplemente con LPS, mientras que las bacterias Gram positivas, que no contienen LPS, no tienen efecto sobre la IAP [114, 141]. Estos estudios demuestran que la flora comensal tiene un papel singular en la inducción y el mantenimiento de la actividad de la IAP en los peces cebra. Por el contrario, la IAP juega un papel en la tolerancia a las bacterias residentes en las células epiteliales intestinales. Sin embargo, este papel modulador depende de la especie animal.

- Regulación en la inflamación y en la sepsis: Se ha relacionado la inflamación intestinal, tanto en modelos animales [47, 142] como en humanos [143], con un marcado incremento en la actividad AP. Este incremento parece ser debido en parte al influjo de neutrófilos que expresan AP [144] y también a cambios en la expresión de la AP a nivel de epitelio. Por otra parte, este incremento está unido a un cambio de isoforma de AP a nivel colónico. En concordancia con estas observaciones, un artículo publicado en 2007 indica que la actividad AP en biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn esta incrementada con respecto a pacientes normales y a pacientes con colitis ulcerosa [145]. Por otra parte en pacientes con EC y CU se han observado niveles reducidos de ARNm de IAP en tejidos inflamados en comparación con tejido no inflamados e incluso los tejidos no inflamados [146, 147] de estos pacientes presentaron menores niveles de expresión que los de pacientes sanos.

La IAP, como otras APs, actúa como agente antiinflamatorio en el tratamiento de enfermedades mediadas por LPS. La IAP administrada por vía intraperitoneal es capaz de atenuar la toxicidad del LPS en animales de experimentación [114, 138, 148]. Un estudio llevado a cabo simultáneamente al desarrollo de esta tesis doctoral, demostró que la administración oral de IAP reduce la inflamación colónica en un modelo de colitis inducida por DSS en ratas, ya que disminuyó la expresión génica de citoquinas a nivel de ARNm, disminuyó la infiltración inflamatoria y mejoró la anatomía de la mucosa colónica [146]. Además la administración intravenosa de IAP bovina redujo las respuestas inflamatorias sistémicas inducidas por

sepsis e isquemia-reperfusión en roedores o después de cirugía cardiopulmonar en pacientes [149-151].

Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de la IAP en la protección del huésped de los efectos adversos inducidos por el LPS in vivo. Otras APs, como la placentaria, también tuvieron un efecto protector en la sepsis inducida por LPS en ratones [152], demostrando las propiedades antiinflamatorias generales de las APs.

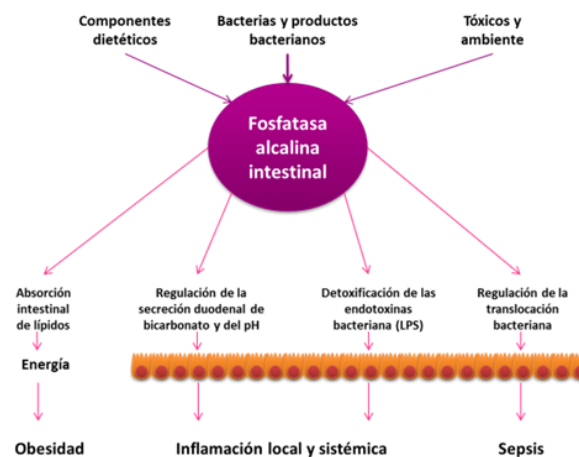


Figura 3. Roles principales de la IAP. (Imagen adaptada [128]).

6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)

La isoforma TNAP es esencial en la mineralización de la matriz ósea. Su función biológica consiste en hidrolizar el pirofosfato inorgánico extracelular (ePP_i), un inhibidor de la calcificación, para mantener el ratio correcto P_i/ePP_i en el tejido esquelético para permitir una correcta calcificación ósea [153-155]. En el resto del cuerpo, los niveles elevados de ePP_i previenen la calcificación ectópica [156]. Por el contrario, niveles bajos de ePP_i se han asociado con la calcificación de tejidos blandos [157]. Esta deficiencia de ePP_i se ha asociado a deficiencias en la producción o el transporte de pirofosfato, como se ha observado en deficiencias en los genes *Ank* (anquilosis progresiva) y *Enpp1* (fosfatasa/fosfodiesterasa de nucleótidos extracelulares) [153, 154]. Este estado fisiológico puede dar lugar a varias patologías como calcificación arterial idiopática infantil, osificación ósea en los ligamentos espinales, anquilosis y osteoartritis.

La hipofosfatasa, descrita en 1948 por Rathbun [158], es una enfermedad congénita, caracterizada por un defecto en la mineralización

ósea y dentaria, como consecuencia de una deficiencia de TNAP [159, 160]. El síntoma principal de la hipofosfatasa es la hipomineralización, raquitismo u osteomalacia, aunque la gravedad clínica es muy variable desde muerte perinatal a hipofosfatasa dental moderada, que manifiesta solamente anomalías dentales [159]. Los pacientes con hipofosfatasa infantil pueden ser normales al nacimiento, pero gradualmente desarrollar raquitismo antes de los 6 meses de edad. En algunos casos de hipofosfatasa grave aparecen convulsiones como respuesta a la piridoxina [159].

Los ratones deficientes en TNAP (*Akp2*^{-/-}) presentan un fenotipo similar a la hipofosfatasa infantil grave, por lo que estos ratones se han utilizado como modelo animal de esta enfermedad [30]. Al nacer tienen una apariencia normal, pero rápidamente desarrollan un fallo en el crecimiento, convulsiones epilépticas e hipomineralización y mueren antes de los 20 días de edad. Este fenotipo podría corregirse mediante la administración diaria subcutánea de la isoforma TNAP ósea dirigida, creada mediante modificación genética de una secuencia deca-aspartato en el extremo C-terminal de la TNAP soluble [161]. Con base a estos datos, se ha comenzado un ensayo clínico con un tratamiento de reemplazo enzimático en pacientes con hipofosfatasa (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00739505?term=hypophosphatasa&rank=9>).

Se ha descrito poco sobre la relación entre la TNAP y la inflamación intestinal, motivo por el cual se han utilizado los ratones *Akp2*^{-/-} para llevar a cabo una parte de esta tesis doctoral y poder dilucidar la implicación de esta enzima en diversos modelos experimentales de inflamación intestinal. Se han utilizado ratones heterocigotos para llevar a cabo los experimentos debido a la casi nula viabilidad de los homocigotos.

7. Importancia clínica de la fosfatasa alcalina

La determinación de fosfatasa alcalina en sangre se utiliza con mucha frecuencia en la práctica clínica sobre todo para diagnosticar enfermedades hepáticas (ya que en condiciones normales se expresa a niveles muy bajos) y óseas (por su implicación en la formación del hueso) o para determinar si los tratamientos para dichas enfermedades están funcionando correctamente.

El rango normal de AP es de 44 a 147 UI/L (Unidades internacionales por litro, siendo la UI la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar). Los valores normales pueden variar ligeramente de un laboratorio a otro, al igual con la edad y el sexo. Los niveles altos de AP normalmente se observan en niños que presentan un aumento repentino en su crecimiento y en mujeres embarazadas.

Niveles de fosfatasa alcalina superiores a los normales pueden deberse a: obstrucción biliar, enfermedad ósea, consolidación de una fractura, hepatitis, hiperparatiroidismo, leucemia, enfermedad hepática, linfoma, tumores óseos osteoblásticos, osteomalacia, enfermedad de Paget, raquitismo o sarcoidosis.

Niveles de fosfatasa alcalina inferiores a los normales (hipofosfatemia) pueden estar asociados a: desnutrición, deficiencia de proteínas o enfermedad de Wilson.

II. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1. Generalidades

La **enfermedad inflamatoria intestinal** (EII) consiste en un desorden inflamatorio del tracto gastrointestinal de carácter crónico y recurrente, de tratamiento difícil y cuya etiología es esencialmente desconocida [162]. La incidencia de la EII ha incrementado en los últimos años en España [163, 164] y en general en los países desarrollados. Los pacientes con EII padecen periodos de remisión con relapsos, caracterizados por diarrea, dolor abdominal y sangrado rectal. Aunque la etiología continua siendo desconocida, se ha descrito que esta patología está asociada a las interacciones entre el sistema inmune y los factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles [165].

El término EII engloba diferentes enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Estas dos patologías difieren en términos de localización a lo largo del tracto gastrointestinal así como en sus características macroscópicas e histológicas. Sin embargo, comparten algunos síntomas como la diarrea, la malnutrición [166, 167], la anorexia [168, 169], la pérdida de peso corporal [170-172] y el dolor abdominal [173]. Estos signos clínicos comunes dificultan el diagnóstico diferencial ente EC y CU.

La **enfermedad de Crohn** se define como un trastorno inflamatorio transmural de la mucosa gastrointestinal que puede afectar a todo el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano [174, 175]. La presentación típica de la EC afecta a varias porciones del tracto gastrointestinal y presenta complicaciones como estenosis, abscesos y fístulas [176]. La clasificación de Viena se desarrolló para describir los distintos fenotipos de aparición de la EC en función de su localización y del patrón clínico [177, 178]. La localización anatómica y el patrón clínico de la enfermedad de acuerdo con la clasificación de Viena han ido cambiando con el paso del tiempo (Tabla 2). En cuanto al diagnóstico, en un 47% de los pacientes el íleon terminal está afectado, en un 28% el colon, en un 21% el ileo-colon y en un 3% la parte superior del tracto gastrointestinal. Por otra parte, referente al patrón clínico, un 70% de los pacientes presentaron un patrón no estenosante y no fistulizante, un 17% estenosante y un 13% penetrante (con fístulas y/o abscesos) [179]. La presentación clínica es en gran medida dependiente de la localización y puede incluir diarrea, dolor abdominal, fiebre, signos clínicos de obstrucción intestinal así como presencia de sangre y/o moco.

Edad al diagnóstico		Localización		Patrón evolutivo		
A1	< 40 años	L1	Ileon terminal	B1	No estenosante, no fistulizante, o inflamatorio	
A2	> 40 años	L2	Colon	B2	Estenosante	
		L3	Ileocólica	B3	Fistulizante	
		L4	Tracto digestivo alto			

Tabla 2. Clasificación de Viena de la enfermedad de Crohn.

La **colitis ulcerosa** es un trastorno inflamatorio no transmural que afecta únicamente al colon. En función de la extensión del área involucrada, se puede clasificar la CU como: proctitis (recto) [180], colitis lateral izquierda (colon sigmoideo y/o colon descendente) [181] o pancolitis (desde el ciego hasta el recto). Algunos pacientes desarrollan inflamación en el íleon o ileítis, lo que puede complicar el diagnóstico. Los pacientes típicamente presentan diarrea sanguinolenta (sobre todo nocturna y postprandial), episodios de pus y/o moco y cólicos abdominales durante los movimientos intestinales.

Se acuñó el término **colitis indeterminada** (CI) para definir la colitis crónica de etiología desconocida que no se puede diferenciar de EC y CU [182-185].

2. Epidemiología

Las mayores tasas de incidencia y prevalencia de EC y CU se presentan en Europa [186], Reino Unido, y América del Norte [187, 188], donde las tasas están empezando a estabilizarse. Estas tasas continúan creciendo en países de baja incidencia como Europa del Sur, Asia y la mayoría de los países en desarrollo [189]. De hecho, en los últimos años ha habido un cambio significativo en cuanto a la epidemiología de la EII en la Europa del Este. La incidencia y la prevalencia de la enfermedad ha aumentado rápidamente en los últimos años y en muchos países se han alcanzado niveles comparables a los países de Europa Occidental y del Norte y América del Norte [190].

España ha sido considerada como una zona con una incidencia media [191, 192] o elevada [193], dependiendo del estudio considerado y de la zona incluida en el. Navarra y Asturias son las provincias con los datos de incidencia más elevados.

El grupo de población preferentemente afectado en zonas con una alta incidencia es aquel con edades comprendidas entre los 20 y 40 años,

tanto para CU [194, 195] como para EC [187, 196]; mientras que en zonas de escasa incidencia, ésta no presenta diferencias importantes según la edad.

La distribución de la enfermedad en relación al sexo ha sido cambiante a lo largo del tiempo, aunque en la actualidad se considera de forma general que la incidencia es mayor en el caso de la EC en mujeres en las zonas con una elevada incidencia, mientras que en lo que se refiere a la CU existe una predominancia en los hombres [197, 198].

En cuanto a la influencia de la raza, la EC es más prevalente en la población judía que en cualquier otro grupo étnico [199, 200]. La CU es de tres a cinco veces más prevalente en los judíos [201], aunque existen diferencias epidemiológicas entre los judíos que viven en Israel y los que viven en cualquier otro lugar [201, 202]. Se han observado prevalencias similares en las migraciones a diferentes áreas geográficas a lo largo del tiempo. Este cambio en la prevalencia después de la migración también se ha observado en otros grupos étnicos (por ejemplo chinos que viven en Hong Kong comparados con chinos que viven en el resto de China). Todas estas observaciones de incremento de incidencia y prevalencia en países desarrollados sugieren que los factores ambientales y el estilo de vida afectan a la incidencia y al desarrollo de la EII [203, 204].

3. Etiología y factores de riesgo

La EII es una patología de etiología esencialmente desconocida. Se han estudiado numerosos factores medioambientales que influyen en la EII, entre ellos la exposición al humo del tabaco, la dieta, los anticonceptivos orales y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos. También pueden existir influencias microbianas junto con alteraciones inmunológicas. Además, hay pruebas de que los factores genéticos también interpretan algún papel. Se cree que es la combinación y la interacción de factores genéticos, influencias medioambientales y anomalías inmunológicas la que desempeña el papel más importante en la aparición de la enfermedad (Figura 4).

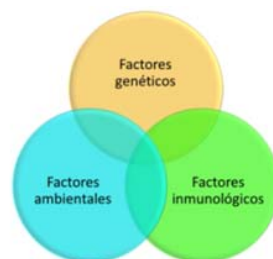


Figura 4. Factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la EII.

3.1. Factores genéticos

La EII puede ser considerada como el resultado de la interacción entre una herencia genética con un patrón no mendeliano y un componente ambiental, lo que provoca una respuesta inmune incontrolada, responsable de la enfermedad. La predisposición genética a padecer la enfermedad queda demostrada con la variabilidad de incidencia de la misma entre distintos grupos étnicos, como es el caso de la elevada incidencia y prevalencia en la población judía, incluso cuando se compara ésta con otros grupos étnicos dentro de la misma localización geográfica [205, 206]. Existe asimismo una agregación familiar en la predisposición a padecer la enfermedad [207-209]. Además, se confirma la relación etiológica entre la EC y la CU, ya que la agregación familiar existe en ambos casos no sólo de forma directa, sino también de forma cruzada, es decir, una mayor probabilidad para ambas manifestaciones dentro de una misma familia predispuesta [210-212]. Comparativamente, el componente familiar es algo más relevante en la EC [213, 214]. Estudios realizados en mellizos y gemelos [215, 216] han demostrado una tasa de concordancia mayor en el segundo caso, tanto para la EC como para la CU, aunque superior en aquélla [217]. Sin embargo, los factores ambientales también han de cumplir un papel importante, ya que no existe un 100% de concordancia entre gemelos monocigóticos [218-221]. Todas estas observaciones se complementan con los datos negativos obtenidos en estudios comparativos de la incidencia entre familiares no consanguíneos. En definitiva, existe un obvio componente genético en el desarrollo de la EII.

El complejo modelo etiopatogénico de la EII viene determinado por la intervención de factores ambientales y su interacción con la genética, la relación genética entre EC y CU, la mayor participación del componente genético en la primera, la existencia de *loci* y genes específicos implicados y el hecho de que diferentes genes puedan causar el mismo fenotipo desde el punto de vista clínico. Teniendo en cuenta lo anterior, la EII no responde a un modelo de herencia mendeliano, aunque es posible que este modelo pueda ser adecuado en algún tipo o subtipo concreto de la enfermedad. El modelo poligénico propuesto por McConnell (consistente en un genotipo que incluye 10-15 genes que son los responsables del desarrollo de la EII) no permite explicar la agregación familiar. Así, un modelo multi-*loci* u oligogénico sería adecuado para explicar las características fisiopatológicas de la enfermedad, la relación entre EC y CU, así como los aspectos familiares de la EII [222-224]. La EII podría ser considerada como un grupo heterogéneo de desórdenes, siendo cada uno de los componentes de la misma un defecto oligogénico debido a la interacción de un pequeño número de genes y con la contribución de determinados genes modificados, algunos de los cuales pueden ser compartidos por ambas manifestaciones [225].

La intensa investigación genética, aunque con escasa utilidad clínica permite la detección de variantes genéticas que desempeñan un papel en el desarrollo de una determinada patología. Los estudios de asociación genética han propuesto más de 30 loci relacionados con la EI hasta el día de hoy [226], confirmándose así la hipótesis de una enfermedad poligenética compleja:

- **IBD1**: localizado en el cromosoma 16, fue el primero en descubrirse y el que cuenta con un mayor apoyo científico [227]. Es el gen *NOD2/CARD15*, localizado en 16q21 [228, 229], cuya modificación está relacionada con la EC [230-232]. Esta relación no ocurre en todos los grupos poblacionales, ya que por ejemplo no sucede en Asia [233-235]. Se han caracterizado tres mutaciones diferentes en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg and Leu1007insC). De igual forma, estas mutaciones se relacionan con una localización ileal y no colónica, excluyendo asimismo a la CU [236, 237]. La proteína codificada por el gen en cuestión (*NOD2*) pertenece a una superfamilia de reguladores de la apoptosis expresada en monocitos, y por tanto, sus variantes dan lugar a una muerte celular programada alterada en este tipo celular; por otro lado, las variaciones de *NOD2* alteran la interacción de la proteína *NOD2* con el muramildipéptido (MDP) o el LPS, modificándose la activación del factor de transcripción nuclear NFκβ, que se traduce en una activación deficiente de dicho factor de transcripción y a un fallo en la respuesta desencadenada por las bacterias que se encuentran en el lumen [238, 239]. Por otro lado, la activación de NFκB a través de TLR (Toll like receptors, receptores tipo Toll) puede aumentar debido a la mutación del gen *NOD2*, ya que la proteína en cuestión actúa modulando este proceso, es decir, frenando la activación de este factor de transcripción.

- **IBD2**: localizado en la región 12q14. Aunque en un principio se postuló la existencia de dos *loci* diferentes, uno para EC y otro para CU, la asociación con la última es más importante [240-242]. Aunque se han investigado varios genes dentro de esta región, en la mayoría de los casos sólo se han obtenido resultados poco concluyentes, como en el caso del IFN-γ [243, 244], el *NRAMP2* [245], la metaloproteinasa 18, el receptor de la vitamina D (*VDR*) [246, 247], la integrina β7, la queratina 8 [248] o la advillina [249]. O bien se han obtenido resultados controvertidos, como en el caso de *STAT-6* [250-253].

- **IBD3**: localizado en 6p21.3. Incluye diferentes genes candidatos dentro del complejo principal de histocompatibilidad, algunos de los cuales, concretamente diferentes alelos dentro del MHC de clase II podrían estar relacionados con la CU, como *HLA-DR2*, *HLA-DRB1*1502*, *HLA-DR9* y *HLA-DRB1*0103* [254, 255] y con una localización exclusivamente colónica de la EC [256]. El gen que codifica para la citoquina TNF-α se encuentra asimismo

dentro de esta región, y la mutación -308 G/A SNP se ha relacionado con un riesgo elevado de CU [257-260], aunque otras mutaciones en el mismo (-857 C/T SNP por ejemplo) parecen disminuir el riesgo de padecer EII [261, 262].

- **IBD4**: localizado en el cromosoma 14, en la región 14q11-q12 está relacionado con la susceptibilidad para padecer EC [263-265]. Entre los genes candidatos se encuentran los que codifican el receptor de células T α/δ (TCR), la IL-25, citoquina relacionada con la respuesta Th2 y con capacidad limitante de procesos inflamatorios patológicos a nivel del tracto gastrointestinal [266], aunque la relación de este gen con la enfermedad es controvertida [267].

- **IBD5**: situado en la región 5q31-33, es junto con el IBD1 uno de los *loci* más estudiados en la EII, relacionado concretamente con la EC, con un comienzo temprano de la misma o con una elevada frecuencia de la enfermedad perianal [268-274]. También se ha relacionado recientemente con la CU, aunque esta asociación es mucho menos convincente hasta el momento [275]. El gen que codifica el transportador de cationes orgánicos (OCTN) se ha asociado con la EC, fundamentalmente con una localización colónica y no exclusivamente ileal, aunque también con la CU, de forma menos importante [276-281]. Su relación con la EII podría explicarse por la alteración en la erradicación de los patógenos lumbinales que se produce de forma asociada a la mutación de dicho gen. El gen DLG5 (10q22-23), relacionado con la integridad de las células intestinales, presenta una vinculación con la EII [282], ya que la mutación del mismo provoca una alteración de la permeabilidad intestinal. La proteína codificada por el gen MDR1 actúa como una bomba dependiente de ATP para la eliminación de toxinas y xenobióticos intracelulares [283], y el polimorfismo de dicho gen se relaciona con la EII. Incluido también en este locus, el polimorfismo del gen que codifica la IL-6 se ha relacionado exclusivamente con la EC [244, 284, 285]. Además, esta región comprende otros genes susceptibles como los correspondientes a las interleuquinas 3, 4, 5 y 13 [286], el factor 1 regulador de IFN γ (IRF-1) [269], el factor 2 estimulante de colonias y una región relacionada con la susceptibilidad a la colitis inducida por DSS en ratón [287].

- **IBD6**: localizado en la región 19p, este locus confiere susceptibilidad a padecer ambas manifestaciones, EC y CU [268, 270, 272, 288, 289]. Contiene genes como el del receptor del tromboxano A2, la hidrolasa de leucotrieno B4, TYK2 y JAK3, si bien sólo existen datos positivos en el caso de la EC fistulizante y el gen de ICAM-1 [290] o el de la subunidad C3 del complemento [291].

- **IBD 7**: este locus, situado en el brazo pequeño del cromosoma 1 contiene el gen que codifica el TGF- β 2, que es una citoquina antiinflamatoria implicada

en el crecimiento y la diferenciación de células epiteliales intestinales [292, 293]. Su asociación con la EC pero no con la CU debe ser estudiada con mayor profundidad [294].

- **IBD8:** localizado en el mismo cromosoma que NOD2 (16p), este locus se solapa a IBD1, pero es independiente del mismo [295].

- **IBD9:** el gen que codifica el receptor de RANTES, es decir, CCR-5, se encuentra en el cromosoma 3 (3p) y confiere susceptibilidad para la EII, y de forma más concreta para las lesiones anales en la EC [296, 297]. Otros genes integrados en este locus son el de CCR-9 o el de la IL-12.

- **Otros genes:** IL23R e IL12B [256, 298-301], ATG16L1 (proteína relacionada con la autofagia 16, similar a 1) [256, 300, 302-309]; IRGM (immunity-related guanosine triphosphate) [310-314]; PTPN2 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2) [310, 311]; TLR [315-318]; NOD1/CARD4 [319]; IL-11 [320]; IL-18 [321].

A priori, cabría esperar que los genes candidatos para la susceptibilidad a EII estuviesen implicados en la regulación del equilibrio entre células inmunológicas, la respuesta a la flora intestinal y la producción y liberación de citoquinas durante la reacción inmunológica y la curación de la mucosa intestinal. Efectivamente, los datos más recientes obtenidos mediante estudios de asociación genómica, indican que los fenómenos o procesos patofisiológicos con potencial importancia en el desarrollo de la enfermedad son la inmunidad innata, la autofagia, la apoptosis, las respuesta Th17 (IL-23) y Th1 (IL-12), la activación de células T y la inmunosupresión [322].

Existe una relación genética entre EC y CU, ya que algunos genes predisponentes son comunes a las dos; si bien otros genes pueden ser los responsables de la aparición o derivación hacia una entidad concreta dentro de la EII. Además de dicha relación entre ambas enfermedades, existe una relación genética de la EII con otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis [323-326], la espondilitis anquilosante [327] o la diabetes tipo I [304], lo cual queda demostrado con la susceptibilidad a padecer dichas enfermedades relacionada con las variaciones o mutaciones con genes asociados asimismo a la EII.

3.2. Factores ambientales

La interacción de los factores ambientales con la genética en un determinado individuo predispuesto puede ser el determinante último de la

evolución y el resultado final de dicha enfermedad en ese individuo concreto. Entre estos factores ambientales se encuentran los siguientes:

- **Estrés:** El tracto gastrointestinal, así como el sistema inmune, pueden verse afectados por esta respuesta, en la que desempeña un papel fundamental el sistema nervioso. El sistema nervioso entérico se encarga de la coordinación de diversas funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal, en particular de la motilidad, el transporte hidroelectrolítico, las funciones endocrinas y exocrinas y la microcirculación [328]. Desde la mitad del siglo XX se ha considerado la EII como un trastorno con un destacable componente psicósomático [329-333], aunque en 1990 se demostró que los estudios llevados a cabo hasta entonces no eran fidedignos, ya que el protocolo experimental en muchos de los estudios en cuestión no era adecuado y podía dar lugar a una interpretación errónea de los resultados [334], lo que hizo que se descartara al estrés como la causa principal de la EII, a lo que contribuyó el avance en el conocimiento de la etiología de la enfermedad, y la implicación de múltiples factores en la misma. Sin embargo, posteriores estudios tanto en animales [335-339] como en humanos [340-343] han demostrado un papel importante del estrés no tanto en la etiología como en la evolución y en la aparición de recaídas en la EII. Los estudios realizados demuestran que el estrés provoca un aumento de la permeabilidad intestinal [344-346] y de la motilidad [347, 348], así como una mayor secreción de agua y de iones [349-351] y una alteración de la interacción entre las bacterias y la mucosa [352], mecanismos que forman parte de las alteraciones en la EII y que pueden contribuir al empeoramiento de la misma. Asimismo se ha demostrado que el efecto del estrés sobre la EII es dependiente de la inervación colinérgica y de los mastocitos [353, 354]. El factor liberador de corticotropina (CRF) juega un papel crucial en dicho efecto, como se ha demostrado en diversos experimentos realizados en animales [355-361]. En humanos los datos disponibles son mucho más limitados, aunque se ha observado un aumento en la expresión de CRF en células mononucleares de *lamina propria* procedente de pacientes con CU [362, 363]. Según lo expuesto, el efecto del estrés en la EII puede explicarse por la activación de neuronas entéricas que liberan neurotransmisores como CRF o sustancia P (SP), las cuales actúan sobre mastocitos produciendo una serie de mediadores que provocan la alteración de la permeabilidad y de la interacción de las bacterias con la función de la barrera epitelial, lo que desencadena la activación de células inmunológicas. Algunos estudios han sido tratado de demostrar el efecto terapéutico en la reducción del estrés en la EII, aunque los resultados son contradictorios [364-366].

- **Dieta:** el epitelio intestinal constituye el primer punto de contacto del individuo con los alimentos ingeridos (fuente de antígenos extraños), y por tanto la respuesta ante éstos puede considerarse como una reacción inmune

controlada. La duración de esta reacción así como la autolimitación de la misma (tolerancia oral) determinan su intensidad, pudiendo actuar dichos antígenos como factores potencialmente causantes de trastornos a nivel del sistema digestivo. En los últimos 40 años se han llevado a cabo múltiples estudios con el fin de valorar la posible relación de diferentes componentes de la dieta con la EII, como la leche y los productos lácteos [367-369], la margarina [370], los cereales [371], la comida rápida [372] o las bebidas de cola [373]. A pesar del esfuerzo realizado, no se ha podido demostrar que ninguno de los alimentos que han sido estudiados sea realmente un componente etiológico de la enfermedad [372-380]. La mayoría de los estudios llevados a cabo relacionan componentes de la dieta occidental con la EII, fundamentalmente las grasas ω -6 y el uso de carbohidratos refinados, como la sacarosa. La alteración del componente lipídico de la dieta y del equilibrio en ácidos grasos de la misma podrían ser los responsables del incremento en la actividad de la enfermedad [380, 381]. Esta hipótesis se ve apoyada por el efecto beneficioso de los ácidos grasos ω -3 en algunos estudios, presentando un efecto antiinflamatorio [382-389]. Preparaciones a base de aceite de pescado conteniendo EPA y DHA han sido beneficiosas en la EC [390-392] y CU [393-397]. Los ácidos grasos de cadena corta y la capacidad de metabolización preferente por parte de los colonocitos podrían representar un mecanismo importante y beneficioso en la enfermedad, especialmente en la CU [398, 399]. Asimismo, la comida rápida, con un alto contenido en grasa, se ha asociado tanto con la CU como con la EC [372, 373].

La lactancia materna disminuye el riesgo en el desarrollo tanto de CU [400-402] como de EC en el niño [403, 404], siendo el riesgo inversamente proporcional a la duración del período de lactancia. Diversos mecanismos pueden explicar esta capacidad protectora de la leche materna, como la protección frente a infecciones gastrointestinales [405-407], la capacidad de potenciar el desarrollo de la mucosa intestinal y de la capacidad inmunológica [408-411], o el retraso del contacto con la leche de vaca, fuente de potenciales infecciones, incluso de *Mycobacterium avium paratuberculosis* [412], y con un efecto perjudicial en la EII [368, 413, 414].

Los pacientes de EII presentan una dieta rica en azúcares refinados con frecuencia [415, 416]. Este tipo de alimentos han sido propuestos como factor de riesgo en EC [378, 417, 418] y en CU [419, 420]. El efecto beneficioso de una dieta con niveles reducidos de azúcares refinados no ha sido confirmado en otros estudios [421]. Un problema fundamental de estos estudios es la asociación entre tabaquismo y consumo de azúcares refinados, de forma que el efecto puede achacarse posiblemente a aquél.

Por otro lado, no se han encontrado evidencias de asociación entre alergias alimentarias y el desarrollo de EII [422, 423], mientras que la aparición de una intolerancia alimentaria en la patogénesis de la enfermedad conlleva dificultades importantes [424, 425].

Todo lo anteriormente expuesto demuestra un potencial papel de la dieta en la etiología de la enfermedad, pero en ningún caso esto ha sido demostrado definitivamente. Los cambios en el estilo de vida que pueden explicar la evolución epidemiológica de la EII no sólo comprenden las modificaciones de los hábitos alimentarios por tanto, otros factores ambientales pueden explicar dicha evolución.

- **Tabaco:** el tabaco es, junto con la apendectomía, el factor ambiental más importante en la etiología de la EII. El comportamiento es diferente en las dos variantes con un efecto protector del tabaco en la CU [426-429] y un empeoramiento en la EC [430-437]. Existe una relación con el sexo, así la importancia del efecto protector es mayor para hombres, y las mujeres son más susceptibles al efecto perjudicial. La acción del tabaco sobre la EII se pone de manifiesto igualmente en la modificación del curso y de las características de la enfermedad ya establecida, ya sea una mejoría en el caso de la CU o una mayor gravedad en el caso de la EC, lo que se materializa en la necesidad de cirugía o de tratamiento inmunosupresor, la aparición de complicaciones (fístulas o estenosis en el caso de la EC, o pouchitis o esclerosis colagenosa en el caso de la UC), recaídas o recurrencias, períodos de hospitalización, etc [433, 438-447]. La acción de la nicotina sobre el sistema inmunológico ha sido demostrada en diversos estudios que exponen un extenso repertorio de efectos por parte de dicha sustancia [448-452], aunque el efecto del tabaco puede deberse, al menos en parte, a otras sustancias presentes en él. El efecto protector en la CU puede deberse a la capacidad del humo del tabaco para disminuir la secreción de IL-8 e IL-1 β [453], junto con la hipoperfusión a nivel rectal [454]. La explicación mecánica en el caso de la EC puede ser la potenciación de la isquemia multifocal gastrointestinal por parte del tabaco y en concreto el CO contenido en él, que impide la vasodilatación de los microvasos implicados en la zona inflamada, lo que da lugar a la aparición de ulceraciones y fibrosis [454, 455].

La terapia farmacológica basada en la nicotina ha demostrado ciertos efectos beneficiosos en la CU [456-458]. El mecanismo para su uso terapéutico en la CU es desconocido, aunque un efecto a nivel de la motilidad intestinal junto con acciones antiinflamatorias podría explicar esta opción. Su administración se realiza mediante parches transdérmicos, aunque existen otras posibilidades con menores niveles sanguíneos y por

tanto, menos efectos adversos, como las formulaciones orales o rectales o las de liberación retardada.

- **Apendectomía:** la extirpación del apéndice, especialmente en edades tempranas, conlleva un efecto inmunomodulador que determina la protección frente al desarrollo de CU [459-464]. La apendectomía realizada antes del desarrollo de la CU supone una reducción en la incidencia de la enfermedad, una mayor edad de debut, una enfermedad menos activa, una reducción de la necesidad de corticosteroides o azatioprina, así como una menor tasa de recaídas y riesgo de colectomía [465-467]. De hecho, el número de individuos sometidos a este tipo de intervención dentro del grupo de pacientes con CU es reducido [189].

- **Anticonceptivos orales:** el uso prolongado de anticonceptivos orales es un factor controvertido en cuanto a su contribución al desarrollo de la EII [468, 469], de forma especialmente importante en la EC [470-472], pero también en la CU [473]. La evolución de la enfermedad parece no ser modificada por la anticoncepción oral [474]. El mecanismo implicado puede ser la formación de microtrombos y de infartos locales a nivel de la microvasculatura intestinal [455].

- **Flora bacteriana entérica:** la pérdida de tolerancia frente a la flora comensal entérica es una de las hipótesis etiopatogénicas de la EII [475-477], es decir, las bacterias no patogénicas que colonizan el intestino participan en la patogénesis de la EII [478, 479]. Junto al papel de la flora comensal, un desequilibrio entre ésta y las bacterias potencialmente patógenas en el intestino podría tener un papel importante en el desarrollo de la EII, así existe una mayor cantidad de bacterias adherentes en pacientes con EC que en individuos control [480, 481]. Las bacterias de la flora entérica promueven la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas por parte de las células epiteliales intestinales [482-485]. La activación de las células epiteliales mediante la estimulación de TLR constituye un mecanismo inmunológico de tipo innato que puede participar en dicha interacción, ya que los TLR expresados en la superficie de las células epiteliales reconocen patrones moleculares de la estructura de los microorganismos, por lo que las bacterias comensales son una importante fuente de ligandos para TLR. Las alteraciones en el perfil de estos receptores puede dar lugar a una respuesta equívoca frente a la flora intestinal en el caso de los pacientes de EII [318, 486-492].

Por otro lado, las defensinas son péptidos con carácter antimicrobiano producidos por las células intestinales (células de Paneth) y cuyo papel en la patogénesis de la EII, especialmente en la EC, se está analizando en la actualidad [257, 493-498]. Diferentes estudios muestran

una menor producción de defensinas en el epitelio intestinal de pacientes con EC, pero no en CU [499, 500]. Las defensinas a nivel intestinal participan en el mantenimiento del equilibrio entre la protección frente a los patógenos y la tolerancia a flora entérica normal [501]. Una alteración en el patrón de expresión o comportamiento de las mismas puede estar implicada en la etiología de la EII, lo que demuestra el papel de la alteración de flora intestinal en la EII.

La manipulación de la flora entérica se ha propuesto como una de las estrategias terapéuticas plausibles en el manejo de la inflamación intestinal crónica. Se han realizado diversos estudios con animales, así como algunos ensayos clínicos, para verificar el efecto de antibióticos, prebióticos y probióticos en la EII. El uso de antibióticos se ve limitado por el riesgo de crecimiento excesivo de ciertas especies patógenas, la eliminación de parte de la flora comensal, la falta de especificidad y el desarrollo de resistencia a largo plazo. Varias son las moléculas con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras que han sido ensayadas o estudiadas, como el ciprofloxacino [502-507], fármacos antituberculosos [508-518], agentes antituberculosos específicos frente a *Mycobacterium paratuberculosis* [519]; el trimetoprim [520, 521] o la rifaximina [522-525], entre otros, aunque los únicos datos concluyentes son aquellos que avalan el uso del metronidazol en la EC perianal [526-529].

Otro hecho que demuestra la dependencia de la flora intestinal en el desarrollo de la CU o la EC es la existencia de modelos experimentales de colitis espontánea en animales en los que la enfermedad sólo se desencadena en condiciones ambientales normales, es decir, en presencia de microorganismos que puedan colonizar el intestino y constituir la flora entérica, lo que demuestra el papel de la flora intestinal en el desarrollo de la EII. Éste es el caso de los ratones knockouts de IL-2 y TCR α [530, 531]. Debido a la importancia de la flora bacteriana en esta tesis doctoral, este apartado se desarrollará en el apartado III (INFECCIÓN BACTERIANA INTESTINAL).

La manipulación de la flora entérica se ha propuesto como una de las estrategias terapéuticas plausibles en el manejo de la inflamación intestinal crónica. Con este fin, se han utilizado probióticos y prebióticos.

El término probiótico define a los microorganismos vivos (bacterias o levaduras) que se ingieren en la dieta con la capacidad de alterar la microflora entérica, dando lugar a un efecto beneficioso para la salud [532, 533]. Se han observado interesantes efectos beneficiosos de los probióticos en modelos animales de colitis [534-543]. Los datos en animales han planteado la necesidad de estudios del uso de probióticos en humanos mediante los ensayos clínicos oportunos. En la CU destaca la capacidad de

mantenimiento de la remisión por parte de *Escherichia coli* cepa *Nissle 1917* [544-548], *Lactobacillus acidophilus* o *Bifidobacterium bifidum* [549]. Una mezcla de probióticos, el VSL#3, que contiene *Lactobacillus*, bifidobacterias y una especie de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, previene y mejora la pouchitis y potencia el mantenimiento de los períodos de remisión en la CU [550-552]. En la EC diversos estudios sugieren que *Saccharomyces boulardii*, una levadura probiótica, presenta cierta eficacia [553-555] o, en menor medida, *E.coli Nissle 1917* [556, 557] o *Lactobacillus casei* [558].

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon. Numerosos estudios en animales utilizando modelos de inflamación intestinal han demostrado que los prebióticos pueden ejercer efectos antiinflamatorios [559]. De hecho, entre otras acciones, se ha demostrado que los prebióticos puede estimular el crecimiento de bifidobacterias, incrementar la producción de IL-10 e inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-2 e IFN γ), acciones que podrían contribuir al control de la inflamación.

3.3. Factores inmunológicos

Como se ha indicado anteriormente, una respuesta inmune exacerbada frente a componentes lumbinales es la causante de la EII en los individuos genéticamente predispuestos, aunque muchos aspectos de esta respuesta no se conocen de forma certera y/o global hasta la fecha. Los modelos experimentales en animales han permitido la estandarización de los factores genéticos y ambientales para permitir así profundizar en los mecanismos inmunológicos de la patología. Los principales actores en esta reacción inmune incontrolada son los linfocitos T CD4+ [176, 560, 561]. Considerando los distintos subtipos de linfocitos CD4+, la EII no puede explicarse como un mero desequilibrio entre la respuesta Th1 y Th2, sino que una respuesta efectora exacerbada, ya sea de tipo Th1, Th2 o Th17 puede ser perjudicial y dar lugar a la EII, provocando un daño tisular como consecuencia indirecta de las citoquinas de dicha respuesta inmune, como por ejemplo el TNF- α [562] y no una acción directa de citotoxicidad. Tradicionalmente, según el paradigma Th1/Th2, la EC parece ser una respuesta exacerbada de tipo Th1, con un incremento de células T productoras de IFN- γ [563-566], aumento en los niveles de proteína y de ARNm que codifica IL-12 [567-569] y mayores niveles del factor de transcripción STAT-4 [570]. Por el contrario, la CU ha sido calificada como de tipo Th2 (aunque atípica), ya que se produce un aumento en la producción de IL-5 y una reducción de IL-13 en mucosa, aunque no se observe un

incremento de la IL-4 [571-574]. Sin embargo, la idea excluyente entre Th1 y Th2 es demasiado simplista, y es posible que las dos respuestas coexistan, hasta cierto punto; de hecho, linfocitos T aislados de *lamina propria* de tejido colónico afectado por la CU producen mayores cantidades de IFN- γ que aquellas que proceden de individuos sanos [571], lo que prueba la participación de la respuesta Th1 en la CU y por tanto la posibilidad de una respuesta mixta. Recientemente, la contribución de la respuesta Th17 como efector en la EII ha sido puesta de manifiesto, especialmente en el caso de la EC [575-578]. Junto con el aumento de los procesos efectores, una disminución de la función de las células T reguladoras y de las citoquinas antiinflamatorias que éstas y otros tipos celulares producen pueden llevar a la descompensación inmunológica y a la consiguiente inflamación crónica. Estudios en animales demuestran la importancia de las células T reguladoras (CD4+ CD25+ Foxp3+) en la EII, los cuales han sido recopilados recientemente en una revisión [579]. En cambio, además de las células T CD4+, existen otros tipos celulares que pueden intervenir en el desarrollo y mantenimiento de la EII, como células T CD8+ [580-583], células Natural Killer o NK [584], células T NK [585], células dendríticas [586-590] y células productoras de anticuerpos o linfocitos B [591, 592], entre otras.

4. Fisiopatología

En la EII, tanto en la EC como en la CU, existe una activación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa, lo que conlleva una pérdida de tolerancia frente a las bacterias comensales entéricas [593, 594]. Las citoquinas y las quimioquinas juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta respuesta [595], ya que en estos individuos se produce un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias o activadoras y las antiinflamatorias o reguladoras [596-599], lo que implica la descompensación entre los mecanismos activadores que aseguran la protección frente a microorganismos patógenos, y los mecanismos inhibidores que evitan la exacerbación de dichos procesos y permiten la tolerancia oral a los alimentos y a los microorganismos de la flora entérica. De hecho, la inhibición de citoquinas proinflamatorias o el aumento de las antiinflamatorias dan lugar a la reducción de la inflamación en varios modelos animales de inflamación intestinal [600-602]. Los antígenos luminales van a ser captados por las células presentadoras de antígenos (APC), es decir, macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, donde van a ser procesados y presentados a través de las moléculas de MHC-II a los linfocitos T vírgenes para que éstos sean activados. La acción de estos antígenos sobre las APC provoca la liberación de diversas citoquinas por parte de estas células. Entre estas citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23, IL-27),

algunas van a promover la polarización de los linfocitos T vírgenes o de tipo Th0 hacia el subtipo Th1 (IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- α), 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 , LT) que participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; o bien hacia el subtipo Th17 que produce IL-17, IL-22 o IL-21 entre otras, y cuya diferenciación depende de la existencia de IL-6 y cantidades reducidas de TGF- β [603-606]. La inducción de la respuesta Th2 está orquestada 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 de los linfocitos Th0 hacia células Treg, en la que participa de nuevo el TGF- β hace que, una vez activadas, estas células liberen 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 o contrarrestadas por el carácter proinflamatorio de la respuesta. Con la misma función protectora o antiinflamatoria podemos encontrar los linfocitos T pertenecientes al subtipo Th3, que producen elevadas cantidades de TGF β . Otras de las citoquinas producidas por las APC van a presentar por sí mismas un 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. La activación de macrófagos y células epiteliales conlleva la producción por su parte 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. También son producidas citoquinas antiinflamatorias como consecuencia de la activación de macrófagos y células epiteliales, como la IL-1RA o la IL-11, que son igualmente incapaces de frenar la masiva inflamación en los pacientes de EII. Así, 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 (Figura 5).

En la mucosa se produce una alteración de la microcirculación, debido a la acción de los mediadores inflamatorios que provocan vasodilatación e hiperemia, lo que favorece la dilatación arteriolar y la consiguiente salida del líquido hacia el intersticio, provocando un edema [607]. Los mismos mediadores inflamatorios van a dañar la función de barrera del endotelio. La contracción de las células endoteliales y el aumento de la permeabilidad vascular empeoran dicha situación, ya que permiten la extravasación de proteínas. A continuación se produce la adhesión de leucocitos a la pared endotelial y la subsecuente migración de dichas células hacia la mucosa intestinal, en la que participan las moléculas de adhesión

expresadas en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, como las selectinas o las moléculas de adhesión endotelial [608]. Los leucocitos en el intersticio interactúan con diversas sustancias dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [609-611], que van a provocar el daño del epitelio y del intersticio de la mucosa. El paso final en este proceso de migración celular es la formación de abscesos en las criptas.

La preservación de la integridad funcional de la mucosa intestinal depende de la capacidad de la misma para defenderse de agentes lumenales nocivos y de la reparación cuando existe una lesión. Existe pues un equilibrio entre los mecanismos destructivos y reparativos. El primer paso en el restablecimiento de la continuidad de la superficie epitelial dañada es la restitución, en la que las células epiteliales migran hacia el margen de la herida o lesión [612, 613]. A continuación, la proliferación celular permitirá la sustitución de las poblaciones celulares que se han perdido como consecuencia de la lesión en cuestión. Las poblaciones celulares que se encuentran a nivel subepitelial pueden modular la reparación del daño epitelial de forma indirecta mediante la producción de factores solubles y moléculas de la matriz extracelular, pero además pueden tener un efecto directo debido a la existencia de poros en la membrana basal que permiten la migración de células, por ejemplo desde la *lamina propria*.

El proceso inflamatorio va a inducir una serie de modificaciones de la biología y función de las células epiteliales intestinales. Los síntomas clínicos asociados a la EII debidos a la alteración del epitelio son la diarrea, la pérdida de peso, la malnutrición y los cambios en la homeostasis de fluidos y electrolitos. Por otro lado, la alteración de la función de la barrera epitelial permite o facilita la estimulación del sistema inmune local por parte de los antígenos lumenales [614, 615], y por tanto favorece el mecanismo causante en primer término de la inflamación. Existe una relación recíproca entre el epitelio intestinal y el proceso inflamatorio a nivel de la mucosa, pudiendo verse afectados uno y otro en ambos sentidos. Así, durante la inflamación es posible que moléculas implicadas en el daño de la mucosa asociado a la inflamación (citoquinas, factores de crecimiento...) alteren la función de células epiteliales, así como la interacción entre células inmunes y células epiteliales intestinales puede alterar la función epitelial, lo que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, las células epiteliales intestinales pueden contribuir a la respuesta inmune que se desarrolla en la inflamación, ya que los enterocitos actúan como células presentadoras de antígenos [616].

La motilidad intestinal también sufre alteraciones en la colitis, de forma general puede decirse que la motilidad se encuentra disminuida en dicha patología [617]. La inflamación y los mediadores producidos provocan

modificaciones en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso entérico [618, 619] del mismo modo que el sistema nervioso entérico puede modular la respuesta inflamatoria [620], al igual que lo hacen el sistema nervioso autónomo o el central [618].

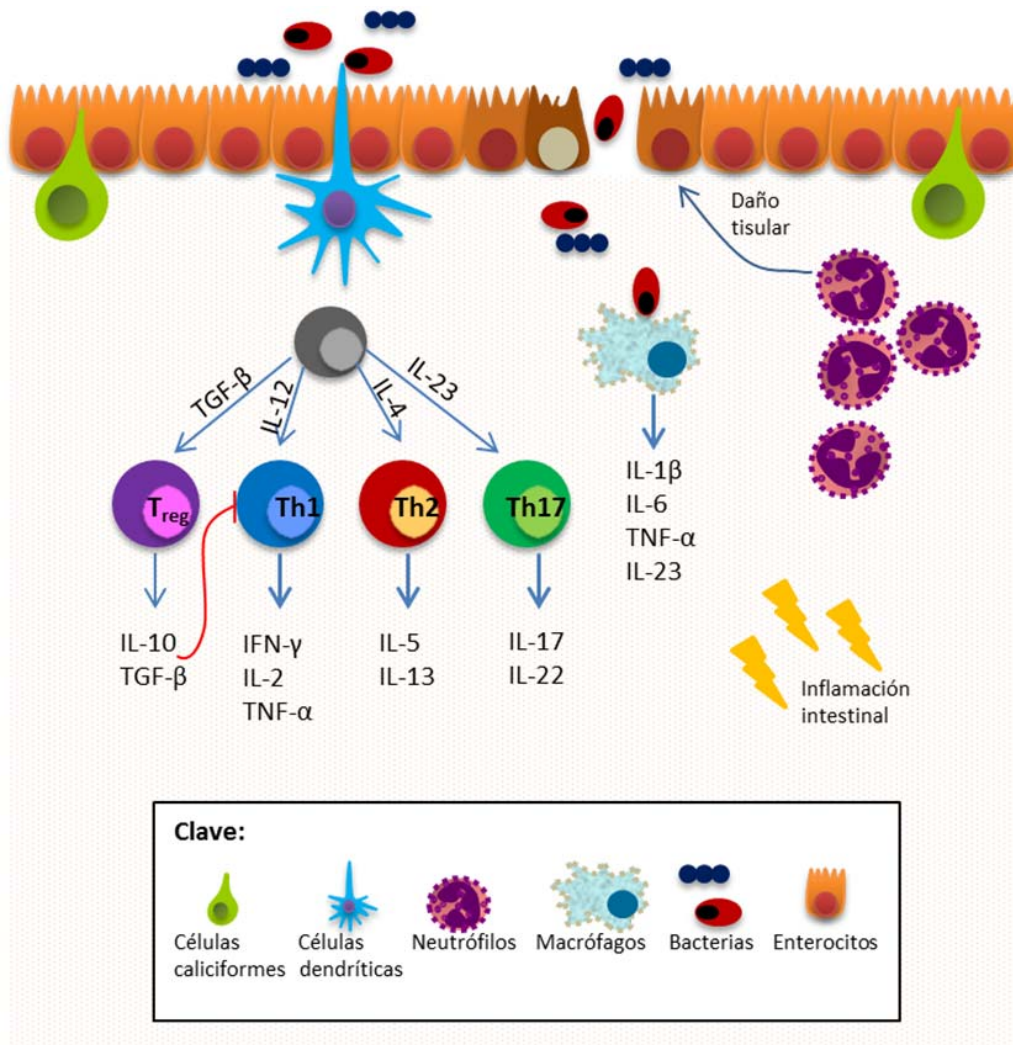


Figura 5. Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Además de la inflamación intestinal, la EII lleva consigo 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 pérdida de peso [621, 622], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [623] o la fiebre [624]. Las consecuencias

hematológicas son múltiples: anemia [625-633]; alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria; o leucocitosis [634]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, y puede ser que el mayor riesgo observado en algunos estudios se deba a uso de terapia inmunosupresora y no a la propia enfermedad [635-637].

La EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. Dicho riesgo es tanto mayor como la duración, la extensión y la severidad de la EII [638-640]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear κ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [641], ya que controla la transcripción de genes que codifican para moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y que han demostrado una relación con el desarrollo de cáncer, como la enzima inducible ciclooxigenasa2 [642, 643] o la citoquina proinflamatoria TNF- α [644, 645]. Así mismo, las rutas que se encuentran por encima de la activación de NF κ B pueden jugar un papel importante en el desarrollo del proceso maligno, como por ejemplo la interacción entre los TLR y sus respectivos ligandos que, en ciertos casos dan lugar a la activación de dicho factor de transcripción.

5. Vías de señalización implicadas en la EII

5.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B)

La familia NF- κ B o Rel está constituida por 5 péptidos diferentes que se unen entre sí formando dímeros, siendo el prototipo de éstos el formado por p50/p65 (Rel A) [646-650]. La forma inactiva de NF- κ B se localiza en el citosol debido a la unión del dímero a una proteína inhibidora llamada I κ B (α , β o ϵ) que impide su translocación al núcleo [648, 651-653]. La activación de NF- κ B se puede producir por dos vías, la vía clásica y la vía alternativa, aunque en ambos casos el resultado final es la translocación al núcleo del NF- κ B [654].

La activación de la vía clásica, también conocida como canónica, se lleva a cabo por diversos estímulos (citoquinas, agentes que provocan daños a nivel del DNA, o microorganismos), dando lugar a la fosforilación de I κ B por el complejo IKK (kinasa de I κ B), formado por dos subunidades catalíticas (α y β) con capacidad kinasa y una molécula adaptadora llamada NEMO [655-658]. La fosforilación de I κ B provoca su disociación del dímero de proteínas Rel, su posterior poliubiquitinación por E3I κ B [659] y su degradación proteolítica por la subunidad 26S del proteasoma [653]. La disociación de I κ B

deja expuestas las señales de localización nuclear en el dímero, que se transloca al núcleo, donde interacciona con los elementos reguladores de NF- κ B presentes en los promotores de diversos genes, dando lugar a la transactivación de los mismo [660] (Figura 6).

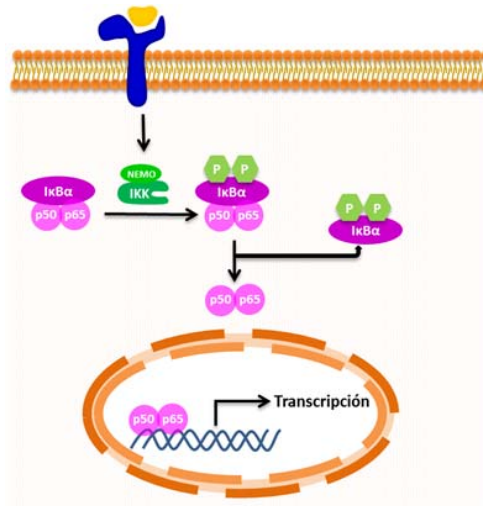


Figura 6. Vía clásica de transducción de señal regulada por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B)

En la vía alternativa participan dímeros de p100/RelB, sin embargo, NEMO no es indispensable [649, 661]. Esta vía se activa por diversos estímulos, como la linfotoxina-B que provocan la activación de la kinasa inducida por NF- κ B (NIK), la cual fosforila y activa al complejo IKK α que a su vez fosforila la proteína p100, que se procesa y actúa liberando al dímero p52/RelB, que se translocar  al núcleo [662, 663].

Existe un mecanismo de autorregulación de NF- κ B en virtud del cual su activación lleva aparejada el aumento en la expresión de I κ B, lo que permite que la nueva proteína sintetizada capture los dímeros libres en el citosol o incluso viaje hasta el núcleo para capturar las subunidades que ya han sido activadas y devolverlas al citosol y por tanto regular o controlar el funcionamiento del factor de transcripción y la vía en sí, es decir, un mecanismo de feedback negativo.

El factor de transcripción nuclear NF- κ B está implicado en el control de la expresión de diversos genes inducibles relacionados con la inflamación y la proliferación [664, 665]. Existen diversos datos que demuestran un papel crucial de NF- κ B en el proceso inflamatorio que caracteriza a la EII. Modelos experimentales de colitis en animales que muestran una activación de este factor de transcripción, y el bloqueo de NF- κ B mediante diferentes

estrategias supone una mejora del estado de los animales y de la colitis [666-668], así como en modelos celulares [669]. Por otro lado, la expresión así como el estado de activación de NF-κB, se encuentran incrementados en biopsias humanas de pacientes con EII [666, 670]. Aunque la inducción en la producción de mediadores proinflamatorios como consecuencia de la activación de NFκB a nivel de células epiteliales intestinales es un hecho demostrado [671], en los últimos años se ha descubierto un posible papel protector en la activación de dicho factor de transcripción en el epitelio intestinal, ya que su inhibición provoca un empeoramiento de la EII en modelos experimentales con ratones transgénicos [672, 673].

5.2. Mitogen-activated protein kinasas (MAPK)

Dentro de la superfamilia MAPK (mitogen-activated protein kinases), existen tres familias diferentes: p42/44 extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAP, c-JUN NH2-terminal kinase (JNKs) y p38 MAPK, con capacidad para regular varias funciones celulares (Figura 7). La regulación llevada a cabo por p38 sobre la respuesta de citoquinas y mediadores proinflamatorios es relevante [674]. La inhibición de la fosforilación de p38 da lugar a la reducción en la producción de citoquinas por parte de macrófagos [675], y ha demostrado ser eficaz en varios modelos animales de inflamación [676]. La activación de JNK a nivel de mucosa intestinal de pacientes con EII se produce fundamentalmente en zonas con enfermedad activa y se localiza en células intestinales, macrófagos y linfocitos [677, 678]. Además, el uso de inhibidores de JNK solo parcialmente específicos supone una mejora en modelos experimentales de colitis inducida por DSS [677, 679].

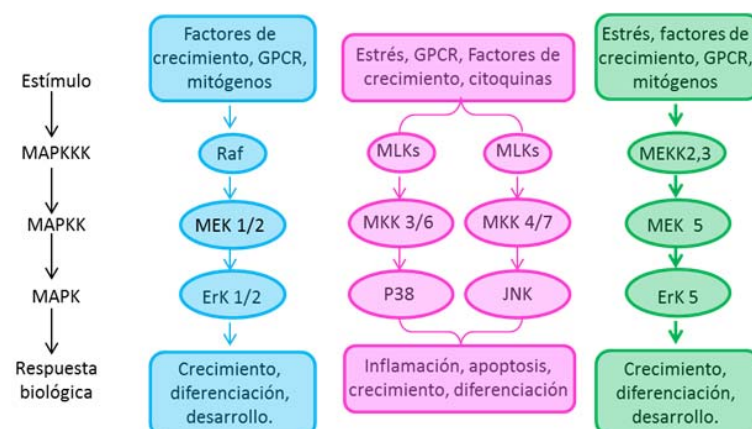


Figura 7 . Cascada de señalización de las MAPK.

5.3. JAK-STAT

La interacción de una citoquina con su receptor desencadena una serie de modificaciones a nivel citoplasmático y nuclear que constituyen la vía de señalización de dicha citoquina. El complejo JAK-STAT participa en dicho proceso (Figura 8). La participación de los distintos miembros de la familia STAT en la respuesta a citoquinas es específica en algunos casos, como STAT-1 e IFN- γ , STAT-4 e IL-12 o STAT-6 e IL-4; pero no siempre es así, como queda demostrado en el caso de STAT-5, el cual participa en la respuesta a una gran variedad de citoquinas y otros mediadores. La modulación de la actividad de STAT y la consecuente aparición de inflamación intestinal en modelos animales ha demostrado la participación de dicha vía en la EII, aunque dicha modulación depende de la subunidad concreta de STAT y de la citoquina implicada en su actividad [680, 681].

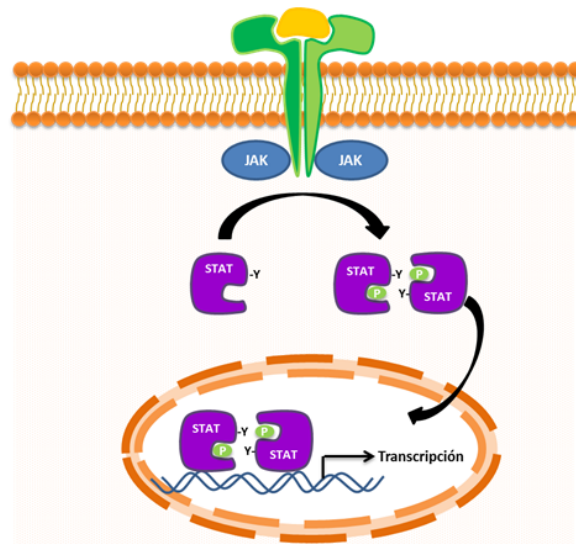


Figura 8. Representación esquemática de la vía de señalización JAK-STAT. La activación de las JAKs tras la estimulación con citoquinas da lugar a la fosforilación de las STATs que dimerizan y son translocadas al núcleo donde activan la transcripción genética.

5.4. PPAR- γ

Con una gran importancia en la fisiología del adipocito y en el proceso de sensibilidad a la insulina, PPAR- γ forma parte de una familia de receptores nucleares de hormonas, y puede ser activado por una gran variedad de ligandos que da lugar a una modulación de la transcripción de diferentes genes [682, 683]. Una vez activados, PPAR- γ forma dímeros con el

receptor retinoide X (RXR) para unirse a elemento de respuesta a PPAR (PPRE) en los genes diana. Ensayos en animales demuestran un efecto antiinflamatorio de las tiazolidindionas, ligandos de PPAR- γ , en modelos de colitis en animales [684]. Igualmente, se están llevando a cabo los primeros ensayos clínicos con rosiglitazona y asociaciones de la misma con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) en el tratamiento de la EII [685].

6. Tratamiento de la EII

El desconocimiento de la etiología dificulta el tratamiento de la EII. Existen diferentes estrategias terapéuticas para intentar controlar la enfermedad. Podemos hablar principalmente de tratamiento farmacológico, nutricional y quirúrgico.

6.1. Tratamiento farmacológico

6.1.1. Aminosalicilatos

Las formulaciones orales y rectales de mesalazina (o ácido 5-aminosalicílico: 5-ASA) y sus profármacos (sulfasalazina, olsalazina) son el tratamiento de primera elección para la inducción y el mantenimiento de la remisión en pacientes con CU de leve a moderada [686-691]. Éstos, ejercen un efecto antiinflamatorio, dependiente de la porción 5-ASA [692, 693] que va a ser liberada en el colon por medio de las azoreductasas de la flora intestinal, lo que implica que no sea útil en la EC que se manifieste más allá del intestino delgado [694]. Para evitar este problema, se han desarrollado formas de liberación controlada de mesalazina.

Aunque el mecanismo de acción no está completamente dilucidado, el efecto antiinflamatorio de los aminosalicilatos parece residir en la alteración del factor de transcripción NF κ B y la consecuente modificación en la producción de determinados mediadores inflamatorios como citoquinas, moléculas de adhesión o enzimas. Así, aminosalicilatos como la sulfasalazina bloquean la actividad NF κ B mediante la inhibición de la degradación de I κ B α [695-697], mientras que la molécula de 5-ASA en su forma libre impide la fosforilación de RelA [698]. A esto ha de sumarse la capacidad para eliminar ROS y la inducción de la apoptosis [699-703]. Por otro lado, los aminosalicilatos pueden poseer mecanismos que contribuyen al efecto antiinflamatorio y que son independientes de la porción 5-ASA, como el bloqueo de la unión de receptores de citoquinas *in vitro* ejercido por la sulfasalazina [704] o la olsalazina [705]. Otros efectos son la inhibición de la

producción de leucotrienos quimioatrayentes en CU por parte de 5-ASA [706]; o la capacidad de protección frente al daño celular y a la apoptosis inducida por estrés oxidativo ejercida por los aminosalicilatos sobre el epitelio intestinal [707, 708] y el aumento de la proteína de choque térmico [709]. El efecto final será una reducción en el tráfico leucocitario [710].

Los efectos adversos de los aminosalicilatos tienen lugar en un 10-45% de los pacientes, dependiendo de la dosis. Los más comunes son dolor de cabeza, náuseas, dolor epigástrico, diarrea, y oligospermia en hombres. Rara vez se dan reacciones idiosincrásicas serias como síndrome de Steven-Johnson, pancreatitis, agranulocitosis o alveolitis. Un 15% de los pacientes presentan intolerancia a la mesalazina [711-713].

La eficacia de la mesalazina en el tratamiento de la CU de leve a moderada está establecida, a pesar de que el efecto y el tiempo de acción del tratamiento único por vía oral son modestos [714]. Regímenes de dosis altas son seguros y mejoran la eficacia pero se obtienen más beneficios combinando la terapia tópica y con la oral. Esta terapia por vía tópica será diferente en función del tipo de CU: supositorios para la proctitis, espumas-enemas para colitis lateral izquierda y soluciones rectales para pancolitis. El tratamiento de mantenimiento con sulfasalazina reduce el riesgo de relapso en pacientes con CU y probablemente el riesgo de padecer cáncer colorectal [715]. Sin embargo, la evidencia para la eficacia de la mesalazina en la EC tanto para el tratamiento de la actividad o la remisión no es convincente [716-718].

6.1.2. Antibióticos

Los antibióticos juegan un papel importante en el tratamiento de las complicaciones de la EI, como abscesos o sobrecrecimiento bacteriano [719]. Los antibióticos más empleados en el tratamiento de la EC son metronidazol y ciprofloxacino. De hecho, el tratamiento con metronidazol en la pouchitis (complicación que aparece en más del 50% de los pacientes operados de la bolsa ileal [720]) produce una mejora clara en la inflamación y la diarrea [721].

6.1.3. Glucocorticoides

Los glucocorticoides constituyen un grupo de potentes agentes antiinflamatorios para el tratamiento de la EC de moderada a grave [722]. Estos actúan inhibiendo diferentes vías de inflamación: suprimiendo la transcripción de interleuquinas, suprimiendo el metabolismo del ácido araquidónico y estimulando la apoptosis de los linfocitos de la *lamina propria* del intestino.

Los glucocorticoides más utilizados por vía oral son la prednisolona, prednisona y budesonida y por vía intravenosa hidrocortisona y metilprednisolona. Además se emplean la hidrocortisona, prednisolona metasulfobenzoato, betametasona y budesonida en supositorios, espumas tópicas y enemas líquidos. La administración prolongada de glucocorticoides da lugar a la aparición de efectos secundarios, por lo que la utilización de formas farmacéuticas tópicas puede maximizar el efecto antiinflamatorio disminuyendo los efectos adversos sistémicos.

Pueden aparecer efectos adversos de diverso tipo: metabólicos, inmunitarios, cardiovasculares, cutáneos, osteoarticulares, hormonales, neuropsiquiátricos u oculares. El riesgo se incrementa conforme aumenta la duración de exposición al fármaco y la dosis administrada [723]. Ciertos efectos adversos de los glucocorticoides poseen una especial relevancia en el caso de la EI, como la hiperglucemia, la esteatohepatitis no alcohólica o el riesgo elevado de osteoporosis [724, 725].

Existe un fenómeno de resistencia o refracteriedad al efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides, mediado por un mecanismo molecular aún desconocido. Así, en estos pacientes no se consigue una remisión de la enfermedad activa. Otro aspecto importante en la utilización de los glucocorticoides es la dependencia. Los pacientes corticodependientes una vez han superado la fase activa de la enfermedad mediante el tratamiento con corticoides, sufren una reactivación de la enfermedad cuando se procede a la supresión paulatina del tratamiento. Estas dos características de los glucocorticoides suponen una limitación en su utilización en la práctica clínica.

La prednisolona oral ha mostrado su eficacia en la CU induciendo la remisión de la enfermedad de leve-moderada en el 77% de los pacientes tratados durante dos semanas en comparación con un 48% de pacientes tratados con sulfasalazina [726-728]. La budesonida administrada tópicamente ha mostrado ser igual de eficaz que la prednisolona en el tratamiento de la colitis lateral izquierda y la pancolitis [729]. Además, en dos grandes ensayos clínicos, los glucocorticoides han mostrado ser efectivos para la EC, siendo capaces de inducir la remisión de la enfermedad [730-732].

6.1.4. Tiopurinas

Las tiopurinas son antimetabolitos púricos que inhiben la síntesis de ribonucleótidos y se emplean en el tratamiento del cáncer. Su mecanismo inmunosupresor está basado en la inducción de apoptosis de las células T modulando la señalización celular a través de Rac1 [733]. La azatioprina y la

6-mercaptopurina son las tiopurinas más empleadas en el tratamiento coadyuvante de la EC y la CU. La azatioprina es metabolizada no enzimáticamente a 6-mercaptopurina, lo que implica la pérdida del grupo nitro-imidazol, este hecho parece estar relacionado con la menor aparición de efectos secundarios de la 6-mercaptopurina [734, 735]. Esta 6-mercaptopurina es metabolizada en nucleótidos 6-tioguanina, que son los metabolitos activos[736].

Los principales efectos adversos debidos a la azatioprina y a la 6-mercaptopurina pueden clasificarse en dos categorías: alergias, que se manifiestan con pancreatitis, fiebre, erupciones, náuseas, diarrea o hepatitis; o toxicidad relacionada con la dosis que puede dar lugar a depresión a nivel de médula ósea y leucopenia, anemia o trombocitopenia, con un mayor riesgo de infecciones oportunistas o neoplasmas.

La eficacia de estos fármacos depende de la cantidad de nucleótidos de 6-tioguanina que se acumulan en el medio intracelular, y ésta a su vez depende de forma inversamente proporcional de la actividad de la tiopurina metiltransferasa, por lo que el estudio de dicha actividad enzimática en los pacientes que van a someterse a dicho tratamiento es interesante, planteándose incluso la opción de la farmacogenética.

Su utilidad en la EII radica en el empleo en los casos de corticodependencia y corticorrefractoriedad. En el caso de la EC, se amplía su empleo a casos de enfermedad extensa (más allá del colon), a la prevención de recurrencias tras la resección quirúrgica y al mantenimiento de la remisión.

6.1.5. Metotrexato

El metotrexato es otro fármaco empleado en el tratamiento del cáncer ya que sus metabolitos poliglutamados inhiben la dihidrofolato reductasa, aunque este efecto citotóxico no explica su mecanismo antiinflamatorio. Probablemente, la inhibición de la producción de citoquinas y de la síntesis de eicosanoides juega un papel importante. El metotrexato es el agente inmunosupresor de segunda línea para pacientes resistentes o intolerantes a la azatioprina o la mercaptopurina, aunque actualmente no está muy claro si las tiopurinas son más efectivas que el metotrexato en la inducción o mantenimiento del periodo de remisión en la EII.

Debido al riesgo de hepatotoxicidad la administración semanal por vía subcutánea es la más utilizada. Así, es rápidamente eliminado en su forma original a nivel renal, mientras que los metabolitos poliglutamados se acumulan intracelularmente en diferentes tejidos, incluida la mucosa

intestinal. La exposición prolongada al fármaco puede ocasionar toxicidad, siendo los efectos adversos clasificados en tres categorías: efectos antiproliferativos relacionados con la dosis en médula ósea, epitelio intestinal y folículos pilosos; reacciones idiosincrásicas de hipersensibilidad o de tipo alérgico; y daño hepático debido a los efectos acumulativos de la exposición prolongada. La aparición de los primeros determina la necesidad de disminuir la dosis y de la coadministración de ácido fólico [737]; mientras que las reacciones alérgicas (erupciones y pneumonitis) desaparecen tras la retirada del tratamiento. Al igual que en el caso de los glucocorticoides existe la posibilidad de resistencia a metotrexato, debida a un incremento en la expresión de la enzima diana, o a incremento en la salida del fármaco desde el medio intracelular [738].

6.1.6. Inhibidores de la calcineurina: ciclosporina y tacrolimus

La ciclosporina es un inhibidor de la calcineurina, que previene la expansión clonal de poblaciones de células T. Tiene un tiempo de acción rápido y es efectivo en el tratamiento de la CU grave, pero no en EC [739]. El tacrolimus es otro inhibidor de la calcineurina que a veces se utiliza tras la instauración del tratamiento con ciclosporina. En un ensayo clínico llevado a cabo en 2006, se demostró que el tacrolimus es efectivo en el tratamiento de la CU refractaria a esteroides [740].

6.1.7. Terapia biológica: terapia anti-TNF- α

Cuando hablamos de terapia biológica nos referimos a fármacos obtenidos mediante ingeniería genética, generalmente anticuerpos u otras proteínas. Suelen establecerse tres grupos: neutralizadores de citoquinas proinflamatorias (anti-TNF- α), citoquinas (IL-10 recombinante [741, 742]) o sustancias que interfieren con la activación o el tráfico celular (anticuerpos anti-CD4).

Para el tratamiento de la EII se utilizan 2 agentes biológicos anti-TNF- α : infliximab y adalimumab. El infliximab, es un anticuerpo quimérico anti-TNF, 75% IgG humana y 25% murino, que se une al TNF- α soluble y a su lugar de unión en la membrana. Este se administra únicamente por vía intravenosa. El adalimumab es un anticuerpo humanizado que se administra por vía subcutánea. Se utilizan para el tratamiento de la EC y la CU cuando el tratamiento inmunosupresor estándar no funciona.

Los principales efectos adversos son el desarrollo de reacciones en la infusión (con infliximab especialmente) y la inducción de anticuerpos. El más empleado en el caso de EC es el Infliximab, que se emplea en la inducción de la remisión en pacientes con EC moderada y que son resistentes a tratamientos convencionales, siendo muy útil en el cierre de fístulas. La

administración se repetirá de forma periódica para mantener el estado de remisión de la enfermedad. También es útil el periodo que transcurre hasta que se consigue el efecto terapéutico cuando comienza un tratamiento con azatioprina o 6-mercaptopurina, ya que el efecto de la molécula anti-TNF no suele durar más de 2-4 meses.

6.2. Tratamiento nutricional

Es importante conocer el estado nutricional del paciente con EII, ya que puede presentar déficits de calcio, vitamina D, otras vitaminas liposolubles, zinc, hierro y vitamina B12 [743]. Por otra parte, en circunstancias específicas, cuando la capacidad absorptiva del colon se ve comprometida por el síndrome del intestino corto o tras cirugías, algunos pacientes requieren soporte proteico y calórico [744].

6.3. Tratamiento quirúrgico

Casi un 30% de los pacientes con CU requieren finalmente una colectomía (extirpación quirúrgica o resección de una parte del colon) [745-747]. Existe cierta controversia entre la eficacia y la seguridad del tratamiento farmacológico frente a la cirugía en pacientes con colitis aguda grave que no responden a altas dosis de glucocorticoides [748]. Utilizar los tratamientos de segunda elección puede reducir el riesgo inmediato de colectomía, sin embargo algunos pacientes sufrirán relapso y tendrán que ser operados. Además este tratamiento de segunda elección aumenta considerablemente el riesgo de mortalidad [749] y en comparación una colectomía subtotal o ileostomía puede ser una alternativa más segura [750].

6.4 Otros tratamientos

6.4.1. Abandonar el hábito tabáquico

Fumar es un factor ambiental importante para la patogénesis de la EII [751], aunque los mecanismos se continúan estudiando. Los fumadores actuales tienen más riesgo de desarrollar EC y estos tienen un peor pronóstico ya que tienen una elevada probabilidad de colectomía y una mayor probabilidad de anastomosis [428, 433, 752-755]. Dejar de fumar está relacionado con una reducción de un 65% de sufrir relapso comparado con los que continúan fumando, de formar similar a si continuara con un tratamiento inmunosupresivo [756].

6.4.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Varias publicaciones proclaman que los AINEs precipitan la EII *de novo* o exacerba la enfermedad pre-existente, a pesar de esto las evidencias son contradictorias y confusas. La posición actual se ha resumido en un artículo reciente [757]. Hay evidencia de que el daño de la mucosa esta mediado por la inhibición de COX-1 y COX-2. Por lo que la inhibición selectiva de COX-1 o COX-2 junto con dosis bajas de aspirina parece ser segura, al menos a corto tiempo [758].

6.4.3. Terapia génica

La terapia génica consiste en la introducción de un gen activo y funcional en células somáticas con el fin de expresar o inhibir en ellas una proteína terapéutica, mediante el empleo de un vector vírico [759-763]. Se han probado oligonucleótidos antisentido frente a ICAM-1, como el ISIS 2302, pero sus efectos no han podido ser confirmados [545]. La investigación clínica de estos procedimientos se encuentra en un periodo de intensa actividad con el fin de conseguir nuevas estrategias de menos costosas y con una eficacia clínica aceptable.

7. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Podemos clasificar los modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal en roedores en 4 grupos: (1) inducidos químicamente, (2) espontáneos, (3) animales transgénicos y (4) transferencia celular adoptiva.

7.1. Inducidos químicamente

7.1.1. Colitis inducida por ácido acético

Este modelo fue descrito en 1978 por MacPherson y Pfeiffer [764]. Se trata de un modelo de colitis aguda. Tras la administración intrarrectal de ácido acético disuelto en agua en una concentración de 10-50% (V/V) en el que aparece inflamación de la mucosa y/o transmural dependiendo de la concentración y el volumen de ácido acético utilizado.

7.1.2. Colitis inducida por iodoacetamida

La administración intrarrectal de iodoacetamida produce un daño en la mucosa intestinal capaz de disminuir los mecanismos de defensa antioxidantes, provocando un estado colítico caracterizado por diarrea y pérdida de peso, asociado a dilatación colónica y adhesiones. [765, 766]. Se produce una respuesta exacerbada de tipo Th1 con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 [767]. Resulta un modelo de interés para indagar en los efectos beneficiosos de compuestos antioxidantes en la EII.

7.1.3. Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)

Este modelo fue descrito por Okayasu en 1990 [768]. La inflamación colónica se consigue mediante la administración en el agua de bebida de un polímero sintético, el sulfato de dextrano sódico o DSS, en un porcentaje variable. Normalmente, aunque los protocolos pueden diferir en casos concretos, se realizan ciclos en los que se alterna el DSS con el agua de bebida normal. Además del modelo agua, en el que se lleva a cabo un solo ciclo, podemos conseguir una colitis crónica mediante la repetición de ciclos, ya que la enfermedad puede mantenerse en el tiempo. Este modelo crónico, puede dar lugar en ultimo termino a la aparición de cáncer colorrectal mediante la asociación del DSS a un agente carcinógeno como el azosimetano, de forma similar a lo que ocurre en el caso de la displasia y la CU[769].

La colitis se caracteriza por una lesión extensiva, depleción completa de las criptas y una regeneración lenta del epitelio colónico. En el modelo de inflamación aguda, los animales experimentan diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso; mientras que desde el punto de vista histopatológico se observa un daño a nivel de las criptas y de las células epiteliales, infiltración de granulocitos y células mononucleares, edema tisular y ulceraciones. La inflamación colónica, al menos en el caso del modelo agudo no depende de la respuesta inmune adquirida, y por tanto es inducible independientemente de linfocitos, ya que se produce incluso en animales modificados genéticamente que no poseen este tipo celular (SCID) [770]. Juegan un papel crucial las citoquinas producidas por macrófagos, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y la flora bacteriana comensal [771]. En cambio, en la fase crónica se ha demostrado la participación de linfocitos CD4+ en zonas de curación, los cuales producen IFN- γ e IL-4 [772]. De este modo, aunque las alteraciones producidas se asemejan a la colitis ulcerosa, es decir, una respuesta de tipo Th2, los últimos datos indican una respuesta mixta Th1/Th2 [773, 774].

7.1.4. Colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)

El modelo de colitis por TNBS fue descrito originalmente por Morris y col. en 1989, empleando la rata como animal de experimentación (cita). El TNBS se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada previa reacción con las proteínas tisulares (haptención). Existe también un componente de estrés oxidativo. Sin embargo, la contribución del componente inmunológico ha sido establecida por la capacidad de modulación con proteínas hapténadas por vía oral (tolerancia). 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%, el cual permite el acceso del TNBS a la mucosa por un efecto tóxico directo. Se consiguen efectos similares si el TNBS se inyecta en la mucosa (sin etanol). 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 semanas (hasta 8 semanas con la dosis de 30 mg, ver más adelante). A pesar de la implicación de la respuesta inmunológica adaptativa, ésta es prescindible porque, al igual que en el caso del DSS, es inducible en animales sin linfocitos.

El modelo fue adaptado posteriormente al ratón, el cual parece presentar una respuesta inmunológica más “pura” de tipo Th1, frente al carácter mixto del modelo en rata, y una respuesta inicial al etanol más leve [775]. En ambos casos se produce una inflamación transmural, con pérdida de peso, anorexia 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. En el modelo en ratón la cronicidad sólo se consigue a través de un protocolo con administraciones repetidas y periódicas, o mediante un proceso de presensibilización, y se caracteriza por la producción de IL-2 e IL-17 [776]. Aunque se habla de tres tipos de modelos, agudo, estable y crónico, las condiciones no están sistemáticamente definidas hasta la fecha. En esta reacción inflamatoria, la mucosa va a presentar un infiltrado caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4+ que liberan grandes cantidades de IFN- γ e IL-12, pero no IL-4 [775] y de células productoras de IgG e IgM [777]. Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de inhibir la colitis de tipo Th1 desarrollada en este modelo, lo cual queda demostrado en un experimento en el que la administración oral de TNBS previa a la inducción de la colitis inhibe el desarrollo de la enfermedad, debido a la inducción de células CD4+ reguladoras en la *lamina propria* con capacidad para producir TGF- β [777, 778].

7.2. Espontáneos

Se ha demostrado que algunos animales espontáneamente desarrollan colitis. Existen, por ejemplo, varias cepas de animales que desarrollan colitis con mucha frecuencia como son los ratones C3H/HeJBir o los SAMP1/Yit. Los ratones **C3H/HeJBir** son una subcepa de los ratones C3H/HeJ que se generó por cruces selectivos entre los que presentaban el fenotipo de colitis espontánea. Esta cepa presenta un fenotipo muy susceptible a desarrollar colitis que nos aporta nuevos conocimientos en las interacciones entre sistema inmune, ambiente y factores genéticos que dan lugar a la EI [779]. Los ratones **SAMP1/Yit** desarrollan una ileítis similar a la que se produce en la EC, por lo que resulta un modelo muy apropiado para investigar la patogénesis de la EC experimental. De hecho, este fenotipo aparece de forma espontánea sin manipulación genética, química o inmunológica, lo que permite investigar desde el comienzo del desarrollo de la ileítis hasta la fase crónica [780, 781].

7.3. Transgénicos

Determinadas cepas de ratones transgénicos son capaces de desarrollar colitis de manera espontánea, afectando a diferentes partes del intestino y de forma crónica o aguda (Tabla 3).

Modelos	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Enfermedad relacionada	Referencia
IL-10^{-/-}	In. delgado/ Colon	Crónica	Transmural Th1 (inicial) Th2 (final)	CU	[782]
IL-2^{-/-}	Colon	Aguda/ Crónica	Th1	CU	[783]
TCR-α^{-/-}	Colon	Crónica	Th2	CU	[784]
TNF^{AAARE}	Íleon/ Colon	Crónica	Transmural Th1	EC	[785]
HLA-B27 Tg	In. delgado/ Colon	Aguda/ Crónica	Th1	--	[786]
STAT4 Tg	Íleon term/ Colon	Crónica	Transmural Th1	--	[680]
IL-7 Tg	Colon	Aguda/ Crónica	Th1/Th2	CU	[787]
MDR1a^{-/-}	Colon	Crónica	Transmural Th1	--	[788]
Gai2^{-/-}	Colon	Aguda	Th1	CU	[789]
N-cadherina^{-/-}	Intestino delgado	Crónica	Th1	EC	[790]

Tabla 3. Modelos transgénicos de enfermedad inflamatoria intestinal.

7.4. Transferencia celular adoptiva

Los ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) presentan una mutación espontánea que afecta a la respuesta inmune adaptativa, dando lugar a la deficiencia tanto de células B como de células T, mientras que la respuesta inmune innata continua intacta. El sistema inmune de los ratones SCID se puede recuperar parcialmente mediante la transferencia adaptativa de células B y T normales, y dicha transferencia de poblaciones linfocitarias seleccionadas permite la definición de la función de las células aisladas *in vivo*. La transferencia adaptativa de células T CD4⁺ normales que expresan altos niveles de la molécula de superficie CD45RB (CD45RB^{hi}) provoca colitis en estos animales. La transferencia de toda la población linfocitaria CD4⁺, no da lugar al desarrollo de la enfermedad [791, 792].

Pasadas unas semanas de la transferencia, los ratones comienzan a perder peso y a presentar diarrea. Esta colitis no remite y dará lugar a la muerte del animal. El colon presenta un marcado engrosamiento debido tanto a la hiperplasia del epitelio como a la infiltración de linfocitos y macrófagos en la *lamina propria* y la mucosa. El intestino delgado no se ve afectado, solamente una infiltración difusa de células mononucleares en la *lamina propria*. La enfermedad se puede prevenir mediante el tratamiento con anti-IFN- γ , anti-TNF- α o IL-10, pero no con la administración de IL-4 [793], lo que indica que es una colitis mediada por células efectoras de tipo Th1.

Existen diferentes variaciones de este modelo que también inducen colitis en los roedores. Sería el caso de la transferencia de linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺ [794]. O el empleo de receptores Rag^{-/-} (incapaces de producir células B ni T).

III. INFECCIÓN BACTERIANA INTESTINAL

1. Generalidades

El tracto gastrointestinal tiene una superficie mucosa muy extensa (300-400 m²) que posee estructuras y funciones propias para el reconocimiento inmunológico del ambiente exterior. Una compleja red de interacciones entre células epiteliales y diferentes células inmunocompetentes permite distinguir los cuerpos extraños que transitan a lo largo del tracto gastrointestinal. Desde un punto de vista funcional, los tejidos linfoides asociados al intestino producen tanto respuestas inmunoinflamatorias para el rechazo de patógenos como respuestas inmunológicas activas para la tolerancia de la dieta y de antígenos microbianos que no inducen una inflamación clínicamente relevante [795]. Paradójicamente, tanto la disminución como el aumento exacerbado de la señalización inmunológica es capaz de romper la homeostasis intestinal, dando lugar a la inflamación intestinal [796, 797].

2. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal está compuesta por eucariotas [798], virus [799] y bacterias. El intestino adulto humano contiene cerca de 10¹⁴ bacterias y hasta 1000 especies bacterianas diferentes, lo que constituye la mayor asociación microbiana del cuerpo humano [800]. Estudios recientes han demostrado que los *phyla* más abundantes en el colon humano son *Bacteroidetes* (Gram negativas) y *Firmicutes* (Gram positivas) [801]. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* son *phyla* relativamente menos abundantes pero sin embargo se ha descrito que juegan papeles importantes en la salud humana. Diferentes estudios han descrito la gran diversidad de especies bacterianas y han identificado los grupos bacterianos dominantes: *Clostridium coccoides* (*C. coccoides*)-*Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum* (*C. leptum*), *Bacteroides-Prevotella*, y las especies *Bifidobacterium* y *Atopobium* [802]. La composición de la microbiota intestinal varía mucho entre individuos, por lo que cada individuo alberga una colección de bacterias única, que es bastante estable a lo largo del tiempo [803]. Zoetendal y colaboradores mostraron que la composición de la microbiota intestinal de matrimonios que viven en el mismo ambiente y tienen hábitos alimenticios similares tiene un bajo grado de similitud, sin embargo entre hermanos si es mayor. Curiosamente la microbiota de gemelos idénticos mostró un elevado grado de similitud, aunque todavía distinta. Estos hallazgos resaltan la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de la microbiota intestinal.

Sería muy útil definir qué es una microbiota “sana” para comprender la importancia biológica de los diferentes patrones de colonización microbiana asociados a diferentes enfermedades. Se han observado patrones de colonización en algunas enfermedades autoinmunes, alergias, obesidad, EII y diabetes [804] (Tabla 4).

	Microbiota implicada	Cambios en la presencia y/o función de la microbiota intestinal
Alergias	<i>Lactobacillus</i> spp. ↓ <i>Bifidobacterium adolescentes</i> ↓ <i>Clostridium difficile</i> ↓ <i>Helicobacter pylori</i> ↓	La colonización temprana de <i>Lactobacillus</i> está asociada a menos alergias [805]. La colonización temprana de microbiota diversa previene las alergias [806]. La tolerancia a <i>H.pylori</i> mediada por células T reguladoras previene el asma [807].
Obesidad	Bacteroidetes ↓ <i>Lactobacillus</i> ↑ Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓ <i>Methanobrevibacter smithii</i> ↓	Cambios significativos en la microbiota intestinal están asociados con una mayor incidencia de obesidad [808-810].
Diabetes tipo 2	Firmicutes ↓ <i>Clostridia</i> ↓ <i>Betaproteobacteria</i> ↓ Bacteroidetes/Firmicutes ratio ↑	Cambios en la microbiota intestinal se han asociado con mayores niveles de concentraciones plasmáticas de glucosa [811].
Enfermedad inflamatoria intestinal	Bacteroidetes ↓ <i>Lachnospiraceae</i> ↓ <i>Acinobacteria</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Clostridium leptum</i> ↓ <i>Clostridium coccoides</i> ↓ <i>Feacalibacterium prasnitzii</i> ↓ Firmicutes/Bacteroidetes ratio ↓ <i>Bifidobacteria</i> ↓	La EII está asociada con una disbiosis general, no siendo una única especie la causante [812, 813].
EC	<i>Bacteroides ovatus</i> ↑ <i>Bacteroides vulgatus</i> ↑ <i>Bacteroides uniformis</i> ↓	Los pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) presentan menor diversidad en su flora intestinal comparada con pacientes sanos [814].

Tabla 4. Cambios en la microbiota intestinal asociados a enfermedades [804].

3. Interacciones entre el sistema inmunológico y la microbiota intestinal

El tracto intestinal además de proporcionar cobijo a la microbiota es un órgano inmunológico activo, en el que residen la mayor proporción de células del sistema inmune del cuerpo humano. En el intestino se localiza una gran variedad de células inmunes. Éstas están organizadas en estructuras linfoides denominadas placas de Peyer y tejido linfoide del intestino delgado, así como los ganglios linfáticos mesentéricos [815, 816].

Macrófagos, células dendríticas, varias poblaciones de linfocitos T, células B y la IgA que producen, contribuyen a la generación de una respuesta inmunológica propia a los patógenos invasores, mientras mantienen la flora residente sin ninguna respuesta inflamatoria manifiesta [817, 818].

Los mamíferos hemos evolucionado durante millones de años con nuestra microbiota [819]. Por lo tanto, no es sorprendente que nuestro sistema inmune, y especialmente el sistema inmunológico de la mucosa, hayan desarrollado una compleja conexión con nuestra microbiota. Tanto el sistema inmunológico innato como el adaptativo requieren estas interacciones con la microbiota para continuar desarrollándose [820, 821].

3.1. Inmunidad innata y microbiota intestinal

El sistema inmune innato es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a microbios (PAMPs) que están presentes en muchas especies bacterianas, como los componentes de la membrana bacteriana (lipopolisacárido o péptidoglicano) y la flagelina. Los principales receptores que reconocen estos PAMPs son los TLRs y los receptores NOD-like (NLRs).

3.1.1. Receptores toll-like (TLRs)

Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I que poseen un ectodominio que contiene varios motivos ricos en leucina repetidos (LRR) y un dominio citoplasmático de señalización homólogo al receptor de la interleuquina 1(IL-1R), llamado dominio homólogo Toll/IL-1R (TIR). Los TLRs se expresan en las células epiteliales y en las células inmunológicas de la *lamina propria*, tanto en la superficie celular como en endosomas. La familia de los TLR consta de 11 miembros en el hombre (Tabla 5), que reconocen no solo componentes microbianos (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de bacterias, virus y parásitos) así como componentes celulares dañados del huésped como ácidos nucleicos o ligandos internos. Los TLRs están involucrados en la homeostasis intestinal, incluyendo la regulación de la barrera epitelial, modulando la producción de IgA, el mantenimiento de las uniones estrechas de la integridad intestinal y la expresión de péptidos antimicrobianos [822]. Cuando los TLRs no están presentes o tienen alguna mutación, el colon y el sistema inmune de la mucosa no funcionan correctamente.

TLR	LIGANDOS	EXPRESIÓN CELULAR	LOCALIZACIÓN CELULAR
TLR 1/2	Lipopéptidos bacterianos Proteínas de protozoos (<i>T. cruzi</i> Tc52, profilina)	Mayoría de tipos celulares incluyendo CEI y CD	Membrana plasmática
TLR 2	Lipopéptidos y lipoproteínas bacterianos, peptidoglicano, ácido lipoteico, porinas, zymosan. Proteínas estructuras virales. Lípidos de helmintos. Componentes de la pared celular de hongos. HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1, ácido hialurónico.	CEI, células de Paneth, leucocitos mononucleares periféricos, CD, monocitos y células T	Membrana plasmática
TLR 3	ARN de doble cadena y simple viral. ARNm endógeno.	CEI, CD, células NK y células T	Endosomas
TLR 4	Lipopolisacárido bacteriano Proteínas de cubierta viral. Parásitos protozoos. Glicoinoitolfosfolípidos (<i>T. cruzi</i>).	CEI, células de Paneth, macrófagos, CD y células T	Membrana plasmática
TLR 5	Flagelina	CEI, células de Paneth, monocitos CD, NK y células T	Membrana plasmática
TLR 6/2	Diacil lipopéptidos bacterianos, ácido lipoteico.	CEI, elevada expresión en células B y CD, baja expresión en monocitos y NK	Membrana plasmática
TLR 7	ARN viral de cadena simple ARN endógeno	CEI, células B, CD, monocitos y células T	Endolisosomas
TLR 8	ARN viral de cadena simple ARN endógeno	CEI, monocitos, CD, NK y células T	Endolisosomas
TLR 9	Motivos CpG no metilados de bacterias, virus y protozoos. CpG DNA oligodesoxinucleotidos endógenos.	CEI, células de Paneth, CD, células B, leucocitos mononucleares periféricos, macrófagos, NK y células de la microglia	Endolisosomas Membrana plasmática
TLR 10	Desconocido	Células B, CD, monocitos y células T	Intracelular
TLR 11	Superficie celular de bacterias uropatógenas, molécula similar a profilina. CpG DNA de <i>Toxoplasma gondii</i>		Membrana plasmática

Tabla 5. Patrones de expresión de los TLRs y sus activadores. CEI: células epiteliales intestinales; CD: células dendríticas, NK: células natural killer.

La unión directa entre los TLRs y sus ligandos es esencial pero no suficiente para su posterior activación. Aunque los TLRs forman homodímeros o heterodímeros después de su estimulación con el ligando parece que para su activación son necesarios más cambios estructurales de los dímeros TLR mediante los dominios TIR [823]. Cuando el dominio TIR del TLR se asocia con un dominio TIR que contiene una proteína adaptadora se produce la activación de la vía de señalización dependiente de TLR. Existen cuatro proteínas adaptadoras: MyD88, MAL, TRIF, y TRAM [824]. MyD88 es la molécula adaptadora central que interacciona con todos los TLRs excepto

con TLR3. Tras la activación del receptor con su ligando, MyD88 recluta a miembros de la familia IRAK y a TRAF6 [825]. Este complejo IRAK-TRAF6 da lugar a la activación de la vía NF- κ B y la vía de las MAPK (JNK, p38). La molécula Tollip puede interactuar con IRAK inhibiendo la vía de las TLRs. Esta es la vía dependiente de MyD88. Existe otro tipo de activación independiente de MyD88, a través de TRIF y TRAF3, que da lugar al reclutamiento de IKK ϵ /TBK1, la fosforilación de IRF3 y la expresión de IFN- β . Esta es la vía dependiente de TRIF [826, 827] (Figura 9).

3.1.2. Receptores NOD-like (NLRs)

Los NLRs constituyen una gran familia de proteínas citoplasmáticas con más de veinte miembros. Los primeros miembros de la familia NLR identificados fueron NOD1 y NOD2, que son sensores de componentes bacterianos involucrados en la modulación de la inflamación intestinal y la respuesta apoptótica [828].

NOD1 se expresa en las células epiteliales intestinales y reconoce el peptidoglicano de las bacterias Gram negativas [829]. La señalización a través de NOD1 constituye la principal vía para la activación y estimulación de la vía NF- κ B y los genes NF- κ B en células infectadas con patógenos intracelulares bacterianos que no activan los TLRs (Figura). De esta forma NOD1 proporciona al intestino un mecanismo alternativo para luchar contra bacterias enteroinvasivas Gram negativas que pueden obviar la activación de los TLRs [830].

NOD2 se expresa en células epiteliales intestinales, monocitos y células de Paneth y reconoce el muramil dipéptido, derivado del peptidoglicano, común en bacterias Gram negativas y Gram positivas [831]. NOD2 es necesario para la secreción de péptidos antimicrobianos en las células de Paneth. Las células de Paneth expresan una gran cantidad de péptidos antimicrobianos, como α -defensinas, lisozimas, fosfolipasa A₂ (con propiedades antimicrobianas independientes de su actividad catalítica) y la lectina RegIII γ , que constituyen un mecanismo autónomo de defensa frente a bacterias patógenas. Los linfocitos intraepiteliales también producen RegIII γ y se ha propuesto que esta es esencial para prevenir el contacto entre la bacteria y el epitelio [832, 833]. La mutación de NOD2 constituye un sólido factor de riesgo asociado a la EC. Estos pacientes presentan un desequilibrio en la microflora intestinal e inhabilidad para eliminar patógenos intestinales. Curiosamente, los ratones deficientes en NOD2 no son capaces de matar eficazmente a las bacterias y muestran una microbiota alterada y un incremento de bacterias en el contenido fecal [834]. Por lo tanto, las mutaciones de NOD2 incrementan la susceptibilidad a sufrir EC alterando las interacciones entre la microbiota ileal y la inmunidad de la mucosa [835].

Los NLRs pueden unirse, en respuesta a diferentes estímulos, formando grandes complejos multimoleculares, denominados inflamasomas, que controlan la activación de la enzima proteolítica caspasa 1. La caspasa 1 activada libera los precursores pro-IL-1 β y pro-IL-18, esta etapa es crítica para dar lugar a las formas activas (IL-1 β e IL-18), e iniciar la respuesta pro-inflamatoria antimicrobiana.

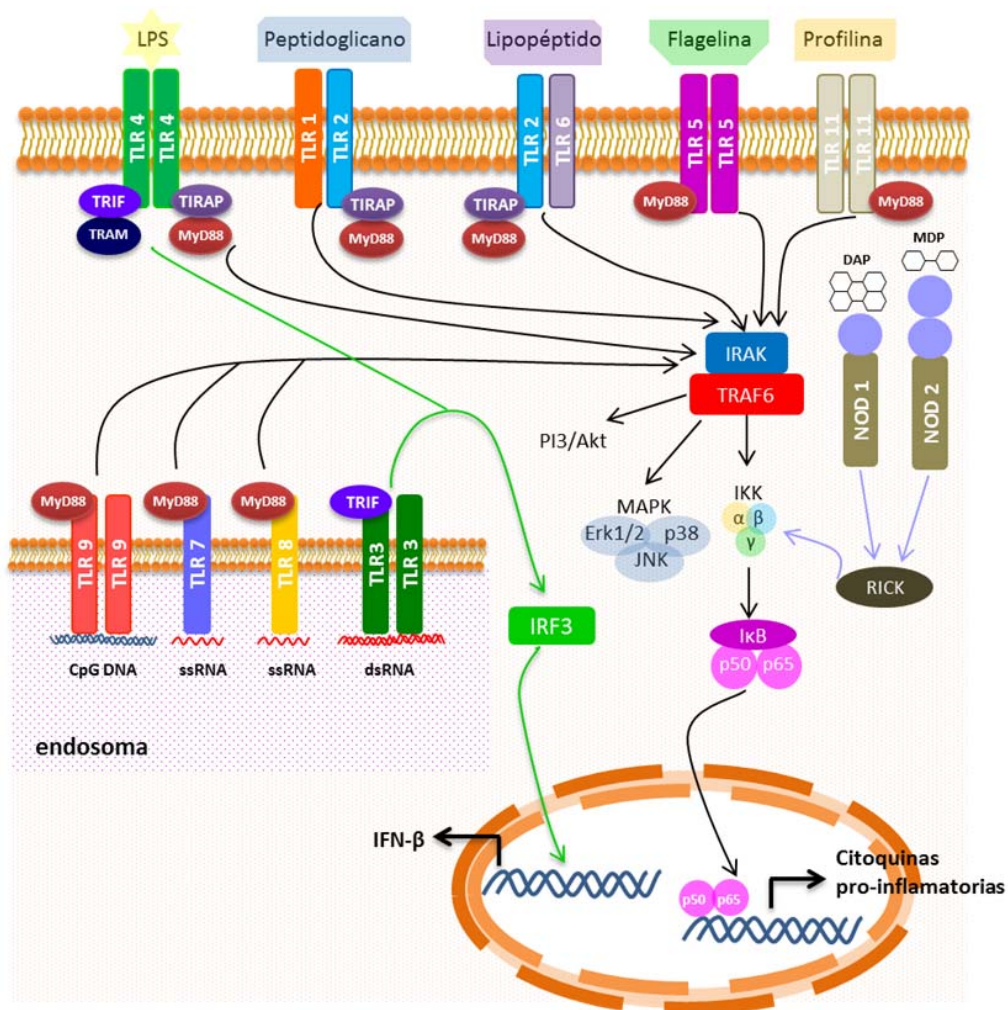


Figura 9. Vías de señalización a través de los TLRs y NLRs. Los PAMPs son detectados extracelularmente e intracelularmente por los TLRs y en el citosol por los NLRs, activando diferentes vías de señalización como NF- κ B, MAPK, Akt o IRF-3, lo que da lugar a la translocación al núcleo de diferentes factores de transcripción que darán lugar a proteínas pro y antiinflamatorias así como IFN- β (vía IRF 3). ssRNA: ARN de cadena simple, dsRNA: ARN de cadena doble, DAP: ; MDP: muramil dipéptido;

3.2. Inmunidad adaptativa y microbiota intestinal

Un compartimento inmunológico importante en el intestino es la *lamina propria*, en la que se encuentran un gran número de macrófagos, células dendríticas, células T y células B secretoras de IgA [836]. La respuesta inmunológica adquirida tiene lugar principalmente en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), como son las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos [837]. Además, las células T reguladoras también están presentes en la *lamina propria* donde mantienen la tolerancia a los alimentos y a los antígenos propios. En la lamina propria también están presentes las células CD4, CD8 y B, algunos de estos linfocitos CD8 migran a las vellosidades donde se convierten en linfocitos intraepiteliales [838, 839]. Cuando las células B de la *lamina propria* se activan se convierten en células plasmáticas productoras de IgA, ésta es transportada a través de la capa epitelial y secretada al lumen intestinal.

4. Disbiosis

El término disbiosis se emplea para definir la alteración en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal que puede dar lugar a una estado que podría dañar la salud del huésped [840, 841]. Existen diferentes patologías asociadas a disbiosis, como infecciones gastrointestinales, diarrea asociada a antibióticos, colitis pseudomembranosa, CU, EC, pouchitis, enterocolitis necrotizante y cáncer colorrectal [842].

Los cambios en la composición de la microbiota intestinal se han relacionado con complicaciones como inflamación crónica o trastornos de la barrera mucosa-intraepitelial. Estas correlaciones no son siempre la causa [841], pero existen casos en los que la alteración de la microbiota puede provocar o prolongar la enfermedad y la disbiosis. Una reducción global de los niveles de ácidos grasos de cadena corta, por ejemplo, puede contribuir a la producción de diarrea reduciendo la absorción de agua y sodio [843]. Esto puede inhibir el crecimiento de microbios beneficiosos y por lo tanto retrasar el restablecimiento de un perfil de microbiota sana. Es más, es posible que los efectos antiinflamatorios postulados del butirato produzcan disbiosis (por ejemplo *Faecalibacterium prausnitzii* en la EII) y por lo tanto puedan contribuir a un exceso de inflamación [844].

La inflamación *per se* puede ser un factor clave que ocasiona el fallo en la resolución de la disbiosis. Bacterias específicas, como los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* parece que son capaces de sobrevivir mejor bajo condiciones de inflamación colónica que los comensales anaerobios que

son los que predominan en los adultos sanos [845-849]. *Salmonella enterica* subespecie *typhimurium*, por ejemplo, es menos susceptible a los antimicrobianos producidos por el huésped y ha desarrollado la capacidad de incorporar estos compuestos generados durante la inflamación para su crecimiento [850-854]. Existe la teoría de que elevados niveles de microbios potencialmente dañinos pueden crear un ambiente pro-inflamatorio [855]. En este modelo, las especies oportunistas, por ejemplo *E.coli* enteroinvasiva, interacciona con la superficie de la mucosa y debilita la función de la barrera y provoca las respuestas inmunes del huésped contra la flora comensal. Esto alarga su propia supervivencia en el colon y también prolonga la disbiosis. La eliminación de la inflamación inducida por especies antiinflamatorias, como *Firmicutes* productoras de butirato y/o factores antiinflamatorios de *B. fragilis*, pueden exacerbar el ciclo inflamatorio y favorecer el crecimiento de bacterias resistentes pro-inflamatorias [856]. Si esta teoría es correcta es posible que necesitemos interrumpir estos ciclos pro-inflamatorios para frenar la disbiosis y restaurar la homeostasis.

Finalmente, la disbiosis puede también provocar que el huésped esté expuesto a más compuestos dañinos. Entre las sustancias tóxicas producidas por la microbiota intestinal se encuentran compuestos como amonio, fenoles, e indoles [857]. Si una de las bacterias que produce estas sustancias está en disbiosis, siendo o no la causante de la enfermedad, esta podría afectar a la salud del huésped a largo plazo.

Las disbiosis pueden ser tratadas (Figura 10) con:

- Antibióticos: La administración de antibióticos tiene como objetivo matar o inhibir a las bacterias dañinas sin dañar toda la microbiota. Sin embargo el uso continuado de antibióticos puede provocar disbiosis, ocasionando una infección por *C.difficile* [858].
- Probióticos: pueden ser útiles gracias a: (1) su efecto inmunoregulator en las uniones estrechas, (2) la agregación bacteriana, (3) la producción de inhibidores como bacteriocinas, (4) la disminución de la producción de toxinas o factores virulentos y (5) la exclusión competitiva por los sitios de unión [859, 860].
- Prebióticos e intervenciones dietéticas: el objetivo es incrementar el número de bacterias beneficiosas en el intestino, lo que puede reprimir la disbiosis, con un mecanismo similar al de los probióticos.

- Trasplante fecal: estos trasplantes normalmente dan lugar a la expansión bacteriana, lo que frena la microbiota disbiótica y permite restablecer la homeostasis sana.

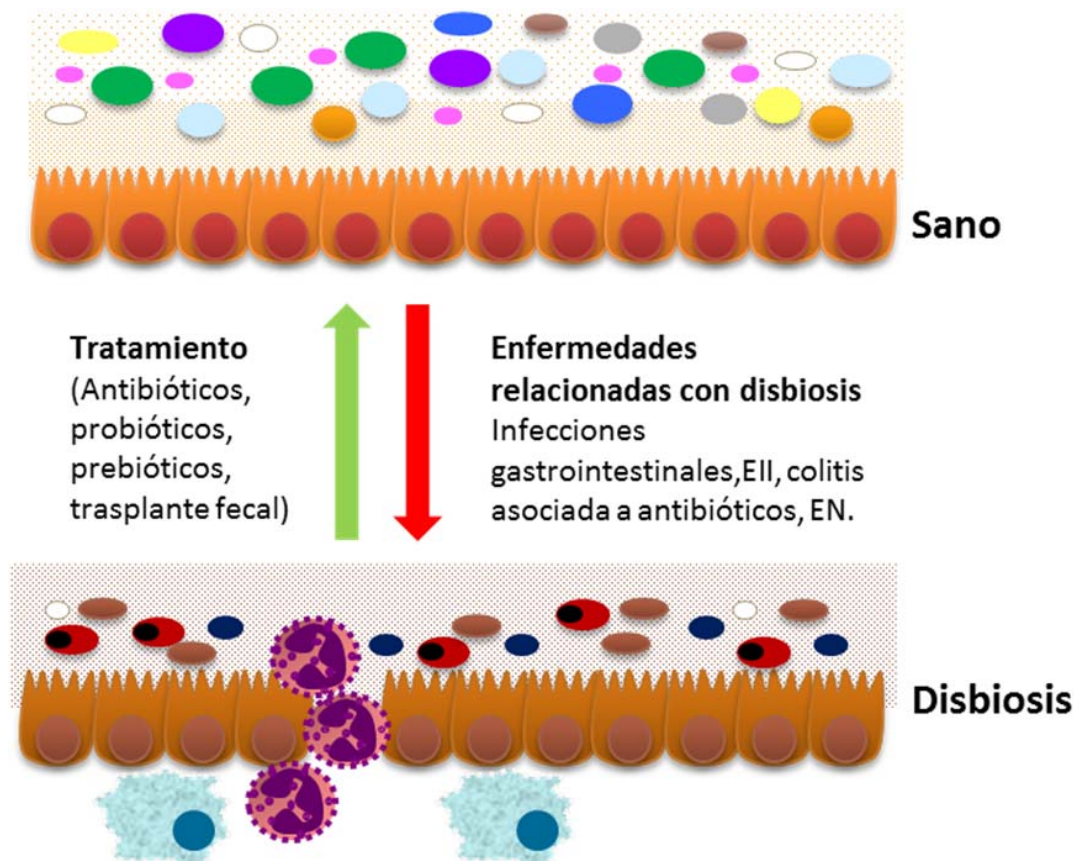


Figura 10. Disbiosis. En el individuo sano hay una microbiota abundante y diversa (predominan *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*), no hay daño en la mucosa ni inflamación. Cuando se produce la disbiosis disminuye la diversidad de la microbiota, aumentan los patógenos oportunistas y *Enterobacteriaceae*, se produce daño en la mucosa y se inicia la respuesta inflamatoria.

5. Modelos experimentales de infección bacteriana intestinal

Existen diferentes modelos experimentales para imitar los procesos infecciosos intestinales que tienen lugar en humanos. Las técnicas de imagen bioluminiscentes se han convertido en una valiosa herramienta para el estudio de las infecciones bacterianas a tiempo real en modelos animales. Varias especies de bacterias Gram negativas se han marcado de forma luminiscente, como *Escherichia coli* [861-863], *Salmonella enterica*

subespecie *typhimurium* [864, 865], *Yersinia enterocolitica* [866], *Brucella melitensis* [867], *Pseudomonas aeruginosa* [868] y *Citrobacter rodentium* [869].

El grupo de Christian U. Riedel y colaboradores construyó un vector que mejora la bioluminiscencia en las bacterias Gram negativas ya que se integra de forma específica en el locus del 16S del cromosoma bacteriano [870]. Tras la infección bacteriana, se introduce a los animales anestesiados en un sistema de imagen que pueden detectar luminiscencia y se determina, a diferentes tiempos, la carga bacteriana.

Dos de los modelos más utilizados son la infección con *Citrobacter rodentium* y la infección con *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium.

5.1. *Citrobacter rodentium*

Citrobacter rodentium (*C.rodentium*) es un bacilo Gram negativo, anteriormente conocido como *Citrobacter freundii* biotio 4280, patógeno natural de los ratones de laboratorio [871]. Posee algunas características de virulencia comunes a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *E.coli* enterohemorrágica (EHEC). *C. rodentium* pertenece a la familia de bacterias A/E (*attaching and effacing*, atacantes y dañinas) que se caracteriza por una íntima adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales del huésped, dañando las microvellosidades y reorganizando el citoesqueleto de actina del huésped para formar las extensiones “similares a pedestales” de las células epiteliales que se encuentran debajo de las bacterias adherentes y que llamamos lesiones A/E [872]. La colonización bacteriana y la formación de lesiones A/E está mediada por islas patogénicas denominadas LEE (*locus of enterocyte effacement*), que se trata de una estructura conservada en las bacterias A/E [873]. *C. rodentium* es la única bacteria de la especie *Citrobacter* que posee LEE [874, 875]. Ya que se trata del único patógeno conocido A/E que puede infectar de forma natural a los ratones, es un modelo útil para el estudio de la patogénesis de patógenos humanos importantes en clínica como EPEC o EHEC.

C.rodentium induce cambios en el colon que incluyen hiperplasia de las criptas, proliferación de las células epiteliales, dilatación de las criptas, engrosamiento de la mucosa e irregularidades en la superficie apical de los enterocitos [876]. Normalmente el crecimiento de esta bacteria se restringe únicamente al colon, con algo de translocación bacteriana, excepto en algunas cepas susceptibles como C3H [877]. *C. rodentium* es el agente etiológico de la hiperplasia colónica murina transmisible (TMCH), una

enfermedad que ocurre de manera natural en los animales de laboratorio y que se caracteriza por hiperproliferación celular en el colon descendente [875]. *C.rodentium* es el único patógeno murino que se puede usar como modelo de varios procesos de enfermedad importantes, como es la patogénesis A/E, la hiperplasia y la colitis [878].

En el modelo experimental de infección con *C.rodentium*, el colon distal es colonizado por *C.rodentium* con una gran carga bacteriana cerca del día 7 tras la infección, que persiste hasta el día 14 y que típicamente ha desaparecido el día 21 [869]. La mayoría de las cepas de ratones (C57Bl/6, NIH Swiss y Balb/c) presentan una baja mortalidad e incluso nula tras la infección *C. rodentium*. La infección con *C.rodentium* se realiza por vía oral y provoca una gran respuesta inmune caracterizada por una respuesta mixta Th1/Th17 en la que se produce el incremento de la expresión de genes como IL-17, IL-22, IL-23 y TNF- α [879, 880]. Se ha demostrado que tanto la IL-23 como la IL-22 son críticas para la resistencia a *C.rodentium* [880]. Por el contrario, ratones deficientes en IFN- γ , IL-17 A o IL-17F sobrevivieron a la infección con *C.rodentium* pero retrasaron el aclaramiento o incremento la carga bacteriana e incremento la patología colonica [881, 882]. Las células T CD4+, pero no las CD8+, son críticas para el control de la infección con *C.rodentium*, así como las células B y las respuestas anticuerpo-antígeno específicas [883, 884]; indicando que se requiere una respuesta de anticuerpos sistémica dependiente de células T para el aclaramiento de las bacterias [885].

5.2. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium

Las infecciones humanas y animales con las diferentes subespecies del patógeno intracelular *Salmonella* suponen un serio problema para la salud a nivel mundial. Existen subespecies de *S. entérica* que sólo afectan a humanos, como *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis o *Salmonella* Paratyphi, que provocan fiebre tifoidea y que causan cientos de miles de muertes cada año. *S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede afectar a un amplio rango de huéspedes y en humanos provoca gastroenteritis autolimitante.

La infección de ratones con *S. Typhimurium* da lugar a una infección sistémica similar a la de *S. Typhi* en humanos. El sistema inmune innato es capaz de restringir la replicación de *S. Typhimurium* hasta cierto punto, pero para el control y la erradicación de la bacteria es necesaria la participación del sistema inmune adquirido. La infección con *Salmonella* induce la producción de células T CD4+ y CD8+ específicas, ambas poblaciones

linfocitarias son importantes para la producción de respuestas primarias y secundarias, aunque estos mecanismos no se han dilucidado completamente.

Esta *Salmonella* es capaz de invadir al huésped induciendo su captación en las células epiteliales intestinales. Esta captación se produce debido a la liberación de proteínas efectoras en el citoplasma de las células infectadas mediante un mecanismo especializado conocido como sistema de secreción de proteínas tipo III [886]. Estas proteínas activan las vías de señalización involucradas en la reorganización del citoesqueleto y en los procesos de recaptación celular [887]. Además facilitan el proceso de invasión, la interacción entre el patógeno invasor y el epitelio también lleva a la activación de un programa de expresión genético epitelial que incluye genes con funciones proinflamatorias [888-891]. Consecuentemente, la invasión inicial da lugar a inflamación y a la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-8, en respuesta a la activación de la cascada MAPK y a la activación de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) o NF- κ B [892, 893].

6. Microbiota intestinal y EII

Se ha descrito que algunos componentes de la microbiota son necesarios para el desarrollo completo de la EII en modelos animales [894]. La composición de la microbiota intestinal en pacientes con EC y CU refleja, en parte, la microbiota esperada asociada a una vida moderna en países desarrollados, aunque no se conoce si además se producen cambios específicos o si son la causa de la EII. El estudio de la microbiota en pacientes con EII, a pesar de estar en una etapa temprana, ha generado resultados muy interesantes. Diferentes análisis de composición han mostrado como ciertos organismos como *Faecalibacterium prausnitzii*, poseen propiedades antiinflamatorias [895], mientras que otros organismos pueden contribuir a provocar el daño tisular debido a sus propiedades mucolíticas o proteolíticas [896]. Además, algunas alteraciones en la flora bacteriana, como el incremento de bacterias asociadas a la mucosa en la EC o el incremento de *Mycobacterium avium paratuberculosis* y *Clostridium difficile*, parece que podrían ser tanto secundarias al proceso inflamatorio como debido a defectos en la inmunidad innata [894, 897]. Estos organismos, no obstante, podrían influir en el curso clínico y en la gravedad de la enfermedad. A pesar de los hallazgos en pacientes con CU, muchos pacientes con EC presentan un menor aclaramiento de bacterias en la mucosa [898], lo que se ha asociado con una función celular fagocítica defectiva y con una menor inflamación aguda debido a respuestas inmunes adaptativas compensatorias [899].

IV. MUCOSITIS

1. Generalidades

Aunque se han realizado avances significativos en el tratamiento de pacientes que se someten a radioterapia y quimioterapia contra el cáncer, sigue habiendo muchos efectos secundarios gastrointestinales debilitantes. Además de vómitos, náuseas y diarrea, un acontecimiento adverso clínicamente relevante es la mucositis. La mucositis consiste en la presencia de lesiones inflamatorias y/o ulcerativas en el tracto gastrointestinal y/u oral. Puede ser provocada por enfermedades infecciosas, deficiencias inmunológicas y algunas medicaciones [900]. Es uno de los mayores efectos adversos del tratamiento radiológico para cáncer de cabeza y cuello así como de la quimioterapia, en particular de aquellas drogas que afectan a la síntesis de ADN (agentes específicos de la fase S como 5-fluorouracilo, metotrexato y citarabina) [901].

Esta patología puede aparecer a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano y causa generalmente debilidad. La mucositis gastrointestinal se caracteriza por un incremento de la apoptosis de las criptas y atrofia de las vellosidades, dejando la mucosa expuesta a ulceraciones e infecciones [901-903].

2. Epidemiología

La mucositis se desarrolla en aproximadamente un 40% de los pacientes que reciben dosis estándares de quimioterapia y casi en un 100% de los pacientes que reciben dosis elevadas de quimioterapia, afectando al año a más de dos millones de personas de toda la población mundial. Podemos clasificar los patrones de incidencia en función del tratamiento y del cáncer a tratar:

- Incidencia de la mucositis oral en pacientes que reciben radioterapia a grandes dosis en la cabeza y el cuello: según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de mucositis de grado 3 y 4 en pacientes que recibieron radiación (6000-7000 Gy) en la cavidad oral, alcanza el 85%, aunque todos los pacientes presentan mucositis oral en diferentes grados. Estudios recientes muestran que la mucositis oral grave tiene lugar en el 29-66% de los pacientes que recibieron radioterapia para cáncer de cuello y cabeza [904, 905]. El dolor oral asociado a estas lesiones frecuentemente lleva a la necesidad de proporcionar al paciente soporte nutricional enteral así como al uso de opioides.

- Incidencia de la mucositis oral y gastrointestinal en pacientes que han recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas: según la OMS, la incidencia de mucositis de grado 3 y 4 puede ser mayor del 75% en estos pacientes [906], dependiendo de la intensidad del tratamiento utilizado y del uso profiláctico de metotrexato para prevenir el rechazo. El control de la mucositis oral y gastrointestinal es uno de los principales retos durante el periodo de aplasia junto con el riesgo de sepsis relacionado con la ruptura de la integridad de la mucosa intestinal.

- Incidencia de la mucositis asociada a quimioterapia estándar de varios ciclos (con o sin radioterapia) en linfoma no Hodgkin y cánceres de pecho, pulmón y colorectal: para todas las localizaciones, la quimioterapia con 5-fluorouracilo, capecitabina o tegafur da lugar a una elevada incidencia (20-50%) de mucositis gastrointestinal [900, 907].

3. Factores de riesgo

El riesgo de mucositis se ha asociado clásicamente con el modo, la intensidad y la ruta de la terapia anticancerosa. De hecho, la terapia combinada puede incrementar la gravedad de la mucositis oral. Curiosamente, la incidencia y la gravedad de la toxicidad aguda de la mucosa generalmente no se ven reducidas por la utilización de nuevos sistemas de radiación, utilizados en radioterapia.

Fumar y una incorrecta higiene oral constituyen factores de riesgo elevados para desarrollar mucositis, así como la edad y los tratamientos antineoplásicos previos [908].

Los factores de riesgo relacionados con los pacientes, como las comorbilidades (por ejemplo, la malnutrición) pueden contribuir de forma importante al riesgo. Todos los pacientes deben ser evaluados en función de los riesgos de la nutrición y empezar con la nutrición enteral en cuanto se empiecen a desarrollar problemas al tragar. Además, los pacientes que desarrollan xerostomía o hipofunción salival importante debido a la radiación de cáncer de cuello o cabeza y/o drogas antieméticas pueden sufrir un incremento del malestar debido a la mucositis. Deben ser considerados la hidratación de la mucosa oral y las intervenciones para el tratamiento del dolor tópico con anestésicos locales.

4. Fisiopatología de la mucositis

Estudios recientes muestran que el mecanismo involucrado en la patogénesis de la mucositis es mucho más complejo que el daño directo en el epitelio[909]. Se cree que los mecanismos para la mucositis inducida por radiación y la inducida por quimioterapia son similares. El siguiente modelo en 5 fases [910] (Figura 11) para la patogénesis de la mucositis se basa en la evidencia disponible hasta el momento:

1. **Iniciación de daño en el tejido:** la radiación y/o la quimioterapia inducen daño tisular lo que da lugar a la muerte de las células de la base del epitelio. Se cree que la generación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) debido a la radiación o la quimioterapia juega un papel en la iniciación del daño del tejido. Estas pequeñas moléculas altamente reactivas son subproductos del metabolismo del oxígeno y pueden causar importantes daños celulares.
2. **Estimulación de la inflamación mediante la generación de señales mensajeras:** además de causar la muerte celular directa, los radicales libres activan segundos mensajeros que transmiten señales desde el receptor en la superficie celular hasta el interior de la célula. Esto lleva a una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias, daño tisular y muerte celular.
3. **Señalización y amplificación:** la mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , producido principalmente por macrófagos, daña las células de la mucosa y también activa las vías moleculares que amplifican el daño en la mucosa.
4. **Ulceración e inflamación:** existe un infiltrado celular inflamatorio asociado con las ulceraciones de la mucosa, basado en parte en los subproductos metabólicos de la colonización de la microflora oral. La producción de citoquinas pro-inflamatorias está también estimulada debido a esta infección secundaria [911].
5. **Curación:** esta fase se caracteriza por la proliferación epitelial así como celular y la diferenciación tisular [912], restaurándose la integridad del epitelio.

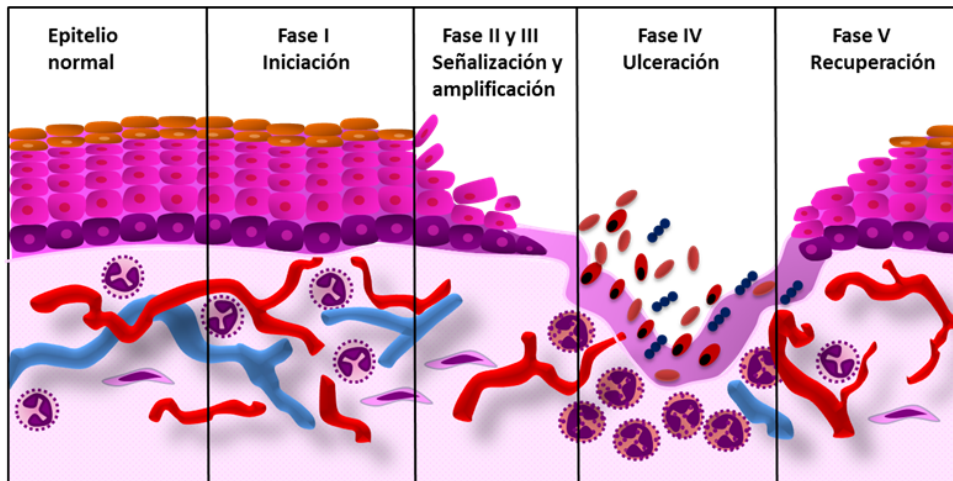


Figura 11. Fisiopatología de la mucositis. (Imagen adaptada [913]).

5. Evaluación de la mucositis

Existen diferentes escalas para la valoración de la mucositis oral. Dos de las más utilizadas son la escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS o *World Health Organization, WHO*) y la escala de Criterio Común de Terminología para Efectos Adversos del Instituto Nacional de Cáncer (*National Cancer Institute, NCI, Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE, scale*)

Escala para mucositis oral de la OMS:

- Grado 0: no mucositis oral.
- Grado 1: eritema y dolor.
- Grado 2: úlceras, capaz de comer sólidos.
- Grado 3: úlceras, requiere dieta líquida debido a la mucositis.
- Grado 4: úlceras, no es posible la alimentación debido a la mucositis.

Escala de Criterio Común de Terminología para Efectos Adversos del Instituto Nacional de Cáncer:

- Grado 1: asintomático o síntomas moderados, intervención no indicada.
- Grado 2: dolor moderado, no interfiere con la ingesta oral, dieta modificada indicada.
- Grado 3: dolor severo, interfiere con la ingesta oral.
- Grado 4: consecuencias que comprometen la vida, intervención urgente indicada.
- Grado 5: muerte.

6. Tratamiento de la mucositis

El tratamiento de la mucositis oral va encaminado a controlar el dolor (utilizando enjuagues bucales con lidocaína [913]); proporcionar soporte nutricional (los pacientes perciben sabores diferentes después de tratamientos de radioterapia y/o quimioterapia [914, 915] y su ingesta nutricional se ve gravemente comprometida); descontaminación oral (varios estudios han demostrado que una correcta limpieza de la boca puede reducir la gravedad de la mucositis oral [916-918]); control del sangrado (mediante el empleo de fibrina o esponjas de gelatina [919]) e intervenciones terapéuticas (fundamentalmente crioterapia, factores de crecimiento, antiinflamatorios, antioxidantes y terapia con láser de baja frecuencia [913]).

Podemos abordar el tratamiento/profilaxis de la mucositis gastrointestinal desde diferentes aspectos [920]:

- Prevención de la mucositis en pacientes bajo tratamiento quimioterápico a dosis estándar o radioterápico a dosis estándar o tratamiento concomitante radioterapia-quimioterapia: el uso de probióticos como *Lactobacillus* spp. es útil en la prevención de diarrea en pacientes con cáncer en la zona pélvica [921-923]; el empleo de amofistina reduce la esofagitis en pacientes con cáncer de pulmón [924].

- Prevención de la mucositis asociada a radioterapia: no se recomienda el uso de 5-ASA ya que se ha relacionado con un empeoramiento de la diarrea [925]; la administración de amifostina intravenosa puede reducir la proctitis asociada a radioterapia; el ritmo circadiano tiene gran influencia en el desarrollo de mucositis, de hecho pacientes tratados por la mañana presentaron una mucositis de mayor gravedad que pacientes tratados por la tarde [926]; el empleo de supositorios de misoprostol es útil en la prevención de proctitis.

- Tratamiento de la mucositis en pacientes tratados con radioterapia: el uso de oxígeno hiperbárico ha sido efectivo reduciendo la proctitis asociada a radioterapia en más de 15 estudios [927, 928]; el empleo de enemas de sucralfato es efectivo para tratar la proctitis en pacientes con sangrado rectal.

- Tratamiento de la mucositis en pacientes sometidos a quimioterapia a dosis estándar y elevadas: cuando el tratamiento con loperamida no consigue la diarrea, se recomienda administrar octeótrido por vía subcutánea.

7. Modelos experimentales de mucositis

Existen diferentes modelos para inducir mucositis en animales de experimentación. Fundamentalmente mucositis inducida por radiación y mucositis inducida por agentes quimioterápicos, como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU). Empleando técnicas de irradiación se induce mucositis en animales de experimentación [929-931]. Existen diferentes protocolos, el más utilizado para inducir mucositis oral combina dos técnicas, la irradiación percutánea de todo el hocico así como la irradiación local de pequeñas zonas debajo de la lengua.

El modelo más utilizado es el de mucositis inducida por **5-fluorouracilo**. El 5-FU es un fármaco quimioterápico muy utilizado en la práctica clínica en oncología. Se emplea para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como gastrointestinal, de mama y de cabeza y cuello [932]. La evidencia clínica indica que los pacientes responden de diferente forma al tratamiento. Algunas personas presentan efectos secundarios leves mientras que otras sufren graves efectos adversos que les llevan a detener el tratamiento del cáncer. Los principales efectos secundarios son mielosupresión, dermatitis, cardiotoxicidad, diarrea y mucositis [932, 933]. La mucositis es el efecto adverso más común que afecta a casi un 80% de los pacientes, provocando hinchazón abdominal así como vómitos y diarrea [910].

La administración intraperitoneal de 5-FU en animales de experimentación mimetiza la mucositis humana, pudiendo utilizarse como un modelo simple de inducción de mucositis. La mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU se produce como consecuencia de varios procesos como apoptosis, hiperproliferación y respuestas inflamatorias anormales que dan lugar a malabsorción intestinal y a disfunciones [934, 935]. Se considera que la apoptosis juega el papel más importante en la mucositis inducida por 5-FU. De hecho, se detectó un gran número de células apoptóticas en las criptas intestinales de los ratones antes de la destrucción de la mucosa [936, 937] y en biopsias intestinales de pacientes bajo tratamiento quimioterápico [938]. Los mecanismos involucrados en la apoptosis intestinal inducida por quimioterapia aún no se conocen pero podría estar relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno y con citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [939-941]. Estudios recientes han demostrado que la vía de señalización NF- κ B está estimulada en la fase 2 de la mucositis [942-944]. Además la microbiota intestinal se altera tras la administración de fármacos quimioterápicos [945-947].

MATERIAL Y MÉTODOS

I. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, exceptos aquellos en los que se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma® (Madrid, España).

II. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tanto en los experimentos *in vivo* como *ex vivo* llevados a cabo en ratas, se emplearon ratas Wistar hembras, con un peso medio comprendido entre los 175 y los 225 g, suministradas por Harlan Laboratories® (Barcelona, España). Todos los experimentos llevados a cabo con ratas se realizaron en la Universidad de Granada.

Para realizar los experimentos llevados a cabo en ratones, utilizamos diferentes cepas. Los ratones C57BL/6 (B6.129S7-Akp2^{tm1Sor}/J) heterocigotos para la expresión de TNAP (TNAP^{+/-}) y sus respectivos controles *wild-type* (WT), sin ninguna modificación genética, fueron suministrados por The Jackson Laboratory®. A partir de diferentes cruces se obtuvieron los animales necesarios. Los experimentos se llevaron a cabo en ratones de entre 8-16 semanas, con un peso medio de 20-25 g.

Se llevaron a cabo dos variantes del modelos de colitis inducida por transferencia celular adoptiva; en el primer modelo, llevado a cabo en la Universidad de Granada, se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6-J y SCID, que obtuvimos de Charles River (Barcelona, España), mientras que en el segundo modelo, llevado a cabo en la Universidad de Nuremberg-Erlangen, se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6-J (WT y TNAP^{+/-}) y Rag^{-/-}, que fueron obtenidos de las instalaciones de dicha Universidad.

El resto de modelos de inflamación intestinal, utilizando los ratones C57BL/6 (B6.129S7-Akp2^{tm1Sor}/J) heterocigotos para la expresión de TNAP (TNAP^{+/-}) y sus respectivos controles *wild-type* (WT) proporcionados por The Jackson Laboratory®, se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad de Granada, excepto los modelos de infección intestinal por *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) y *Salmonella entérica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), que se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad de Nuremberg-Erlangen, bajo la supervisión del Doctor Stefan Wirtz, responsable de seguridad de las instalaciones.

Tanto en los experimentos llevados a cabo en ratas como en ratones se administró una dieta estándar para roedores (Panlab A04, Panlab®, Barcelona, España), y agua esterilizada *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la Universidad de Granada o de la

Universidad de Nuremberg-Erlangen en condiciones estándar, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y alojados en jaulas tipo makrolon (ratas) y en jaulas con filtros protectores Mini-Isolator™ (Tecniplast, Buguggiate, Italia) (ratones), a excepción de los animales mantenidos en las instalaciones de la Universidad de Nuremberg-Erlangen donde fueron mantenidos en jaulas tipo IL con ventilación centralizada.

Todos los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada o por el de la Universidad de Nuremberg-Erlangen (Nuremberg, Alemania), dependiendo de dónde se llevaron a cabo dichos experimentos.

III. MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

A continuación se exponen los modelos experimentales animales utilizados. En todos los casos los animales fueron sacrificados finalmente por dislocación cervical, una vez obtenidas las muestras correspondientes (ver más adelante, sección IV apartado 1). Típicamente se tomaron muestras de sangre, segmentos intestinales, hígado, riñón y otros, además de muestras de heces, y se realizaron cultivos primarios de células de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos.

1. Modelos experimentales de colitis

1.1. Colitis aguda inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)

La colitis fue inducida mediante la administración intrarrectal de una solución de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en etanol al 50% (V·V⁻¹). La cantidad administrada fue de 10 mg de TNBS por rata en un volumen de 0,25ml. Para ello se sometió al animal a breve anestesia con isoflurano.

En el caso de la colitis inducida por TNBS en ratón, los animales fueron presensibilizados el día 0 (Figura 12). Para ello se rasuró a los animales una zona de aproximadamente 1,5 x 1,5 cm utilizando una maquinilla de afeitar y se le añadió una solución de TNBS al 1% (V·V⁻¹) en una mezcla lipófila de acetona:aceite de oliva 4:1 (en lugar de TNBS, se empleó PBS en los grupos control), según el protocolo descrito por Stefan Wirtz y colaboradores [948]. El día 7 se administró intrarrectalmente 0,1 ml de una solución de TNBS al 2% en etanol al 50% (V·V⁻¹) (etanol al 50% en los grupos control). Para ello se sometió al animal a anestesia con una mezcla de ketamina (Ketamidol 100 mg · ml⁻¹; Richter Pharma) y xilacina (Rompun 2%;

Bayer Healthcare), preparada con 6,8 ml de PBS, 2,4ml de ketamina y 0,8 ml de xilacina.

Durante el desarrollo del protocolo experimental, los consumos de agua y comida, así como la modificación del peso corporal, fueron registrados diariamente. El sacrificio de las animales se realizó 5-7 días después de la inducción de la colitis.

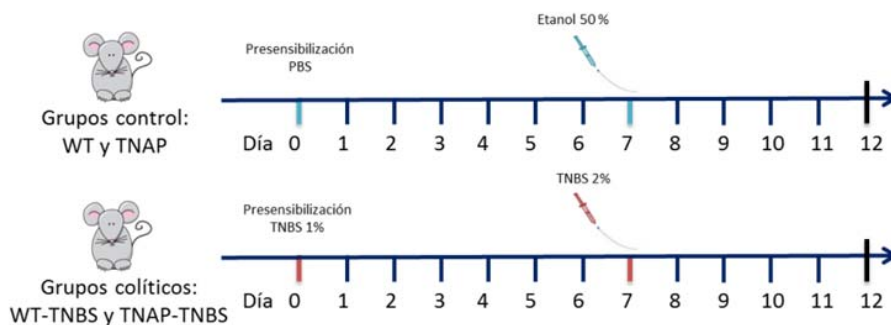


Figura 12. Esquema de modelo de colitis inducida por TNBS al 2% en ratones.

1.2. Colitis aguda inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)

La colitis se indujo mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS), de un peso molecular de 36000-50000 Da, de MP Biomedicals (Ohio, Estados Unidos) en el agua de bebida. Para ello se utilizó una concentración del 5% ($m \cdot V^{-1}$) para la rata y del 1% ($m \cdot V^{-1}$) para el ratón (Figura 13).

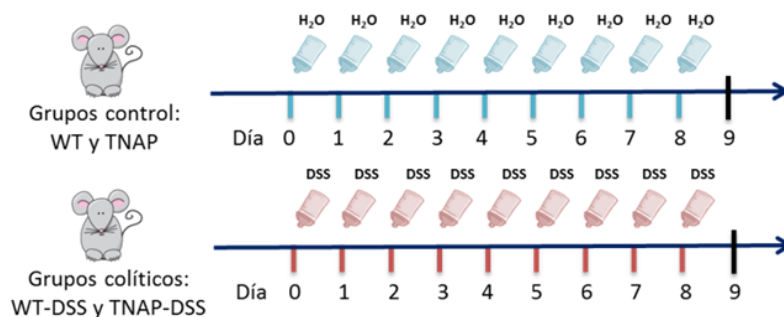


Figura 13. Esquema de modelo de colitis aguda inducida por la administración de DSS al 1% en ratones.

Se llevó a cabo un control diario del peso corporal, del consumo de agua y comida y del estado general del animal, así como de la posible presencia de sangre en heces y de la consistencia de las mismas. Según estos parámetros se calculó un índice de actividad de la enfermedad (DAI) modificado a partir del descrito por Stucchi y colaboradores en 2000 [949] (Tabla 6). Este mismo índice se utilizó también para valorar el índice de actividad en la colitis crónica inducida por DSS (ver apartado 1.3). El período de administración de DSS en rata fue de 5-7 días y de 9 días en ratón, tras el cual los animales fueron sacrificados.

1.3. Colitis crónica inducida por DSS

El modelo crónico de colitis por DSS consiste en la repetición alternante de ciclos de administración de DSS (al 1% en este caso), concretamente de 5 días de DSS y 10 días de agua, hasta un total de 3 ciclos (Figura 14). Los animales fueron sacrificados el día 5 post-DSS del tercer ciclo (día 40).

Parámetro	Descripción	Puntuación
Estado del animal	Normal	0
	Algo letárgico y/o algo de pérdida de pelo	1
	Claramente letárgico, comportamiento extraño	2
	Letárgico y pérdida de pelo	3
	Extremadamente letárgico	4
Heces	Normal	0
	Heces ligeras	1
	Heces blandas	2
	Diarrea	3
Sangrado	No hay sangrado	0
	Heces negras en la jaula o puntos de sangre	1
	Sangrado en el ano	2
	Sangrado auténtico	3
Pérdida de peso corporal (%)	No	0
	1-5%	1
	5-10%	2
	10-15%	3
	>15%	4

Tabla 6. Cálculo del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en el modelo de colitis inducida por DSS. Se incluyen hasta 4 parámetros con una puntuación comprendida entre 0 y 14.

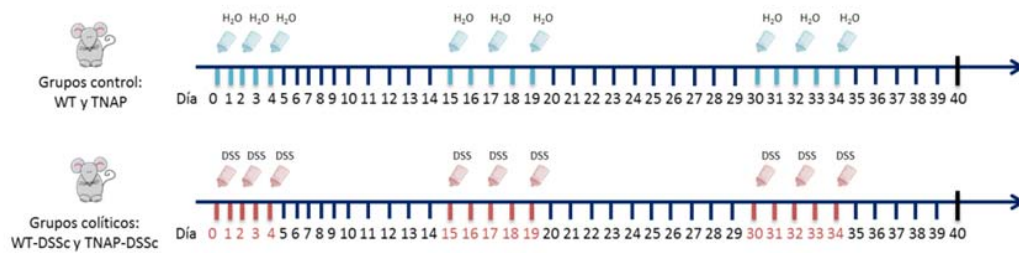


Figura 14. Esquema de modelo de colitis crónica inducida por la administración de DSS 1% en ratones.

1.4. Modelo de transferencia celular adoptiva

En un primer experimento se aislaron las células T CD4⁺ CD62L⁺ de esplenocitos mediante separación MACS[®] (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de un donante WT C57BL/6J. Utilizando el kit de aislamiento *CD4⁺ CD62L⁺ T Cell Isolation kit II*, se obtienen las células CD4⁺ por selección negativa y posteriormente las células CD4⁺ CD62L⁺ por selección positiva. Una vez purificadas, las células se resuspendieron en PBS, que fue usado como vehículo para la administración intraperitoneal. Inicialmente se utilizaron ratones SCID como receptores, a los que se les inyectó un millón de células en 100 μ l de PBS. Se controló semanalmente el peso y el estado de los animales, hasta que fueron sacrificados 16 semanas después de la transferencia, una vez que la colitis estuvo instaurada.

Posteriormente realizamos otra variante de este modelo de transferencia. Se aislaron las células T CD4⁺ CD25⁻ de esplenocitos mediante separación MACS[®] (Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania), se evaluó la pureza mediante FACS (superior al 95%) y se utilizó esta fracción como población inductora de colitis. En este experimento se comparó la capacidad colitogénica de los linfocitos provenientes de ratones TNAP^{+/-} y de ratones WT. Una vez purificadas las células se resuspendieron en PBS y se inyectó intraperitonealmente medio millón de células en 100 μ l de PBS a cada ratón inmunodeficiente Rag^{-/-}. Se controló el peso de los animales 2-3 veces por semana tras la transferencia. Además se monitorizó la colitis utilizando un endoscopio acoplado a un sistema de vídeo de alta resolución (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) a diferentes tiempos en animales anestesiados. Los animales fueron sacrificados 8 semanas después de la transferencia tras la evaluación con el endoscopio.

2. Modelos experimentales de infección intestinal

2.1. Infección por *Citrobacter rodentium* (*C.rodentium*)

El día previo a la infección con *C.rodentium* ICC169 [870] se preparó un cultivo ad hoc a partir de una colonia de *C.rodentium*, incubando 18 horas en 10 ml de medio Luria Bertani (LB) suplementado con eritromicina (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bajo agitación (230 rpm) a 37°C. El día de la infección se realizó un subcultivo tomando 500 μl del cultivo realizado el día anterior en 50 ml de medio LB suplementado con eritromicina (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), el cual se mantuvo en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1,12 aproximadamente. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendió en PBS y se administraron 200 μl por ratón (en ayunas) utilizando sondas gastroesfágicas. Se estudiaron dos grupos, un grupo control (WT) y un grupo de ratones TNAP^{+/-}.

Se administró una dosis de aproximadamente 2×10^9 CFU/ratón. Posteriormente, se cultivaron diluciones de la solución de *C.rodentium* administrada en placas de LB suplementadas con eritromicina (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para comprobar esta dosis. Tras la infección se controló diariamente el peso de los animales y se sembraron diluciones seriadas de heces en PBS (1:10). Se rasuró la zona abdominal de los animales para facilitar el seguimiento visual de la carga bacteriana por bioluminiscencia, utilizando un sistema de imagen IVIS100 (Xenogen, Alameda, CA, Estados Unidos). Tras 12 días los animales fueron sacrificados.

2.2. Infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*)

El protocolo empleado para la infección por *S. Typhimurium* UK-1 [870] fue similar al descrito en el apartado anterior aunque con algunas diferencias. En este caso, el día previo a la administración de *S. Typhimurium* se trató a los animales con 20 mg de estreptomina por ratón. Al tratarse de un modelo más agresivo, el día 0 se administró una dosis de aproximadamente 1×10^6 CFU/ratón y los animales fueron sacrificados a los 5-6 días después de la infección.

3. Modelo experimental de mucositis gastrointestinal

3.1. Mucositis inducida por 5-fluorouracilo (5-FU)

Se administró 5-fluorouracilo (5-FU) intraperitonealmente disuelto en PBS para la inducción de mucositis. Al grupo control se le administró PBS.

Se empleó una dosis diaria de 50 mg·Kg⁻¹ de 5-FU durante 5 días (Figura 15). Los animales fueron sacrificados el quinto día. Se controló a diario el peso de los animales, así como el consumo de agua y comida.

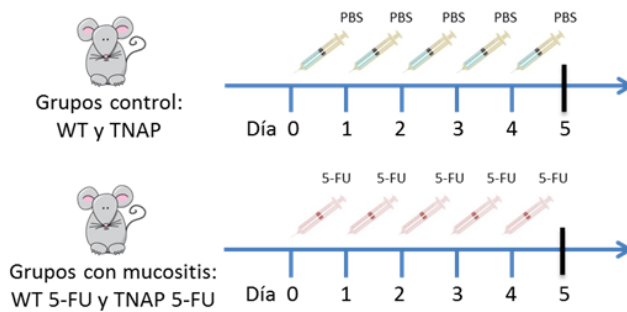


Figura 15. Esquema de modelo de mucositis inducida por la administración de 5-fluorouracilo empleado en ratones.

IV. EVALUACIÓN PATOLÓGICA DE LOS MODELOS *IN VIVO*

1. Determinaciones en los segmentos intestinales

Tras la muerte del animal, en función del modelo a estudiar se obtuvieron diferentes segmentos del intestino: duodeno, yeyuno, íleon y colon.

2. Cuantificación macroscópica del daño colónico y determinación del área dañada

En todos los casos se limpiaron los segmentos intestinales para eliminar los restos luminales y adherencias mesentéricas, manteniéndolos sobre una superficie fría. Los intestinos fueron posteriormente abiertos longitudinalmente y se realizó una valoración del daño macroscópico por parte de al menos un observador. Para evitar posibles sesgos, se documentó mediante fotografía el aspecto del intestino por su cara mucosal, y se evaluó el daño a posteriori por otros dos observadores cegados respecto a la identidad de la muestra. En algunos casos se utilizó el programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) para cuantificar el porcentaje de área dañada. Esta determinación se realizó fundamentalmente en el modelo de colitis inducida por TNBS.

El criterio de valoración se basa en la presencia de adhesiones, cicatrices, fragilidad, dilatación proximal, necrosis, deformación, obstrucción intestinal, hiperemia y fibrosis, dando un valor comprendido entre 0 y 24 (Tabla 7) [950-954]. A continuación se determinó el peso de cada segmento, así como su longitud bajo un peso constante de 2 g y la correspondiente relación peso/longitud.

Finalmente, el segmento intestinal fue dividido en varias tiras longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros; de igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales y adyacentes al daño que se emplearon para las pruebas histológicas y para la extracción de ARN, respectivamente. Las muestras así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico.

Parámetro	Descripción	Valoración
Adhesiones	Ninguna	0
	Disección dificultosa	1
	Adherencias visibles	2
	Ovillo brutal	3
Obstrucción	Limpieza normal	0
	Requiere limpieza manual	1
	Impacto fecal	2
Hiperemia	Aspecto normal	0
	Ligera o bien intensa pero parcheada	1
	Intensa y generalizada	2
	Franca hemorragia	3
Fibrosis	No hay rigidez	0
	Cierta rigidez	1
	Marcada rigidez	2
Necrosis	Ninguna	0
	Restos aislados	1
	Parcheada (aspecto de guijarros)	2
	Lesión focal ($\varnothing < 0,8$ cm)	3
	Lesión focal ($\varnothing > 0,8$ cm)	4
	Lesión esencialmente continua y extensa	5
Deformación	Forma normal	0
	Forma ligeramente anormal	1
	Deformación en círculo o elipse	2
	Deformación total	3
Otros	Dilatación proximal	+2
	Fragilidad	+1
	Cicatrices	+1

Tabla 7. Cálculo del índice de daño macroscópico (IDM). Se incluyen hasta 7 parámetros con una puntuación global comprendida entre 0 y 24.

3. Histología: tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica

Los segmentos transversales obtenidos tras el sacrificio fueron fijados con formaldehído al 4% ($P \cdot V^{-1}$). A partir de estas muestras se obtuvieron secciones de un grosor aproximado de 5 μm con un micrótomo estándar. Las secciones microscópicas fueron montadas en portas y sometidas a una tinción rutinaria con hematoxilina-eosina, para el estudio de la morfología y disposición del tejido colónico.

Mediante inmunohistoquímica (IHC) utilizando el método de inmunodetección indirecta en dos etapas, se detectaron diferentes proteínas gracias al empleo de anticuerpos específicos. El primer paso consistió en desparafinar y rehidratar las muestras mediante sucesivos lavados en varias cubetas con: xileno 5 minutos, xileno 5 minutos, etanol 99% 2 minutos, etanol 99% 2 minutos, etanol 90% 2 minutos, etanol 70% 2 minutos y finalmente lavado con agua corriente. Después de la desparafinación se realizó un proceso conocido como recuperación de inmunorreactividad, recuperación antigénica o desenmascaramiento del epítipo. Para ello, se introdujeron los cortes histológicos en una jarra tipo Coplin a 95-99°C con tampón citrato 10 mM (pH 6) ó tampón 10 mM Tris - 1 mM EDTA (pH 9), en función del anticuerpo utilizado, durante 20 minutos. Una vez enfriadas las muestras se bloqueó la peroxidasa endógena tratando las muestras con H_2O_2 al 3% durante 10 minutos y tras un lavado con agua corriente se bloquearon los lugares de unión inespecífica con 200 μl de Protein Block Serum-Free (DAKO, Barcelona, España) durante 20 minutos. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario: anti-IAP (1:500; Fisher Scientific: PA1-22529) ó anti-TNAP (1:500; Abcam: EPR4477) y se incubó durante 18 horas. Tras 2 lavados con TBS (Tris 50 mM (pH 7,5) y NaCl 0,15 M) se añadió el anticuerpo secundario (DAKO Envision Detection System). Tras la incubación durante 30 minutos se lavó 2 veces con TBS y se reveló con DAB (DAKO) durante 5 segundos. Y tras un lavado con agua corriente se llevó a cabo una contratinción con hematoxilina durante 30 segundos, un lavado en carbonato de litio, y la deshidratación de las muestras con lavados de un minuto en pases sucesivos cubetas con: etanol 70%, etanol 90%, etanol 90%, etanol 99%, etanol 99%, xileno y xileno. Y finalmente el montaje de las muestras con medio de montaje (Vitro-clud). La toma de imágenes se realizó con un microscopio Leica DMI 3000B, con diferentes aumentos.

En la tinción de las células IEC-18 se realizaron algunas variaciones: concretamente el bloqueo se realizó con PBS/suero de caballo y se incubó con el anticuerpo primario B4-78 anti-TNAP (1:50 con 0,1% saponina) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-FITC.

4. Cuantificación del índice de inflamación colónica de animales infectados con *C.rodentium*

Se valoró la inflamación de las muestras de colon teñidas con hematoxilina-eosina utilizando una escala de 0 a 6 a doble ciego (Tabla 8). Existen dos subescalas, una para determinar la infiltración celular (0-3) y otra para determinar el daño en el tejido (0-3), lo que da lugar a una puntuación combinada que va desde 0 (sin cambios) a 6 (infiltración celular generalizada y daño tisular extendido) [955].

Parámetro	Descripción	Puntuación
Infiltración celular	Células inflamatorias no presentes o muy poco frecuentes.	0
	Número de células inflamatorias incrementado, incluidos neutrófilos.	1
	Clústeres de células inflamatorias en la submucosa.	2
	Infiltraciones celulares transmurales.	3
Daño tisular	Estructura normal.	0
	Daño epitelial focal aislado.	1
	Ulceraciones y erosiones en la mucosa.	2
	Daño amplio en la mucosa que se extiende hasta las estructuras más profundas del intestino.	3

Tabla 8. Cálculo del índice de inflamación colónica. Se valoran 2 parámetros con una puntuación final de 0 a 6.

5. Cuantificación de la elongación de las criptas en el modelo de *C.rodentium*

La longitud de las criptas intestinales fue determinada en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina utilizando el software Leica Application Suite® versión 2.8.1. del microscopio Leica DMI 4000 B. Se realizaron al menos 5 medidas de cada muestra.

6. Índice endoscópico de la actividad de la colitis

El índice endoscópico (IE) de actividad de la colitis se basó en la evaluación de la aspecto más o menos translúcido de la mucosa colónica, la vascularidad, la granularidad, los depósitos de fibrina y, por otra parte, la consistencia de las heces (Tabla 9).

Parámetro	Descripción	Valoración
Translucencia	Transparente	0
	Moderado	1
	Marcada	2
	Opaco	3
Vascularidad	Normal	0
	Moderada	1
	Marcada	2
	Sangrado	3
Granularidad	Ninguna	0
	Moderada	1
	Marcada	2
	Extrema	3
Fibrosis	Nada	0
	Algo	1
	Marcado	2
	Extremo	3
Heces	Normal-sólidas	0
	Con forma-blandas	1
	Sin forma	2
	Diarrea	3

Tabla 9. Índice endoscópico de la actividad de la colitis. Se incluyen hasta 5 parámetros con una puntuación comprendida entre 0 y 15.

7. Translocación bacteriana

La translocación de bacterias del lumen intestinal se determinó mediante detección en hígado de una secuencia conservada del RNA 16S. Para ello, se aisló ADN de las muestras de hígado de rata utilizando las columnas QIAamp DNA minikit (QIAGEN, Madrid, España), se cuantificó el ADN con un Nanodrop (Fischer Scientific, Madrid, España) y se realizó una PCR cuantitativa utilizando el sistema de PCR Stratagene MX35005P, utilizando la siguiente pareja de cebadores: AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG/ACC GCC ACT GCT GCT GGC AC. Esta técnica fue descrita originalmente por el grupo de Eduard Cabré [956].

V. LÍNEAS CELULARES DE EPITELIO INTESTINAL

Las líneas celulares de epitelio intestinal empleadas (Caco-2 [ATCC®-HTB-37™], HT29 [ATCC®-HTB-38™], T84 [ATCC®-CCL-248™], IEC6 [ATCC®-CRL-1592™] e IEC18 [ATCC®-CRL-1589™]) fueron obtenidas del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. En todos los casos se empleó como

medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero bovino fetal (10% V·V⁻¹), L-glutamina (2 mM) y antibióticos (1% V·V⁻¹) (penicilina [100 U·ml⁻¹], estreptomina [0,1 mg·ml⁻¹] y anfotericina B [2,5 µg·ml⁻¹]). Los diversos cultivos se mantuvieron en una atmósfera con el 5% de CO₂ y a 37°C. Las células fueron mantenidas en placas de Petri de 78,5 cm² hasta su confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días.

Cuando se consideró oportuno, los cultivos celulares fueron tratados con diferentes reactivos. Las células y los sobrenadantes se recogieron a diferentes periodos de tiempo (0, 3, 6, 9 y 24 horas) en función del experimento (Tabla 10).

VI. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos, que fueron dispuestos en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con antibióticos (composición descrita anteriormente). Una vez que se eliminó la grasa adherida a dichos órganos, éstos fueron presionados mecánicamente con ayuda de unas pinzas para la obtención de una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada durante 30 minutos a 4°C en tampón de lisis (0.15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃ y 0,1 mM de Na₂EDTA·2H₂O, pH 7,3). Las células mononucleares aisladas se dispusieron en un medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado con suero bovino fetal (10% V·V⁻¹), L-glutamina (2 mM), antibióticos (1% V·V⁻¹) (penicilina [100 U·ml⁻¹], estreptomina [0,1 mg·ml⁻¹] y anfotericina B [2,5 µg·ml⁻¹]) y 0,05 mM de β-mercaptoetanol. Tras el conteo celular, 0,5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 1 millón de células/ml (para la determinación de citoquinas); o 15 millones de células en placas de 6 pocillos y una densidad celular de 5 millones de células/ml (para estudios de actividades enzimáticas, Western blot o extracción de ARN). El cultivo se realizó en atmósfera con un 5% de CO₂ durante 24 o 48 horas a 37°C para la determinación de citoquinas y la expresión proteica y génica, respectivamente. La estimulación de las células obtenidas se realizó mediante la adición al cultivo de la lectina concanavalina A (5 µg·ml⁻¹, ConA) o LPS (1 µg·ml⁻¹). Las muestras obtenidas en los diversos experimentos, sobrenadantes homogenados celulares o ARN aislado de las células, fueron mantenidas a -80°C hasta su utilización.

Tratamientos	Concentración	Función
8-bromo-cAMP	0,5 mM	Permeabilidad celular, análogo cAMP
Ácido ascórbico	50 μ M	Antioxidante
Actinomicina D	8 μ M	Inhibidor de la transcripción
Butirato	8 mM	Diferenciación enterocitos
Butirilhidroxianisol		
Cicloheximida	35 μ M	Inhibidor de la síntesis proteica
Desoxicolato sódico	0,8 mM	Detergente
Forskolina	0,1 μ M	Activador de la adenilato ciclasa
Genisteína	3 μ M	Inhibidor de la tirosina kinasa
Glutation (GSH)	5 mM	Antioxidante
H89	1 μ M	Inhibidor de la PKA
IFN- γ	10 ng/ml	Citoquina pro-inflamatoria
IL-1 β	10 ng/ml	Citoquina pro-inflamatoria
Indometacina	1 μ M	Inhibidor de la ciclooxigenasa
Ionomicina	1 μ M	Ionóforo Ca ²⁺
Isobutil-metil-xantina (IBMX)	0,5mM	Inhibidor de la fosfodiesterasa cAMP
Manitol	40 mM	Hiperosmolaridad
Monocloramina (NH ₂ Cl)	0,1-5 mM	Agente oxidante
N-acetil-cisteína (NAC)	200 μ M	Antioxidante
PD98059	10 μ M	Inhibidor ERK
PMA	1 μ M	Activador de la proteín kinasa C
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	10 mM	Agente oxidante
Prednisolona	20 μ M	Glucocorticoide
Saponina	0,02 %	Detergente
SB203580	10 μ M	Inhibidor p38
SP600125	10 μ M	Inhibidor JNK
Terbutil hidroperóxido (tButOOH)	0,1-5 mM	Agente oxidante
TNF- α	10 ng/ml	Citoquina pro-inflamatoria
Tunicamicina	10 μ g/ml	Inhibidor de la N-glicosilación

Tabla 10. Tratamientos usados en los experimentos celulares *in vitro*.

VII. TÉCNICAS GENERALES

1. Obtención de plasma

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral, utilizando heparina como anticoagulante (5000 UI·ml⁻¹). En algunos casos, se

separó una alícuota de 50µl, para analizar las diferentes poblaciones hematológicas utilizando un contador hematológico Mythic 22CT (C2 Diagnostics). Esta determinación se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. La sangre resante fue sometida a una centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4°C, para obtener así el plasma. Las muestras obtenidas fueron conservadas a -80°C hasta su análisis.

2. Determinación de la concentración de proteínas

Las muestras de tejido se homogeneizaron en tampón de homogeneización (Tris Base (50 mM) y bromuro de hexametiltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (P·V⁻¹)) o en solución salina al 0,9% utilizando para ello un homogeneizador tipo potter (Heidolph). Las células de los cultivos celulares tras varios lavados con solución salina, se recogieron en solución salina al 0,9% o PBS. En todas estas muestras se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinchonínico (BCA) [957], usando la albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Este método combina la reducción de ión cúprico (Cu²⁺) a ión cuproso (Cu¹⁺) usando un reactivo que contiene BCA, generado mediante mezcla extemporánea de los reactivos A y B en relación 50:1. Reactivo A: 5 g BCA, 10 g Na₂CO₃·H₂O, 0,8 g de tartrato sódico, 2 g NaOH y 4,75g NaHCO₃ csp 500 ml y reactivo B: 2 g de CuSO₄·5H₂O en 50 ml de agua). Se incuban 4 µl de muestra junto con 196 µl de reactivo durante 1 hora a 37°C. El producto final de la reacción es de un color púrpura formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ion cuproso. Este complejo hidrosoluble puede ser detectado mediante absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Las diferentes actividades enzimáticas se normalizaron en función de la concentración de proteínas.

3. Determinación de actividades enzimáticas

Para cada determinación se preparó un blanco, que nos permitió determinar la cantidad de producto que aparece en la mezcla de ensayo que no se ha originado por la acción de la enzima y que es debido a transformaciones químicas o a su presencia en la mezcla. Para ello se preparó una mezcla de ensayo en la que en lugar de añadir muestra se añadió agua destilada. Este blanco se realizó por duplicado en cada medida. Posteriormente se le añadieron los mismos reactivos que a las demás muestras y se determinó la absorbancia a la longitud de onda apropiada para cada actividad. El valor de absorbancia de estas muestras se consideró 0.

3.1. Actividad mieloperoxidasa (MPO)

La muestra de colon fue homogeneizada en un tampón HTAB/Tris (ver apartado anterior). Se tomó una alícuota para determinar la actividad AP y el resto de la muestra se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación-sonicación, procesos que facilitan la ruptura de las estructuras celulares, favoreciendo de este modo la liberación de la enzima. Tras la última descongelación, se centrifugó el homogenado a 7000 g durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad MPO. Ésta se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisidina y H₂O₂, según describió Krawisz en 1984 [958], con mínimas modificaciones. Para ello, se añadieron 50 µl del sobrenadante a 150 µl del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,668 mg·ml⁻¹) y peróxido de hidrógeno al 0,0005 % (V·V⁻¹) en tampón fosfato sódico (50 mM, pH 6). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm. La actividad MPO se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con peroxidasa de rábano. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 µmol/min de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

3.2. Actividad fosfatasa alcalina (AP)

Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito en 1946 por Bessey [959] y posteriormente adaptado por Sánchez de Medina y colaboradores en 2004 [47]. En dicho protocolo, la AP actúa sobre el p-nitrofenilfosfato sódico dando lugar a fosfato y a anilina, la cual presenta color amarillo, que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Para ello se incubaron por duplicado 5 µl de muestra con 10 µl de agua, 25 µl de tampón glicina 50 mM con 0,5mM MgCl₂ y 50 µl de reactivo (p-nitrofenilfosfato sódico 5,5 mM en tampón glicina) a 37°C durante diferentes periodos de tiempo en función del tipo de muestra biológica. Asimismo, se determinó rutinariamente la sensibilidad a inhibición por levamisol in vitro, midiendo en paralelo la actividad enzimática en presencia de distintas concentraciones de levamisol (0,1, 1 y 10 mM). Tras el tiempo necesario de incubación, se paró la reacción con 120 µl de NaOH 2N y se midió la absorbancia a 405 nm. Una unidad de AP (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 µmol/min de p-nitrofenilfosfato sódico en condiciones estándar. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína.

3.3. Actividad leucina aminopeptidasa

La muestra de colon fue homogenizada en un tampón Tris 50mM (pH 7,5) utilizando un homogeneizador tipo potter (Heidolph). Alternativamente, las muestras celulares fueron homogeneizadas por sonicación (Hielscher-Ultrasound Technology UP100H). El homogenado se centrifugó a 7000 g durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad leucina aminopeptidasa. Ésta se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de la L-leucín-p-nitroanilida·HCl, según describió Marouzx en 1973 [960], con mínimas modificaciones. Para ello, se añadieron 30 µl del sobrenadante a 170 µl del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por L-leucín-p-nitroanilida·HCl 1,2mM en tampón Tris 50mM (pH 7,5). Se determinó la absorbancia a 405 nm. La actividad leucina aminopeptidasa se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con p-nitroanilida. Una unidad de leucina aminopeptidasa (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 µmol/min de p-nitroanilida a 25°C. Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

3.4. Actividad maltasa

La muestra La muestra de colon fue homogeneizada en un tampón maleato sódico 0,1M (pH 6) utilizando un homogeneizador tipo potter (Heidolph). Alternativamente, las muestras celulares fueron homogeneizadas por sonicación (Hielscher-Ultrasound Technology UP100H).El homogenado se centrifugó a 7000 g durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad maltasa. La determinación se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en la detección de la glucosa generada por la acción de la enzima, según describió Dahlqvist en 1968 [961], con mínimas modificaciones. Para ello, se añadieron 30 µl del sobrenadante, 20 µl de maltosa, 20 µl de tampón maleato y 100 µl del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, para preparar 100ml se añadieron 10 ml de tampón Tris·ClH 0,5M, 10 mg de o-dianisidina, 100µl de Triton X-100, 0,2 mg glucosa oxidasa y 0,05 mg de peroxidasa. Se determinó la absorbancia a 405 nm. La actividad maltasa se calcula por interpolación en una curva patrón, realizada con glucosa. Una unidad de maltasa (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1 µmol/min de maltosa a 25°C. Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

3.5. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

La medida de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o dañadas que se han visto afectadas por un agente tóxico. A través de una técnica espectrofotométrica, se determinó la actividad láctico-deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de los diversos cultivos celulares, como medida de toxicidad celular. Para ello se determinó la desaparición del cofactor β -NADH a 340 nm, consumido en la reacción que convierte el ácido pirúvico (añadido como reactivo a la concentración de 25 mM) en ácido láctico, y que es catalizada por dicho enzima. En este caso concreto, para evitar las interferencias debidas al color del medio de cultivo y sus variaciones al añadir los diferentes tratamientos, se utilizó un blanco para cada muestra, en el que a la muestra se le añadían todos los reactivos excepto el ácido pirúvico que es sustituido por tampón fosfato (pH 7,5). Como estándar se empleó LDH de músculo de ternero, y los datos fueron expresados como $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4. Determinación de la secreción de citoquinas

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares, el sobrenadante obtenido fue centrifugado durante 10 minutos a 10.000 rpm para eliminar los restos celulares, y conservado a -80°C hasta su utilización. Diversos kits comerciales fueron empleados para la medida de las concentraciones de citoquinas en dichos sobrenadantes mediante la técnica de enzimo-inmuno ensayo (ELISA). Para ello, se llevó a cabo un protocolo de medida basado en las indicaciones del fabricante. Los kits empleados fueron suministrados por Biosource Europe, Nivelles, Bélgica (IL-2 de rata e IL-8 humana) y BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica (IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF- α de rata y de ratón). Los resultados se expresan como pg/ml .

5. Citometría de flujo

Esplenocitos, células de los ganglios linfáticos mesentéricos y células sanguíneas fueron analizados mediante citometría de flujo. Para ello, se centrifugaron las células durante 5 minutos a 500 g y cada precipitado se mezcló con 50 μl de la solución de anticuerpo. Todos los anticuerpos utilizados, excepto si se indica lo contrario, fueron suministrados por BD Bioscience. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD3-FITC, CD4-APC (or FITC), CD19-APC, Foxp3-PerCP (eBioscience) y CD11b-PE. La tinción con

Foxp3 se llevó a cabo con un paso adicional de acuerdo con el kit de permeabilización y fijación (Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent kit, de eBioscience). Una vez añadido el anticuerpo, se incubaron las muestras durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 500 g. (En el caso de las células sanguíneas se descartó el sobrenadante y se incubó con tampón de lisis de eritrocitos durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 5 minutos a 500 g). Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado de las células con 200 µl de PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 500 g. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de paraformaldehído al 2% en PBS a cada muestra y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience). Los resultados se analizaron con el software Cell Quest™ (Becton Dickinson, Canadá).

6. Preparación de muestras para Western blot

Las proteínas colónicas fueron obtenidas tras la homogeneización mecánica con un homogeneizador tipo potter (Heidolph) en tampón RIPA (PBS: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 1,15 g/l Na₂HPO₄·7H₂O; dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% (P·V⁻¹), desoxicolato sódico al 0,1% (P·V⁻¹) y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (AEBSF 104 mM, aprotinina 80 µM, leupeptina 2 mM, bestatina 4 mM, pepstatina A 1,5 mM y E-64 1,4 mM). En el caso de las muestras procedentes de cultivos celulares, utilizando el mismo tampón descrito, se lisaron mediante ultrasonidos. El homogenado resultante en ambos casos se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C para la eliminación de los restos de membranas celulares. El sobrenadante obtenido fue conservado a -80°C hasta su utilización. El contenido proteico total fue medido mediante el método del ácido bicinchonínico (ver apartado 2 de esta sección).

7. Western blot

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos junto con el tampón de carga (SDS 312 mM, glicerol 50% (V·V⁻¹), 2-mercaptoetanol 1% (V·V⁻¹), EDTA sal trisódica 22,5 mM, Tris 220 mM y trazas de azul de bromofenol (pH 6,8)). Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de acrilamida, en un porcentaje mayor o menor en función del tamaño de las proteínas (proteínas de pequeño o de gran peso molecular respectivamente), éstas fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron

bloqueadas durante 1,5 horas a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (TBS: Tris 50 mM y 0,15 M NaCl; y Tween-20 1 ml·l⁻¹). La membrana se expuso a una solución de ácido acético al 1% (V·V⁻¹) que contiene rojo Ponceau al 0,5% (P·V⁻¹) como control rutinario de carga [962]. Tras 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno, se realizó la exposición al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4º C. La tabla 11 muestra los diferentes anticuerpos empleados así como las diluciones empleadas; todos ellos fueron diluidos para su aplicación en TBS-T con BSA al 5% (m·V⁻¹). Como control adicional de carga, todas las membranas fueron expuestas a un anticuerpo frente α -actina o GAPDH (Tabla 11). Se lavaron las membranas 3 veces durante 5 minutos y a continuación se incubó con anticuerpos secundarios de la especie apropiada según el anticuerpo específico empleado: ratón (anti-mouse) o conejo (anti-rabbit). Este anticuerpo secundario estaba conjugado a peroxidasa, de modo que las bandas fueron detectadas usando un reactivo que genera quimioluminiscencia asociada a peroxidasa (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

8. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción (RT)

El ARN total de las distintas muestras fue obtenido usando TRI Reagent® (Applied Biosystems). Las muestras fueron homogeneizadas utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax® (IKA Labortechnik T25 basic, Alemania) añadiendo 1 ml de TRI Reagent, después las muestras se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 100µl de BCP (1-bromo-3-cloropropano) a cada muestra y se vuelve a incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa se pasa a un tubo limpio. Se añaden 500µl de isopropanol, se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y se congela a -80°C durante 18 horas. Una vez descongeladas, las muestras se centrifugan a 12000 g durante 45 minutos a 4°C; después de este paso descartamos el sobrenadante. Posteriormente se realiza un lavado, añadiendo 1 ml de etanol al 75% y centrifugando a 7500 g durante 5 minutos a 4°C, descartamos el sobrenadante y el precipitado final se resuspende en agua libre de ARNasas (Applied Biosystems). Una vez obtenido el ARN se realiza un análisis de la integridad del ARN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA, Ambion) (P·V⁻¹) con el objeto de observar las bandas de las subunidades ribosomales 28 S y 18 S. Posteriormente, se cuantificó el contenido de ARN de las distintas muestras utilizando un nanodrop NanoVue® (GE Healthcare, Life Science, Barcelona,

España) que determina la absorbancia a 260 y 280 nm. Una cantidad total de 1 µg de ARN por muestra fue retrotranscrito para la obtención del ADN complementario, mediante el empleo de la enzima transcriptasa inversa, según las indicaciones del fabricante (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories®, California, EEUU). El ADN complementario se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso, mientras que el ARN se conservó a -80°C.

Anticuerpo primario	Especie/s que reconoce	Tamaño (KDa)	Dilución empleada	Anticuerpo secundario (dilución)	Casa Comercial: Referencia
anti- α -actina JLA-20	Rata, ratón.	43	1:1000	anti-mouse 1:2000	*
B4-50 (anti-TNAP)	Rata, ratón.	57	1:1000	anti-mouse 1:2000	*
B4-78 (anti-TNAP)	Rata, ratón.	57	1:100	anti-mouse 1:2000	*
anti-GAPDH (GA1R)	Rata, ratón, humano, bacteria.	37	1:5000	anti-mouse 1:2000	Epitope biotech Inc.: L001
anti-IAP	Rata, ratón.		1:1000	anti-rabbit 1:1000	#
anti-IAP	Ratón, humano.	60	1:1000	anti-rabbit 1:2000	Fisher Scientific: PA1-22529
anti-COX-2	Rata, ratón, humano.	72	1:1000	anti-rabbit 1:3000	Cayman chemical: 160106
anti-iNOS	Rata, humano.	130	1:2000	anti-rabbit 1:200	BD Transduction Laboratories™: 610333
anti-pERK	Rata, ratón, humano.	44,42	1:1000	anti-rabbit 1:200	Cell Signalling Technology®: 4370
anti-pJNK	Rata, ratón, humano.	46,54	1:1000	anti-rabbit 1:200	Cell Signalling Technology®: 9251
anti-pSNK	Rata, ratón, humano.	43	1:1000	anti-rabbit 1:200	Cell Signalling Technology®: 9211
anti-TNAP	Rata, ratón, humano.	57	1:2000	a-mouse 1:2000	Abcam: EPR4477

Tabla 11. Listado de anticuerpos utilizados. *generados por el Doctor Katzmann (Department of Biological Sciences Iowa City, IA). #generado y regalado por el Dr. Tsukamoto (Aichi Cancer Center Research Institute).

9. Análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Syber Green como fluoróforo (iQTM SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. En algunos casos se empleó ROX como fluoróforo de referencia (iTaqTM SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad Laboratories, California, EEUU). El gen de referencia elegido fue la subunidad 18S del ARN ribosómico y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos. La tabla 12 recoge las secuencias (sentido 5'-3') de los cebadores empleados. Se utilizó un aparato de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) Stratagene MX800 (La Jolla, CA, Estados Unidos). El aparato de qRT-PCR utilizado en los experimentos llevados a cabo en la Universidad de Nuremberg-Erlangen fue CFX96 (Biorad Laboratories®, California, EEUU) y los cebadores empleados para la determinación de angiotensina 4 (Ang4), fosfolipasa A2 (Plag2a), la lectina Reg-3β (*regenerating islet-derived protein III beta*, Reg3b) y las interlequinas IL-22, IL-17 e IL-1β se obtuvieron de QIAGEN. Los datos se procesaron mediante el método ddCt [963].

Especie	Cebador	Secuencia (sentido 5'-3')
Rata	18 S	CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC
Rata	IL-1β	AAT GAC CGT TTC TTT GAG GCT G CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT
Rata	LCN2	ACT CAG AAC TTG ATC CCT G AGG ATG GAA GTG ACG TTG
Rata	S100A8	GCC CAC CCT TAT CAC CAA C TGC CCT CAG TTT GTG CAG AA
Rata	TNAP	TGG CTC TCT CCA AGA CGT AC CTG GGC GCA TCT CAT TGT C

Tabla 12. Listado de cebadores utilizados.

10. Northern Blot

La expresión de la isoforma IAP se determinó en las células IEC-18 mediante Northern blot. Cantidades iguales (30µg) de ARN total se corrieron en geles 1% agarosa/formaldehído, transferidos a una membrana de nylon (Hybond-XLTM, Amersahm Pharmacia Biotech) y adhirieron a la membrana usando un UV-Stratalinker (Stratagene). La prehibridación e hibridación con las sondas marcadas ³²P se llevó a cabo en una solución ULTRAhyb (Ambion)

a 42°C. La sonda de IAP se obtuvo previamente [47]. Las sondas reconocieron ambas isoenzimas de la IAP de rata [72].

11. Análisis estadístico

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de significancia a posteriori Fisher LSD sobre parejas preseleccionadas. En el caso de comparar sólo dos grupos, la significancia estadística se determinó realizando la prueba *t* de Student. La significancia estadística se consideró a partir del valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática SigmaStat 3.5 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, EEUU).

ESTUDIOS PREVIOS

Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron la inducción de la actividad AP en diferentes modelos de colitis experimental en rata y ratón (Tabla 13) [47]. Todos los modelos de inflamación colónica e ileal que se examinaron, caracterizados por un significativo estrés oxidativo e infiltración leucocitaria, dieron lugar a un incremento en la actividad AP en colon (e íleon en el modelo de ileítis).

Especie	Modelo colitis	Actividad AP (mU/mg proteína)	
		Control	Inflamado
Rata	TNBS	5,6 ± 1,1	21,5 ± 3,6 ⁺
	DSS	6,7 ± 0,5	15,1 ± 2,0 ⁺
	Ácido acético	6,3 ± 0,5	21,0 ± 2,1 ⁺
	Iodoacetemida	6,4 ± 2,1	28,8 ± 5,4 ⁺
	HLA-B27	9,2 ± 1,6	44,8 ± 6,1 ⁺
	# Ileítis TNBS	72,5 ± 5,4	141,6 ± 16,6 ⁺
Ratón	TNBS	57,3 ± 6,2	120,8 ± 9,7 ⁺

Tabla 13. Actividad AP en diferentes modelos de inflamación colónica (# Ileítis). Resultados expresados como media ±EEM (n≥6) ⁺p<0,05 vs. Control.

Como se comentó anteriormente, las APs presentan diferencias en cuanto a su sensibilidad a la inhibición por diferentes productos, como el levamisol. El incremento de la sensibilidad a los inhibidores levamisol y homoarginina (Figura 16), junto con los cambios aparentes en el tamaño molecular y en la sialización de la enzima, apuntaban a un cambio de isoforma, presumiblemente de la forma hepática a la renal. De hecho, se observó un incremento de la expresión de TNAP mediante Western blot (Figura 17).

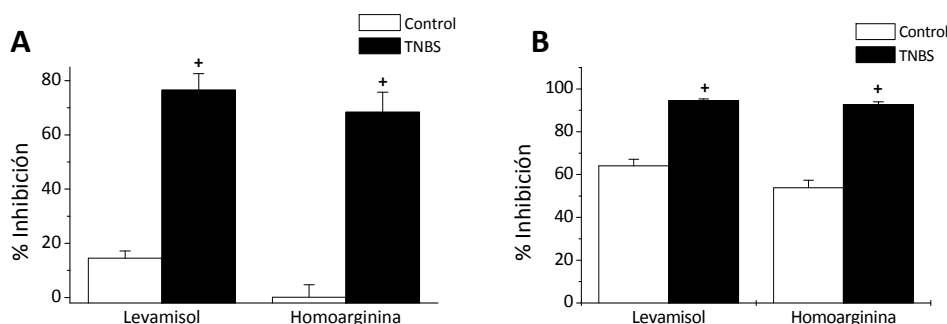


Figura 16. Sensibilidad al levamisol y a la homoarginina determinada en colon de animales control (Control) y con colitis inducida por TNBS (TNBS). **A.** Colonocitos aislados. **B.** Submucosa. Resultados expresados como media±EEM (n=7) ⁺p<0,05 vs. Control.

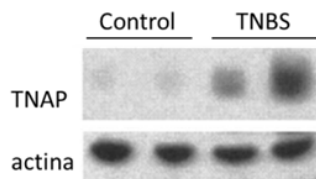


Figura 17. Expresión de la TNAP en colon de animales control (Control) y con colitis inducida por TNBS (TNBS) determinada por Western blot. Banda detectada a 57 KDa con el anticuerpo B4-78 en colon. Imagen representativa de un total de cinco experimentos (n= 12-14). Se utilizó la actina como control de carga.

En consecuencia, existe un incremento de expresión de TNAP en el intestino inflamado que está asociado a un cambio de isoforma dentro de este tipo enzimático, concretamente de la forma hepática (resistente a levamisol y homoarginina) a la renal u ósea. Este cambio es achacable en parte a la infiltración de neutrófilos y posiblemente otros leucocitos, que expresan este tipo de AP, pero también a una modulación de la expresión que tiene lugar en el epitelio. Se trata por tanto de un marcador de inflamación intestinal. Además, experimentos *in vivo* utilizando el modelo de colitis inducida por TNBS en rata pusieron de manifiesto que el tratamiento con levamisol o con el anticuerpo monoclonal B4-78 tenían cierto carácter protector, lo que sugería un posible papel patológico.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Dado que los estudios anteriores había puesto de manifiesto que se producía una modulación de la expresión de AP en el epitelio en el intestino inflamado, decidimos explorar este fenómeno utilizando modelos celulares *in vitro*. Se usaron las líneas celulares como modelo experimental ya que las células epiteliales intestinales primarias tienen poca viabilidad *ex vivo*. La Figura 18 A muestra que el tratamiento con monocloramina (NH_2Cl), terbutil hidroperóxido (tButOOH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) da lugar a un aumento marcado en la actividad de AP en las 4 líneas celulares utilizadas (el efecto del H_2O_2 en las células T84 fue demasiado tóxico y no se pudo medir la actividad AP). Además, se obtuvieron efectos similares con hipoclorito sódico e iodoacetamida, un inhibidor de la proteasa cisteínica (datos no mostrados). El aumento de la actividad AP estuvo siempre asociado a la toxicidad celular, así como a niveles altos de LDH en el medio celular (ver Figura 20) y ocasionalmente con la pérdida de células. Seleccionamos la línea celular IEC18 para los siguientes experimentos ya que no es de origen tumoral y por lo tanto debe tener un comportamiento más próximo al comportamiento normal de los enterocitos.

Como hemos comentado, en nuestro estudio anterior en modelos experimentales de colitis, demostramos un aumento en la actividad enzimática ligado a un cambio en la sensibilidad a inhibidores químicos, como el levamisol, en respuesta a la inflamación. Nos propusimos examinar si este efecto era reproducible en células IEC18 sometidas a estrés oxidativo. En consonancia con nuestros resultados previos, la actividad AP en células expuestas a oxidantes no sólo fue mayor sino también más sensible a la inhibición por levamisol (Figura 18 B). Se observaron resultados similares cuando se estudió la inhibición de la actividad AP con homoarginina así como su sensibilidad al calor (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 18 C, las isoformas de AP de riñón y hueso de rata son sensibles a la inhibición por levamisol, mientras que las de hígado e intestino delgado son resistentes.

El tButOOH fue el agente prooxidante más consistente de los que usamos y por ello fue seleccionado para los experimentos siguientes. La adición de tButOOH a las células IEC18 redujo el contenido de glutatión, de 13.3 ± 3.6 nmol/mg de proteína a niveles no detectables después de 24 horas (datos no mostrados), indicando que se había inducido efectivamente el estrés oxidativo. El tButOOH indujo la actividad AP a partir de 300 μM , no obstante, la sensibilidad a levamisol (% de inhibición de actividad basal AP) se incrementó a concentraciones aún menores (Figura 18 D). El tiempo de exposición a tButOOH fue de 10 minutos, dado que en estas condiciones se

obtuvieron resultados equivalentes a los de la exposición continua, mientras que en 5 minutos fueron infinitesimales. El aumento de AP se detectó a partir de las 3-9 horas de exposición a tButOOH y el pico máximo se produjo entre las 12 y las 24 horas (último punto examinado). Como se muestra en la figura 19 A, la AP sigue cinéticas completamente diferentes a otras enzimas del borde del cepillo, como leucina aminopeptidasa y maltasa, cuya actividad se inhibió inicialmente para recuperarse después pero sin superar los niveles previos a la exposición. Por lo tanto, el aumento de la actividad AP parece ser específico de esta enzima.

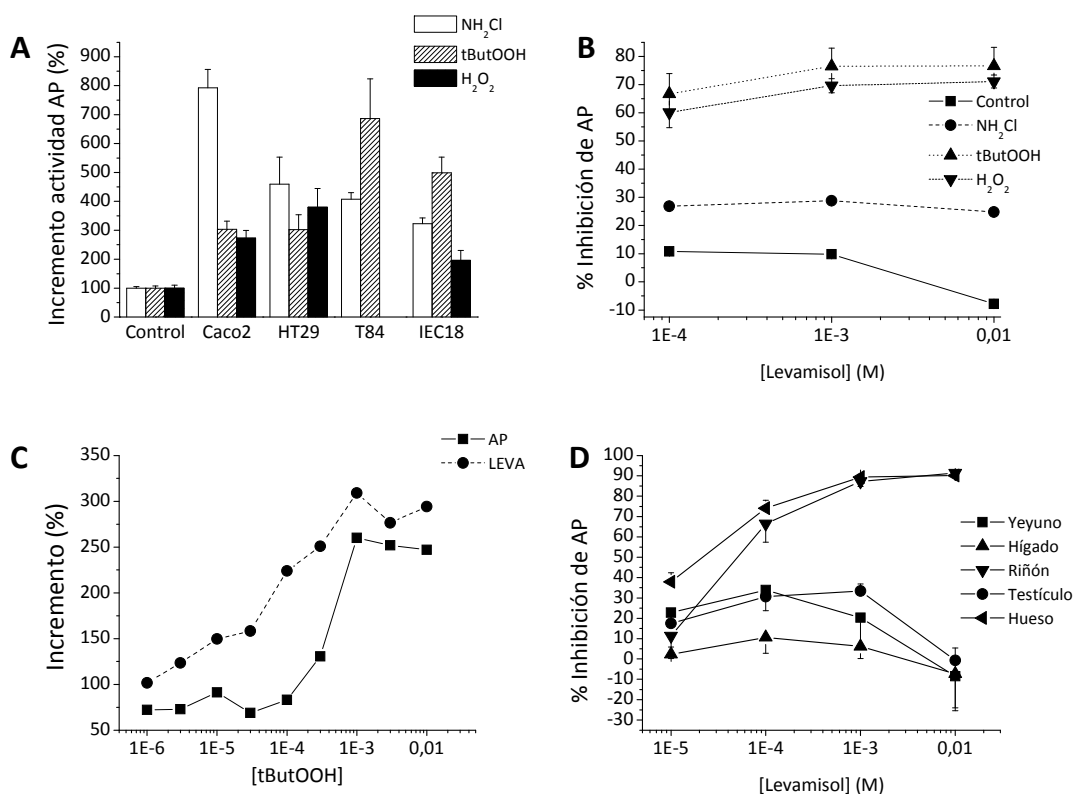


Figura 18. Efecto de los estímulos oxidativos sobre la actividad AP en varias líneas celulares de epitelio intestinal. Células Caco-2, HT29, T84 e IEC18 fueron tratadas con NH₂Cl 1mM, H₂O₂ 10mM o tButOOH 1mM. No se pudo medir AP en células T84 tratadas con H₂O₂ debido a su excesiva toxicidad. **A.** Actividad AP en las diferentes líneas celulares. La actividad AP basal fue (mU/mg prot): 17.4±1.1 (Caco-2), 8.9±1.9 (HT29), 16.0±3.4 (T84), 7.3±0.4 (IEC18). **B.** Sensibilidad al levamisol de la actividad AP en las líneas celulares de epitelio intestinal. La sensibilidad basal expresada en porcentaje de inhibición fue de 15.0±5.0 en Caco-2, 5.0±0.1 en HT29, 17.3±11.2 en T84 y 29.8±16.1 en IEC18. **C.** Sensibilidad al levamisol de la AP en diferentes tejidos de rata. **D.** Curva de concentración respuesta de la inducción de AP por tButOOH en células IEC18 (representativa de 4 experimentos). Los datos se expresan como media±EEM (n=5-8). Todas las medias en A y C son significativamente diferentes con respecto al grupo control (p<0.05, no mostrado).

Debido a la variada naturaleza de los agentes utilizados para inducir la actividad AP, y a que todos son agentes prooxidantes, suponemos que el mecanismo subyacente es el estrés oxidativo. Por lo tanto, estudiamos si se podía inhibir el efecto observado mediante el uso de antioxidantes (ver Figura 19 B). Ni el glutatión (GSH), ni el ácido ascórbico (ASC) ni la N-acetilcisteína (NAC) previnieron el aumento de actividad AP, mientras que el butirilhidroxianisol (BHA) tuvo un efecto pequeño, aunque significativo. Estos tratamientos tendieron a reducir el aumento en la sensibilidad a levamisol, pero sin alcanzar significancia estadística en ningún caso (datos no mostrados). A pesar de usar altas concentraciones de los agentes antioxidantes, no fue posible contrarrestar la depleción de glutatión ni la toxicidad celular.

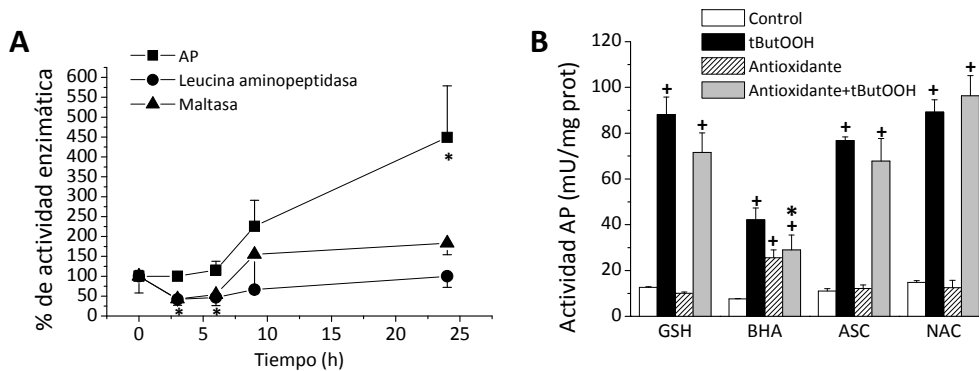


Figura 19. Estudio de las actividades enzimáticas: AP, leucina aminopeptidasa y maltasa; y efecto del uso de antioxidantes sobre la actividad AP. **A.** Actividades fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa y maltasa en células IEC18 expuestas a 2,5mM monocloramina (n=5) durante distintos periodos de tiempo. **B.** Efecto del pre-tratamiento antioxidante (GSH: glutatión, BHA: butirilhidroxianisol; ASC: ácido ascórbico y NAC: N-acetilcisteína.) en la inducción de AP por tButOOH. Los resultados se expresan como media±EEM (n≥5) + p<0,05 vs. Control; * p<0,05 vs. tButOOH.

Posteriormente, quisimos comprobar los efectos de una serie de estímulos sobre la actividad AP: butirato (But), eliminación del suero fetal bovino (-FBS), manitol (Man), LPS, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , saponina (Sapo) y desoxicolato sódico (Deoxy) (Figura 20). El butirato produjo un pequeño pero significativo aumento en la actividad enzimática (Figura 20 A), que se asoció a un aumento de la sensibilidad al levamisol (Figura 20 B). La eliminación del suero del medio tendió a disminuir la actividad AP y la sensibilidad al levamisol, pero sin alcanzar significancia estadística. La hiperosmolaridad, el LPS y las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no tuvieron efecto

en la actividad enzimática pero tanto la hiperosmolaridad como la IL-1 β redujeron la sensibilidad al levamisol. Los detergentes saponina y desoxicolato sódico produjeron un efecto similar al de los oxidantes, provocando un aumento de la toxicidad celular (Figura 20 C) y un aumento de la actividad AP, así como una mayor sensibilidad al levamisol.

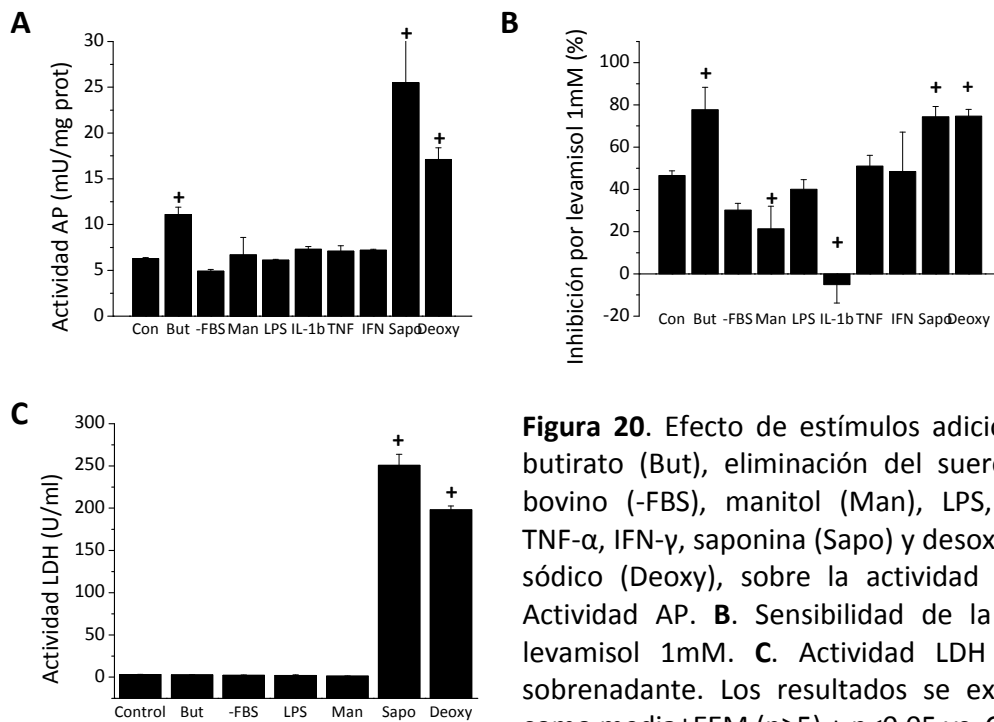


Figura 20. Efecto de estímulos adicionales: butirato (But), eliminación del suero fetal bovino (-FBS), manitol (Man), LPS, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , saponina (Sapo) y desoxicolato sódico (Deoxy), sobre la actividad AP. **A.** Actividad AP. **B.** Sensibilidad de la AP al levamisol 1mM. **C.** Actividad LDH en el sobrenadante. Los resultados se expresan como media \pm EEM (n \geq 5) + p<0,05 vs. Control

La isoforma de AP expresada en las células IEC18 no ha sido caracterizada. El análisis por Northern blot (y Western blot, no mostrado) descartó la expresión de IAP en las células IEC18 (Figura 21 A). Por el contrario, ensayos de Western blots con anticuerpos de TNAP B4-50 mostraron una clara banda del tamaño correcto (57 kD) que estaba significativamente aumentada en las células tratadas con tButOOH. Se obtuvieron resultados muy similares (datos no mostrados) con los anticuerpos B4-78 y TRA-2-39 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Es interesante destacar que la inmunoreactividad a B4-50 aumentó inmediatamente (menos de 1 h) después de la inducción del daño oxidativo, mientras que la señal de B4-78 continuó estable durante algunas horas (Figura 21 C). Ambos anticuerpos presentan ciertas diferencias en cuanto a su especificidad, de forma que B4-50 tiene mayor afinidad por la TNAP de tejido hepático que por la de hueso, mientras que B4-78 no es selectivo.

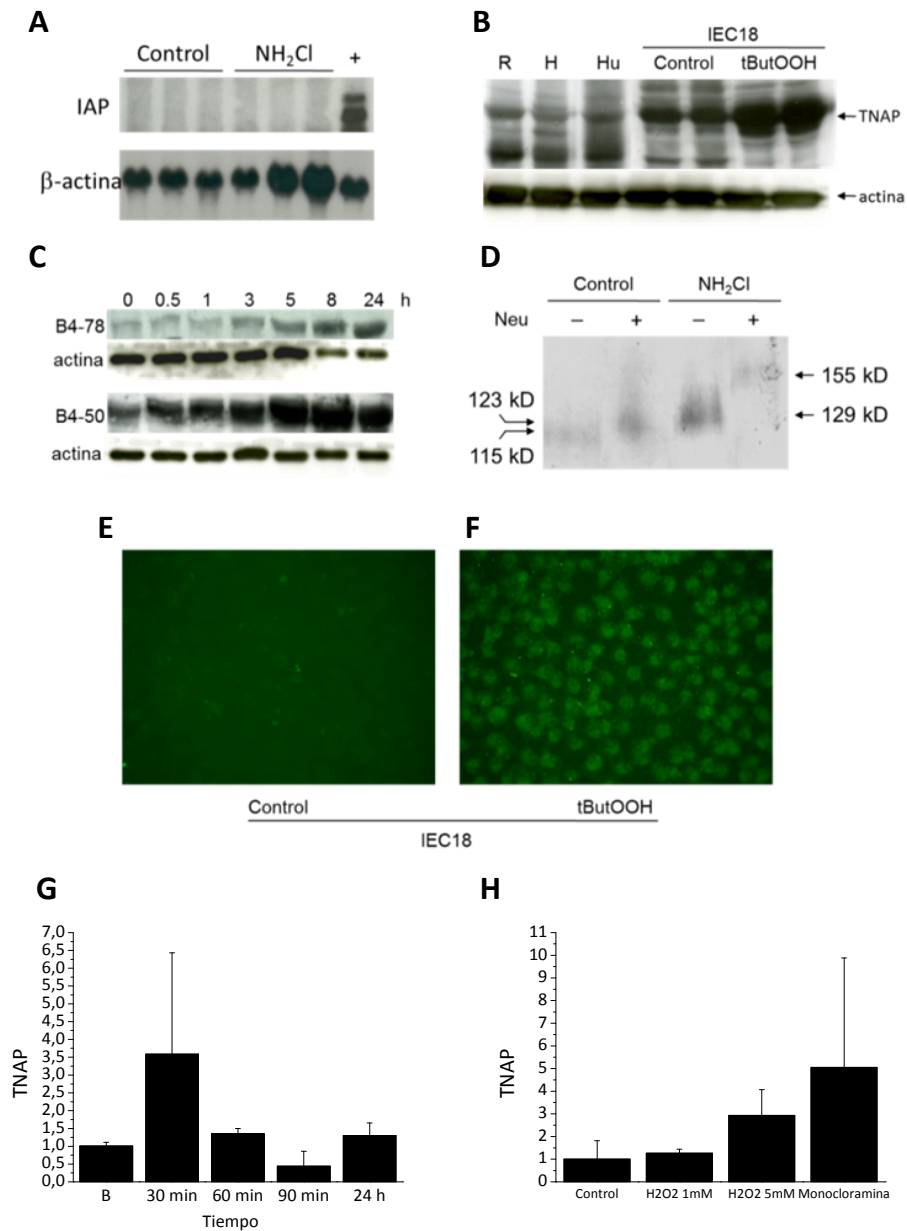


Figura 21. Expresión de la AP en las células IEC18. **A.** Northern blot de la IAP en células IEC18 en condiciones basales y tratadas con tButOOH (+: íleon de rata, control positivo). **B.** Expresión de la TNAP determinada mediante Western blot, detectada como una banda de 57 kDa alineada con homogenados de riñón (R), hígado (H) y hueso (Hu) de rata. **C.** Expresión de la TNAP detectada por Western blot utilizando los anticuerpos B4-50 y B4-78 tras el tratamiento con tButOOH durante diferentes periodos de tiempo. **D.** AP en células IEC18 tratadas con neuromanidasa, mostrando diferencias en la movilidad electroforética de las enzimas digeridas (corrido como un dímero activo bajo condiciones no desnaturalizantes; representativo de dos blots, n=5). **E.** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la TNAP en células IEC18 sometidas a estrés oxidativo (anticuerpo B4-78, 5 horas después de tButOOH). **F y G.** Análisis mediante q-RT-PCR de la expresión de TNAP en células IEC18 sometidas estrés oxidativo inducido por tButOOH (**F**) y por H₂O₂ y monocloramina (**G**).

Dado que la TNAP requiere una N-glicosilación para su actividad, realizamos un análisis electroforético de la actividad AP en homogenados de células IEC18 bajo estrés oxidativo con monocloramina y control de digestión con neuraminidasa (Figura 21 D). Este patrón fue diferente en las células tratadas con monocloramina en las células control, indicando que la enzima está glicosilada de forma diferente en ambas condiciones. Otro experimento relevante en este sentido fue llevado a cabo utilizando tunicamicina (un inhibidor de la N-glicosilación) durante 24 h antes de la adición de tButOOH, el resultado fue que el aumento en la actividad no se vio afectado (Figura 22 A), pero no se observó ningún cambio en la sensibilidad al levamisol (Figura 22 B) lo cual sugiere que el cambio de isoforma depende de la N-glicosilación. Se obtuvieron datos similares utilizando monocloramina (datos no mostrados).

El análisis inmunohistoquímico usando el anticuerpo B4-78 mostró una débil pero significativa tinción de células IEC18 en condiciones basales (Figura 21E), que aumentó marcadamente después de la exposición a tButOOH (1 mM). Esta inducción se hizo aparente a las 5 h, lo que coincide con nuestras observaciones anteriores. Cabe destacar que la tinción fue predominantemente citoplasmática más que de membrana en ambos casos. A pesar del incremento de expresión, los niveles de ARNm de TNAP no cambiaron después de la adición de tButOOH (Figura 21F).

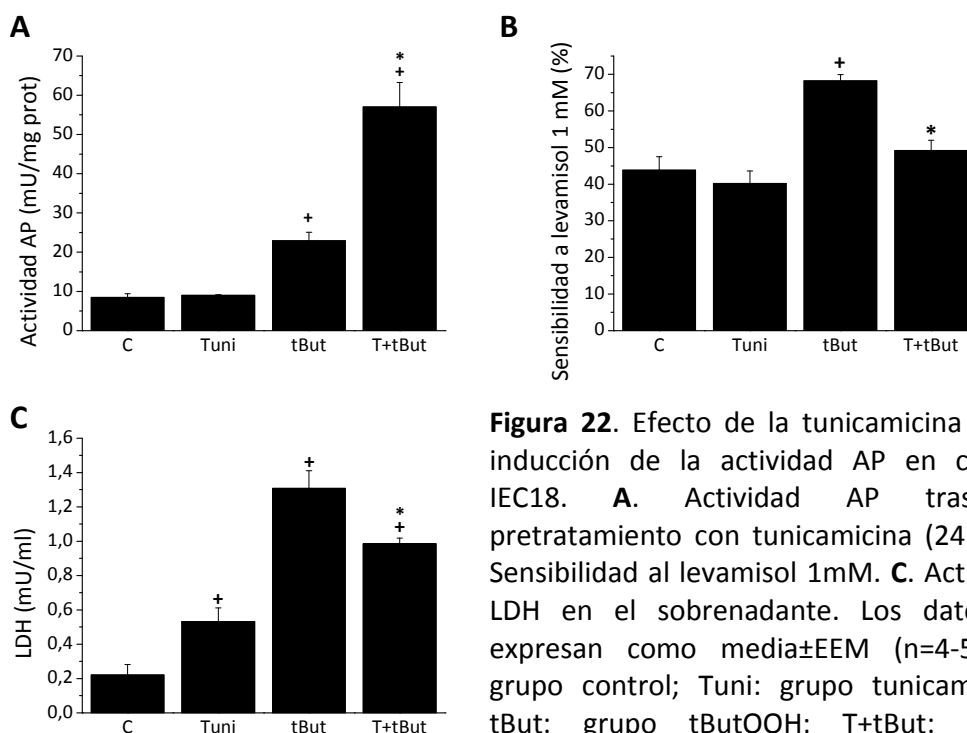


Figura 22. Efecto de la tunicamicina en la inducción de la actividad AP en células IEC18. **A.** Actividad AP tras el pretratamiento con tunicamicina (24 h) **B.** Sensibilidad al levamisol 1mM. **C.** Actividad LDH en el sobrenadante. Los datos se expresan como media±EEM (n=4-5). C: grupo control; Tuni: grupo tunicamicina; tBut: grupo tButOOH; T+tBut: grupo cotratado (tunicamicina y tButOOH). ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. Tuni.

A continuación, nos centramos en el estudio de los mecanismos de transducción de señal que llevan a la inducción de la actividad AP. La vía MAPK se activa por un gran número de estímulos que causan estrés celular y por lo tanto examinamos su estatus midiendo ERK, p38 y JNK fosforilados mediante Western blot (Figura 23 A). Como esperábamos, la cantidad de enzima fosforilada aumentó marcadamente poco después de la adición de tButOOH. Por lo tanto procedimos a realizar experimentos de intervención con inhibidores específicos, PD98059, SB203580 and SP600125, respectivamente. Sin embargo, ninguno tuvo efecto sobre la actividad AP en presencia o ausencia de estrés oxidativo (Figura 23 B).

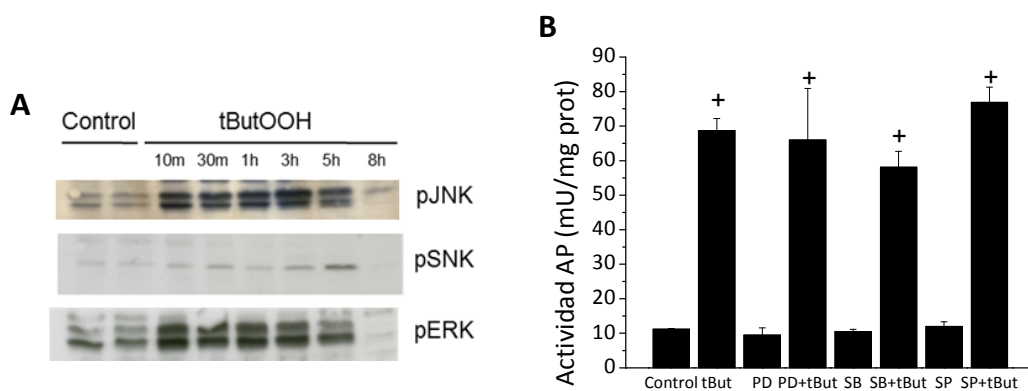


Figura 23. Estudio del estado de la vía de las MAPKs en las células IEC18 tratadas con tButOOH. **A.** Detección de las formas fosforiladas de JNK (pJNK), p38 (pSNK) y ERK (pERK) mediante Western blot tras de la exposición de las células IEC18 a tButOOH 1mM. **B.** Efecto del pre-tratamiento de las células IEC18 con inhibidores para ERK (PD98059), JNK (SP600125) o p38 (SB203580) sobre la actividad de AP. +p<0.05 vs. Control.

Posteriormente, llevamos a cabo un *screening* farmacológico para buscar la vía de señalización involucrada en el aumento de la actividad AP después del estrés oxidativo. Como se muestra en la Figura 24 A, el tratamiento de IEC18 con diferentes estimulantes de la vía cAMP/PKA, que incluían el análogo de AMPc 8-Br-cAMP, el inhibidor de la fosfodiesterasa 3-isobutilmetilxantina (IBMX) y la forskolina, que activa la adenilato ciclase, produjeron un pequeño pero significativo aumento de la actividad AP (sin significancia estadística). Con objeto de no pasar por alto un posible efecto, forzamos las condiciones aplicando una mezcla de los tres agentes. Como resultado el aumento de la AP fue de hecho mayor pero todavía bastante lejos de la magnitud del cambio asociado al estrés oxidativo. En línea con la escasa magnitud de este efecto, los estímulos cAMP dependientes y el

bloqueador específico de la proteína quinasa A (PKA) H89 no tuvieron efecto en la inducción de AP provocada por estrés oxidativo (Figura 24 B y C). Por otro lado ni el activador de la proteína quinasa C (PMA) ni el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina produjeron ningún cambio en la actividad AP en IEC18 (Figura 24 D). Por lo tanto ambas vías de señalización son irrelevantes en el aumento de AP producido por estrés oxidativo. De forma similar, tampoco observamos ningún cambio al tratar las células con prednisolona, inhibidores de la iNOS, de la proteína quinasa C (PMA), de la tirosín quinasa (Genisteína,) ni con inhibidores de la ciclooxigenasa (Indometacina) (datos no mostrados).

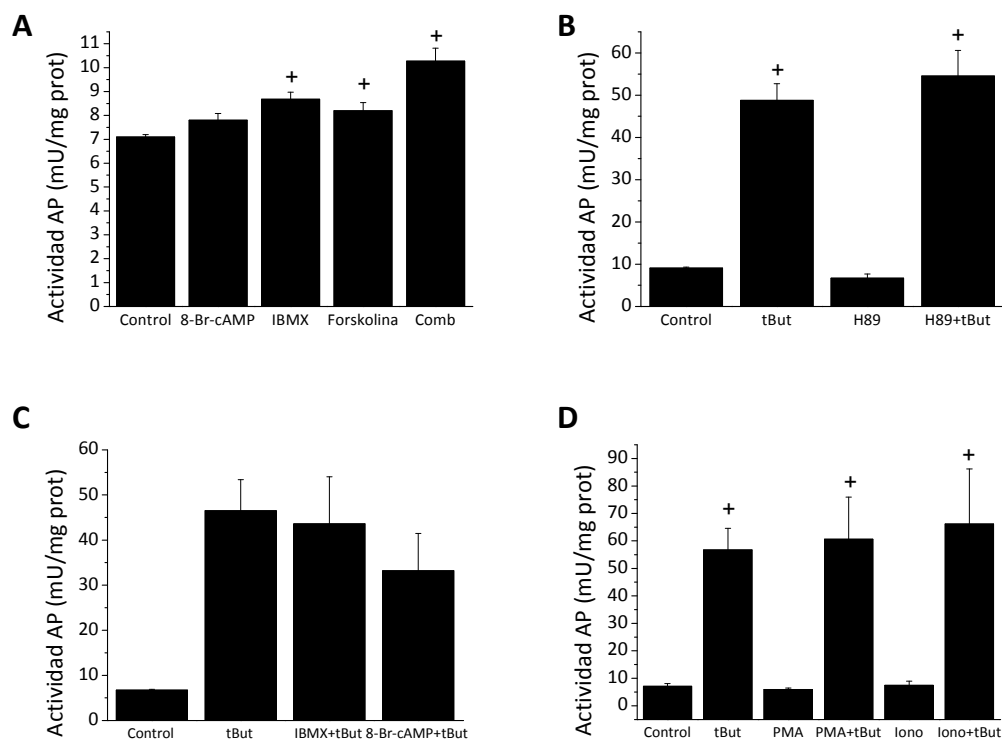


Figura 24. Efecto de varios moduladores de transducción de señales en la actividad AP en las células IEC18. **A.** Efecto de agentes que activan la vía del cAMP (8-Br-cAMP: 8-bromo-cAMP; IBMX: isobutilmetilxantina; Forskolina; Comb: combinación de los 3 agentes). **B.** Efecto del inhibidor de la proteína quinasa A, H89 sobre la inducción de AP provocada por tButOOH. **C.** Efecto de IBMX y 8-Br-cAMP sobre la inducción de AP provocada por tButOOH. **D.** Efecto de la ionomicina (Iono) y el activador de la proteína quinasa C (PMA) sobre la inducción de AP provocada por tButOOH. + $p < 0,05$ vs. Control.

Finalmente, examinamos si la inducción de la actividad AP dependía de cambios en la transcripción o la traducción de la enzima. Para llevar a

cabo esta aproximación farmacológica clásica utilizamos actinomicina D (ActD, inhibidor de la transcripción) y cicloheximida (CHX, inhibidor de la traducción). La Act D ($8 \mu\text{M}$) tendió a aumentar la actividad AP y a liberar LDH al medio en condiciones basales, si bien este efecto no fue significativo. Es interesante destacar que la ActD no sólo no impidió el aumento de la actividad AP después de la adición de tButOOH, sino que de hecho la aumentó espectacularmente (Figura 25 A). Este efecto estuvo acompañado de niveles de LDH más altos, sugiriendo un mayor estrés celular/citotoxicidad (Figura 25 B). Por otro lado, la CHX ($35 \mu\text{M}$) no afectó a la actividad AP ni a los niveles de LDH. En condiciones basales, cuando cotratamos junto con tButOOH la toxicidad celular se potenció ligeramente, pero la actividad AP no se vio afectada (Figura 25 C y D). Mayores concentraciones de ambos agentes tuvieron efectos similares (datos no mostrados). La potenciación de la toxicidad celular por ActD e incluso CHX pudo también observarse después de exposiciones cortas a tButOOH (5 min), la cual es insuficiente para provocar los efectos sobre la AP o la LDH por sí misma (datos no mostrados).

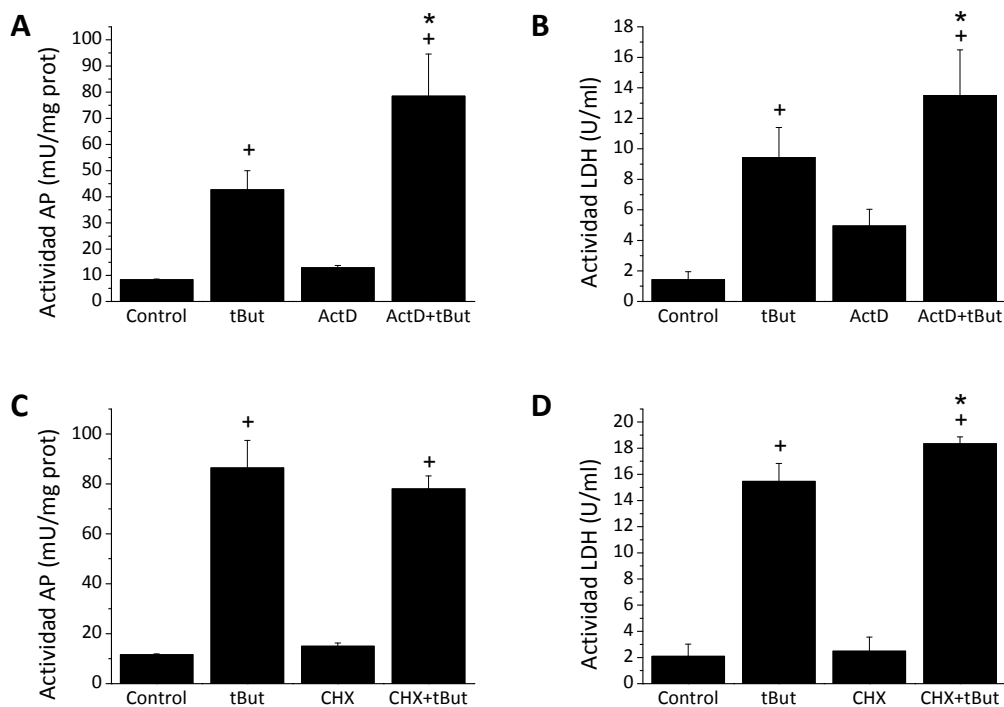


Figura 25. Efecto de la actinomicina D y la cicloheximida en la inducción de la actividad AP en células IEC18. Las células IEC18 fueron tratadas durante 24 horas con actinomicina D ($8 \mu\text{M}$) (A, B) o cicloheximida ($35 \mu\text{M}$) (C, D) así como cotratadas con tButOOH (1mM). Se muestra la actividad AP en las células IEC18 (A, C) y la actividad LDH en el sobrenadante (B, D). $^{\dagger}p < 0.05$ vs. Control, $*p < 0.05$ vs. tButOOH.

II. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL EN RATAS CON COLITIS INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE TNBS

Para comprobar el efecto de la administración exógena de la IAP en ratas colíticas, se diseñó un experimento de colitis inducida por la administración intrarrectal de TNBS. Éste constaba de 5 grupos, un grupo control no colítico (Control, n=4), así como cuatro grupos a los que se les indujo colitis: grupo control TNBS (TNBS, n=6), dos grupos tratados con IAP, por vía oral (IAP-or, n=5) y por vía intrarrectal (IAP-ir, n=5) así como un grupo tratado con budesonida oral (Bude, n=5). Las ratas colíticas desarrollaron una respuesta inflamatoria colónica intensa, caracterizada por pérdida de peso, (Figura 26) así como anorexia y polidipsia severas (Tabla 14). El grupo TNBS mostró un incremento en el peso y una reducción en la longitud del colon, asociado a un marcado engrosamiento del tejido (Tabla 15). La necrosis epitelial 6 días después de la inducción de la colitis, afectó a más de una tercera parte del colon. Además, hubo signos de obstrucción moderada y fibrosis, lo que se tradujo en un incremento del índice de daño macroscópico (IDM) (Tabla 15).

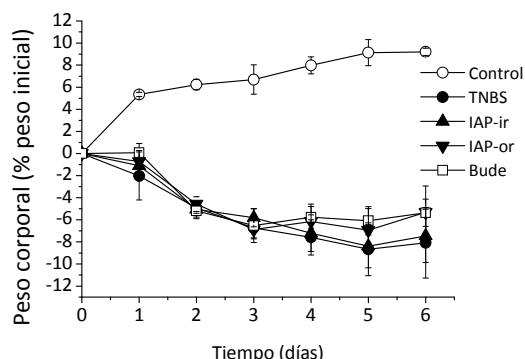


Figura 26. Evolución del peso corporal (% peso inicial) desde la inducción de la colitis el día 0 hasta el día 6, del grupo control: Control y de los grupos colíticos: TNBS, IAP-ir, IAP-or y Bude. Resultados expresados como media±EEM (n=4-6).

Análisis bioquímicos adicionales mostraron un incremento en la expresión de iNOS, COX-2 (Figura 27), IL-1 β , S100A8 y lipocalina 2 (LCN 2, marcador de neutrófilos) en el colon de las ratas con colitis inducida por TNBS (Figura 28). Sin embargo, Foxp3, TGF- β , IL-4, TNF- α e IFN- γ no se vieron afectados (datos no mostrados). Cabe destacar que los niveles de ARNm de TNAP se encontraron incrementados en la colitis (Figura 28).

	Control	TNBS	IAP-ir	IAP-or	Budesonida
Consumo de agua (ml)	22.8±1.6	30.7±2.2 ⁺	29.7±2.7 ⁺	41.7±3.9 ⁺	31.1±2.9 ⁺
Consumo de comida (g)	19.1±1.1	4.3±0.8 ⁺	5.8±1.2 ⁺	5.2±1.1 ⁺	8.3±1.6 ⁺

Tabla 14. Consumo de agua y comida. Consumo de agua expresado en mililitros consumidos por animal el día 5. Consumo de comida expresado en gramos consumidos por animal el día 5. Resultados expresados como media±EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS

	Control	TNBS	IAP-ir	IAP-or	Budesonida
Peso colon (g)	1.23±0.11	3.23±0.31 ⁺	2.14±0.35*	3.06±0.47 ⁺	1.67±0.15 *
Longitud colon (cm)	16.7±0.7	14.6±0.5 ⁺	13.3±0.4 ⁺ *	15.7±0.5	15.3±0.3
Peso/Longitud	74.4±9.7	221.5±19.0 ⁺	160.8±24.7 ⁺ *	195.9±32.2 ⁺	109.0±9.9*
Extensión área dañada (cm)	0±0	3.5±0.4 ⁺	3.1±0.4 ⁺	3.1±1.0 ⁺	2.2±0.7 ⁺
Área necrótica (%)	0±0	40.2±5.5 ⁺	32.7±8.6 ⁺	26.8±7.2 ⁺	16.6±6.6*
IDM	0±0	13.0±0.8 ⁺	8.1±1.4 ⁺ *	9.3±1.1 ⁺ *	5.4±1.4 ⁺ *

Tabla 15. Parámetros del daño macroscópico colónico. Peso del colon expresado en gramos. Longitud del colon expresada en centímetros. Relación peso/longitud. Extensión del área dañada expresada en centímetros. Porcentaje de área dañada determinado con Image J. Resultados expresados como media±EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS

El tratamiento de ratas colíticas con IAP exógena dio lugar a un beneficio terapéutico que fue más significativo en las ratas que recibieron la IAP por vía intrarrectal. Comparando con el grupo TNBS, el grupo IAP-ir mostró una reducción en la relación peso/longitud del colon y una disminución en el IDM (Tabla 15), debida a un menor grado de obstrucción y una menor deformación colónica (datos no mostrados). La extensión de la necrosis y el área afectada no disminuyeron significativamente tras el tratamiento con IAP. La expresión de ARNm de S100A8, marcador de infiltración leucocitaria, casi se normalizó (Figura 28). De forma similar, se redujo la expresión colónica de IL-1 β y LCN-2 en este grupo. Por otra parte, no se afectó la expresión de iNOS y COX-2 (Figura 27). La expresión de TNAP se normalizó en el grupo IAP-ir (Figura 28).

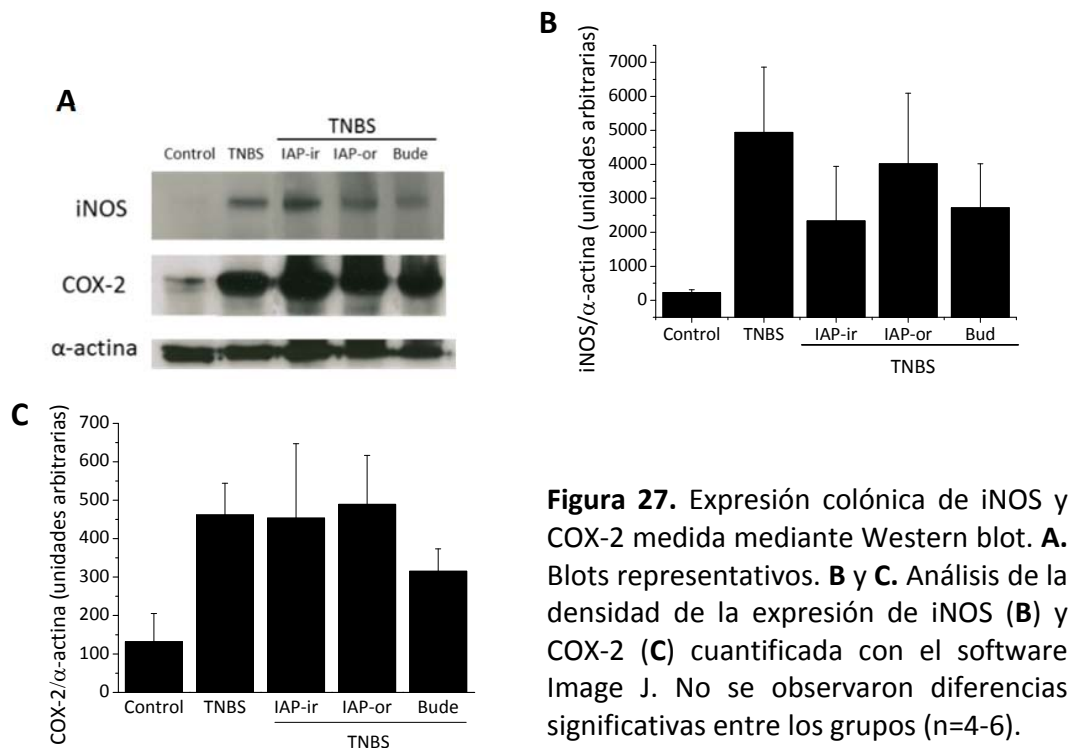


Figura 27. Expresión colónica de iNOS y COX-2 medida mediante Western blot. **A.** Blots representativos. **B y C.** Análisis de la densidad de la expresión de iNOS (**B**) y COX-2 (**C**) cuantificada con el software Image J. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (n=4-6).

En comparación con el grupo IAP-ir, la administración oral de IAP no llegó a producir algunos de los efectos beneficiosos observados. En particular, el grupo IAP-or no presentó una disminución significativa en el peso o la longitud del colon, en la ganancia de peso, el IDM o la expresión de TNAP (Tabla 15 y Figura 28). Sin embargo los marcadores colónicos IL-1 β , LCN-2 y S100A8 se modificaron de forma similar al grupo IAP-ir (Figura 28).

Se utilizó budesonida como tratamiento de referencia. Éste fue el único tratamiento que consiguió disminuir las lesiones necróticas y el que tuvo un mayor efecto en el engrosamiento del colon y en el IDM, no sólo por la disminución de la obstrucción y la deformación, sino también por la menor presencia de adhesiones y necrosis. La administración de budesonida, al igual que la de IAP, no afectó sin embargo a la ingesta de comida ni a la ganancia de peso.

La translocación bacteriana fue determinada en hígado de rata por qRT-PCR mediante la detección de una región invariable del ADN que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico. Los resultados, mostrados en la Figura 29, indican un incremento significativo del ADN 16S hepático en las muestras del grupo TNBS, de unas 3 veces con respecto al control. Cabe destacar, que los grupos tratados con IAP previnieron este aumento (sólo significativo para el grupo IAP-ir), mientras que la budesonida no fue capaz de prevenir la translocación.

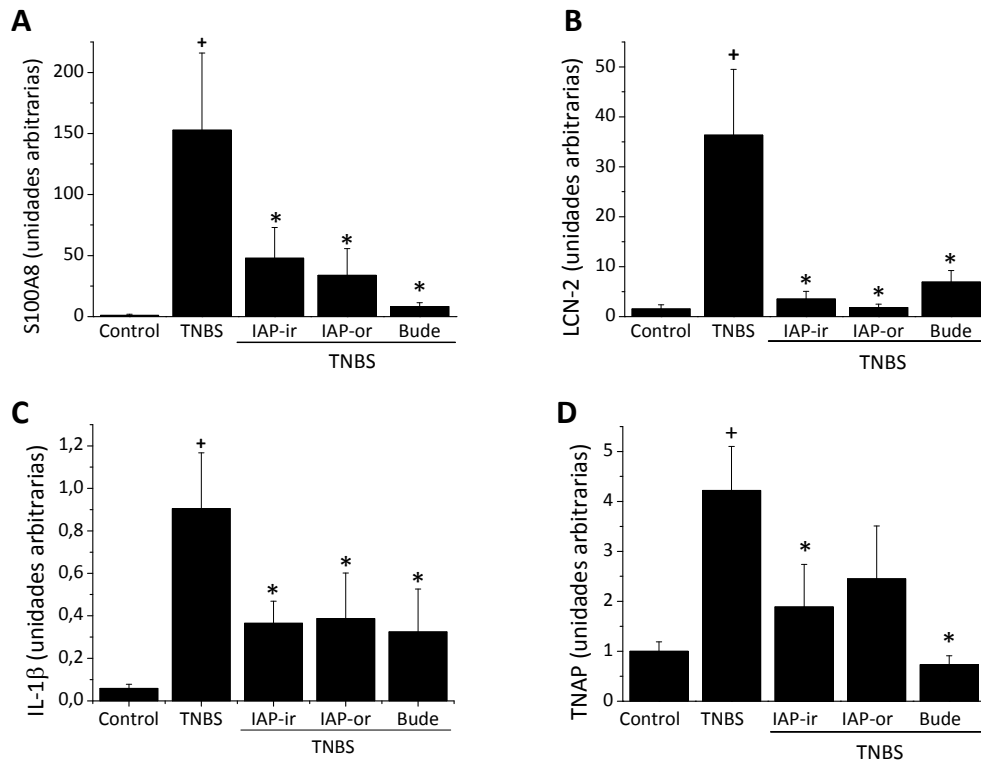


Figura 28. Marcadores de inflamación colónica determinados por qRT-PCR. Se determinaron los marcadores neutrofílicos calgranulina A (S100A8, **A**) y lipocalina 2 (LCN2, **B**), IL-1 β (**C**), y la TNAP (**D**). Resultados expresados como media \pm EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS

La actividad AP colónica se incrementó 4,5 veces en las ratas en las que se indujo colitis por TNBS (Figura 30 A). Este incremento de actividad se asoció a un incremento en la sensibilidad a levamisol *in vitro* (Figura 30 B). El tratamiento con IAP no tuvo efecto en la actividad AP ni en la sensibilidad a levamisol, mientras que el tratamiento con budesonida sí que redujo la actividad AP (Figura 30).

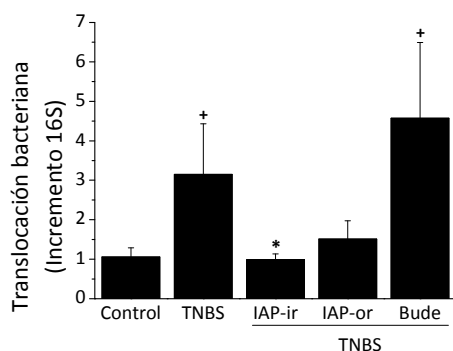


Figura 29. Translocación bacteriana. Se determinó una región invariable de la subunidad 16S mediante qRT-PCR como índice de translocación. Resultados expresados como media \pm EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS.

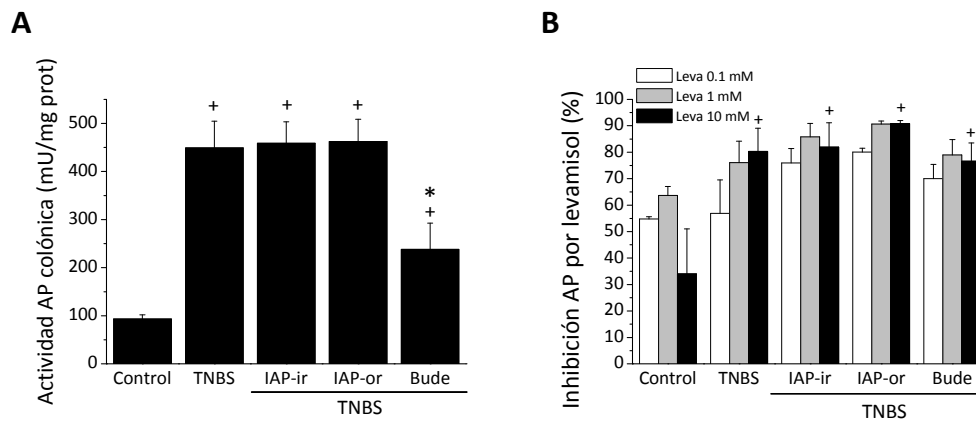


Figura 30. Actividad AP colónica expresada en mU/mg proteína (**A**) y su sensibilidad a levamisol expresada en % (**B**). Resultados expresados como media±EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS

También determinamos la actividad AP fecal. Como se muestra en la Figura 31, la actividad AP fecal medida en muestras de heces tomadas el último día se incrementó 4 veces en el grupo TNBS con respecto al grupo no tratado. Además, la sensibilidad a levamisol en heces, de forma similar a los resultados obtenidos en tejido colónico, también se incrementó (Figura 31 B). La budesonida, pero no los tratamientos con IAP, redujo los niveles fecales de AP.

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente decidimos llevar a cabo varios experimentos adicionales en los que las ratas se colocaron en jaulas individuales, recogiendo sus heces diariamente para determinar la actividad AP, de forma que pudiéramos determinar las variaciones en AP luminal con mayor exactitud. Se indujo colitis a estas ratas mediante la administración de TNBS o bien DSS al 5% en el agua de bebida. La colitis inducida por TNBS fue similar a la mostrada en el experimento descrito anteriormente, mientras que la colitis inducida por DSS se caracterizó por un incremento en el índice de actividad de la enfermedad (DAI) (Figura 32), actividad MPO incrementada (Figura 32), y aumento de la actividad AP, aunque éste no estuvo asociado a un incremento a la sensibilidad a levamisol.

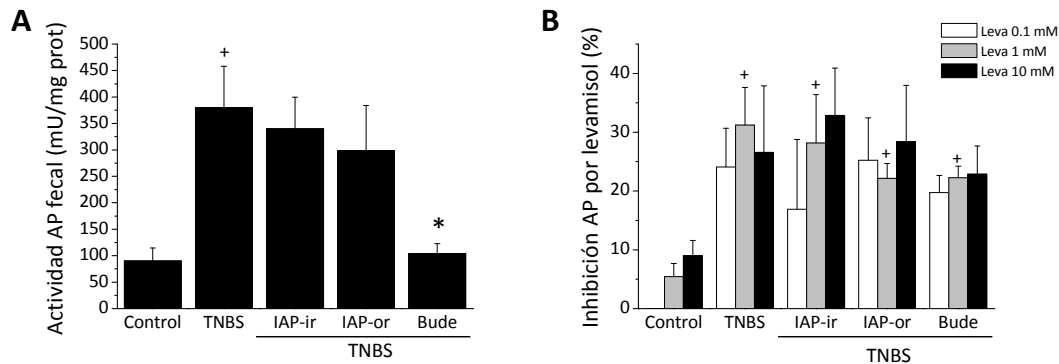


Figura 31. Actividad AP en heces expresada en mU/mg proteína (**A**) y su sensibilidad a levamisol expresada en % (**B**). Resultados expresados como media±EEM (n=4-6) ⁺p<0.05 vs. Control *p<0.05 vs. TNBS.

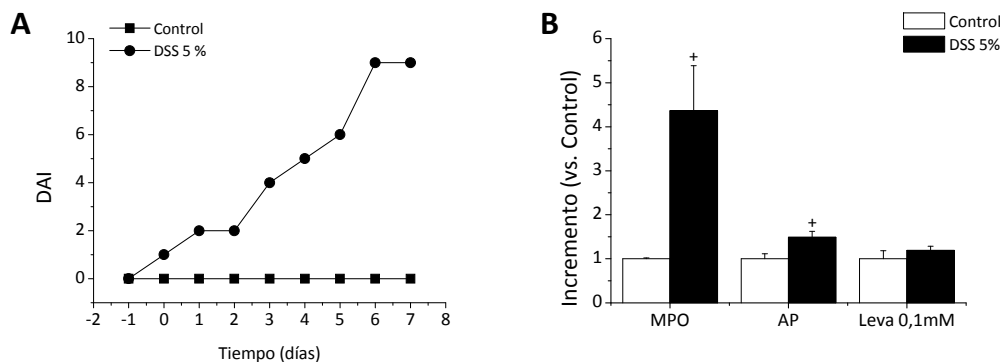


Figura 32. Marcadores inflamatorios en las ratas con colitis inducida por DSS. **A.** Índice de actividad de la enfermedad (DAI). **B.** Incremento de la actividad MPO, AP e inhibición por levamisol 0,1mM (vs. Control). Resultados expresados como media±EEM (n=3) ⁺p<0.05 vs. Control.

Como cabía esperar, la actividad AP fecal fue baja en los controles no colíticos durante toda la semana (Figura 33), y su inhibición por levamisol fue modesta. Por el contrario, las ratas colíticas por TNBS mostraron un incremento de la actividad que empezó en el día 2-3 después de la inducción de la colitis que se mantuvo hasta que los animales fueron sacrificados. Finalmente, la colitis inducida por DSS también mostró un incremento de actividad AP pero no grandes cambios con respecto a la sensibilidad a levamisol. En concordancia con estos resultados mediante Western blot se detectó la TNAP en los homogenados fecales, pero no en los de las ratas controles, ni en el grupo de ratas tratadas con DSS. La IAP se detectó en el gel a la altura correspondiente a su peso molecular en la muestra control (yeyuno) y con un peso menor en las muestras fecales. Esta banda fue

diferente en función del día y de la rata, sugiriendo un amplio rango de pesos moleculares. La intensidad de la señal no varió mucho entre control y TNBS aunque sí se incrementó en el grupo DSS.

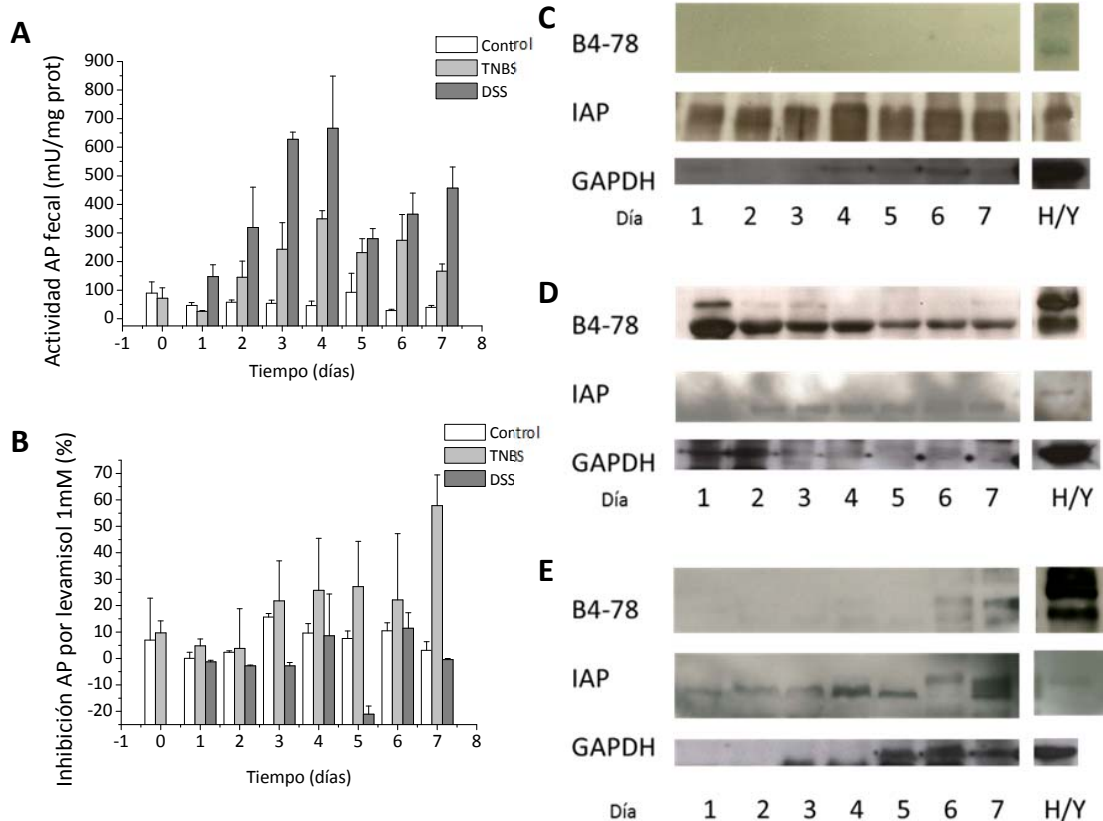


Figura 33. Actividad AP en heces (A) y sensibilidad al levamisol 1mM (B) del grupo control (Control) y de dos grupos con colitis, inducida por TNBS (TNBS) y por DSS (DSS) durante la colitis. Resultados expresados como media±EEM (n=3-4). Blots representativos de la expresión de IAP y TNAP (B4-78) en heces en los grupos: Control (C), TNBS (D) y DSS (E). Se utilizaron muestras de hígado (H) y yeyuno (Y) como control positivo para la TNAP y la IAP respectivamente (n=3).

Tanto en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS como por DSS se produce la erosión directa de la capa epitelial, lo que podría ocasionar la liberación de la AP epitelial al lumen. Para descartar esta posibilidad utilizamos un modelo no tóxico de colitis crónica, inducida por transferencia linfocitaria. Dos de los seis ratones a los que transferimos linfocitos desarrollaron colitis después de 16 semanas, mostrando pérdida de peso y apariencia colítica general, que fue confirmada después del sacrificio.

Estos animales mostraron un incremento en la actividad MPO colónica así como en la actividad AP y en la sensibilidad a levamisol (Figura 34). La figura 35 muestra como los animales con colitis presentaron un incremento de la TNAP en heces pero no de IAP (Figura 34), confirmando que la liberación de la TNAP no es específica de la colitis inducida por TNBS.

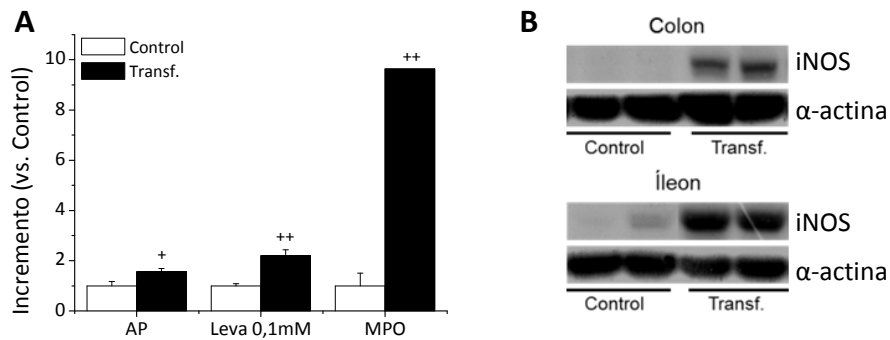


Figura 34. Marcadores inflamatorios en el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria. **A.** Actividad fosfatasa alcalina, sensibilidad al levamisol y MPO colónicas. Incrementos (vs. Control). Los resultados se expresan como media \pm EEM (n \geq 4) + p<0,05 vs. Control; ++ p<0,001 vs. Control. **B.** Expresión colónica de iNOS detectada por Western blot en colon e íleon de animales control (Control) y transferidos (Transf.).

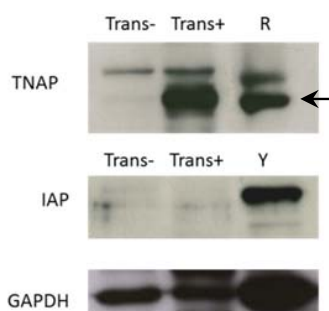


Figura 35. Detección de la TNAP y la IAP mediante Western blot en heces de ratones con colitis inducida por transferencia linfocitaria. Utilizando el anticuerpo B4-78, la TNAP se detectó como una banda de 57 KDa alineada con homogenados de riñón (R). Utilizando el anticuerpo IAP se detectó la IAP alineada con un homogenado control de yeyuno (Y). (Grupo control de la transferencia: Trans-; grupo transferido Trans+). Blot representativo de un experimento de transferencia linfocitaria (Trans-: 4; Trans+: 6).

III. CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES HETEROCIGOTOS PARA LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas a nivel inmunológico, como en la producción de citoquinas, así como a nivel colónico, se llevaron a cabo diferentes experimentos en ratones sanos heterocigotos para la expresión de la TNAP.

La medida de la actividad AP en varios órganos no mostró como cabía esperar diferencias significativas en hígado y hueso pero sí lo hizo en riñón y sorprendentemente en colon (Figura 36). En cuanto a la sensibilidad a levamisol, ésta disminuyó significativamente en el caso del hueso, el riñón y el colon, aunque no lo hizo en hígado y también se observa una tendencia a disminuir en los segmentos intestinales (Figura 37).

Se realizaron cortes histológicos de varios órganos y tejidos con el fin de determinar si existen diferencias a nivel histológico entre estas dos cepas de ratones. No se observaron diferencias en estómago, pulmón, hígado, riñón (datos no mostrados) ni en los segmentos intestinales: colon, duodeno, yeyuno íleon y ciego, como puede observarse en la figura 38.

Se estudiaron las poblaciones hematológicas en sangre total en ambos grupos, encontrándose únicamente diferencias significativas en el porcentaje de monocitos, que fue inferior en el grupo TNAP con respecto al grupo WT (Tabla 16).

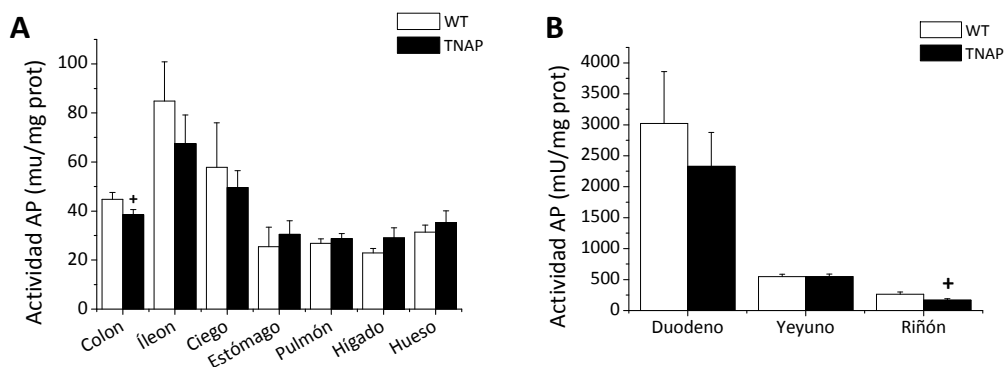


Figura 36. Actividad fosfatasa alcalina determinada en varios órganos de ratones control (WT) y heterocigotos para la expresión de la TNAP (TNAP). **A** y **B**. Actividad AP determinada en colon, íleon, ciego, estómago, pulmón, hígado, hueso (**A**), duodeno, yeyuno y riñón (**B**) expresada en mU/mg proteína. Resultados expresados como media \pm EEM (n=5-26) + p<0,05 (vs. WT).

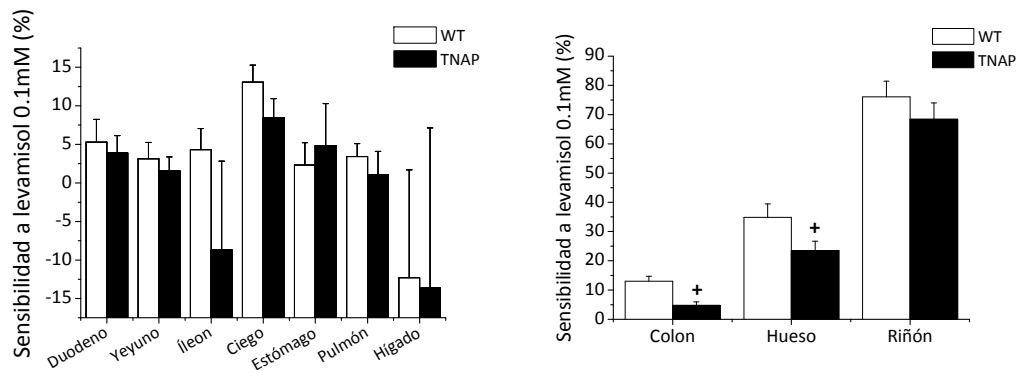


Figura 37. Sensibilidad a levamisol 0,1mM determinada en varios órganos de ratones control (WT) y heterocigotos para la expresión de la TNAP (TNAP). **A** y **B**. Sensibilidad a levamisol 0,1mM determinada en duodeno, yeyuno, íleon, ciego, estómago, pulmón, hígado (**A**), colon, hueso y riñón (**B**), expresada en porcentaje. Resultados expresados como media±EEM (n=5-26) + p<0,05 (vs. WT).

GLÓBULOS BLANCOS

	WBC (Totales)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
WT	6,6±0,6	84,3±3,5	8,9±0,1	4,2±2,0	0,1±0	2,4±1,3
TNAP	6,0±0,3	89,4±2,1	6,2±0,7 ⁺	2,7±0,7	0,1±0	1,3±0,7

GLÓBULOS ROJOS

	RBC (Totales)	HGB	HCT	MCH	MCV	MCHC	RDW
WT	10±0,2	14,8±0,4	44±0,7	14,9±0,1	44,1±0	33,6±0,3	13,7±0,6
TNAP	9,9±0,1	14,9±0,1	43,5±0,7	15,1±0	44,2±0,2	34,2±0,3	13,9±0,4

PLAQUETAS

	PLT	MPV	PCT	PDW
WT	348±85	7,05±0,5	0,25±0,1	39,7±0,5
TNAP	293±42	6,90±0,6	0,20±0	38,5±2,75

Tabla 16. Poblaciones celulares sanguíneas. WBC: glóbulos blancos totales ($10^3/\mu\text{l}$). RBC: glóbulos rojos totales ($10^6/\mu\text{l}$). HGB: hemoglobina (g/dl). HCT: hematocrito. MCH: HMG corpuscular media. MCV: volumen corpuscular medio (fl). MCHC: concentración HMG corpuscular media (g/dl). RDW: distribución de tamaños de glóbulos rojos. PLT: plaquetas totales ($10^3/\mu\text{l}$). MPV: volumen plaquetario medio (fl). PCT: trombocrito. PDW: distribución de tamaños de plaquetas. + p<0,05 (vs. WT) (t Student). Datos expresados como media±EEM. Grupos control WT (n=3) y TNAP (n=3). + p<0,05 vs. WT.

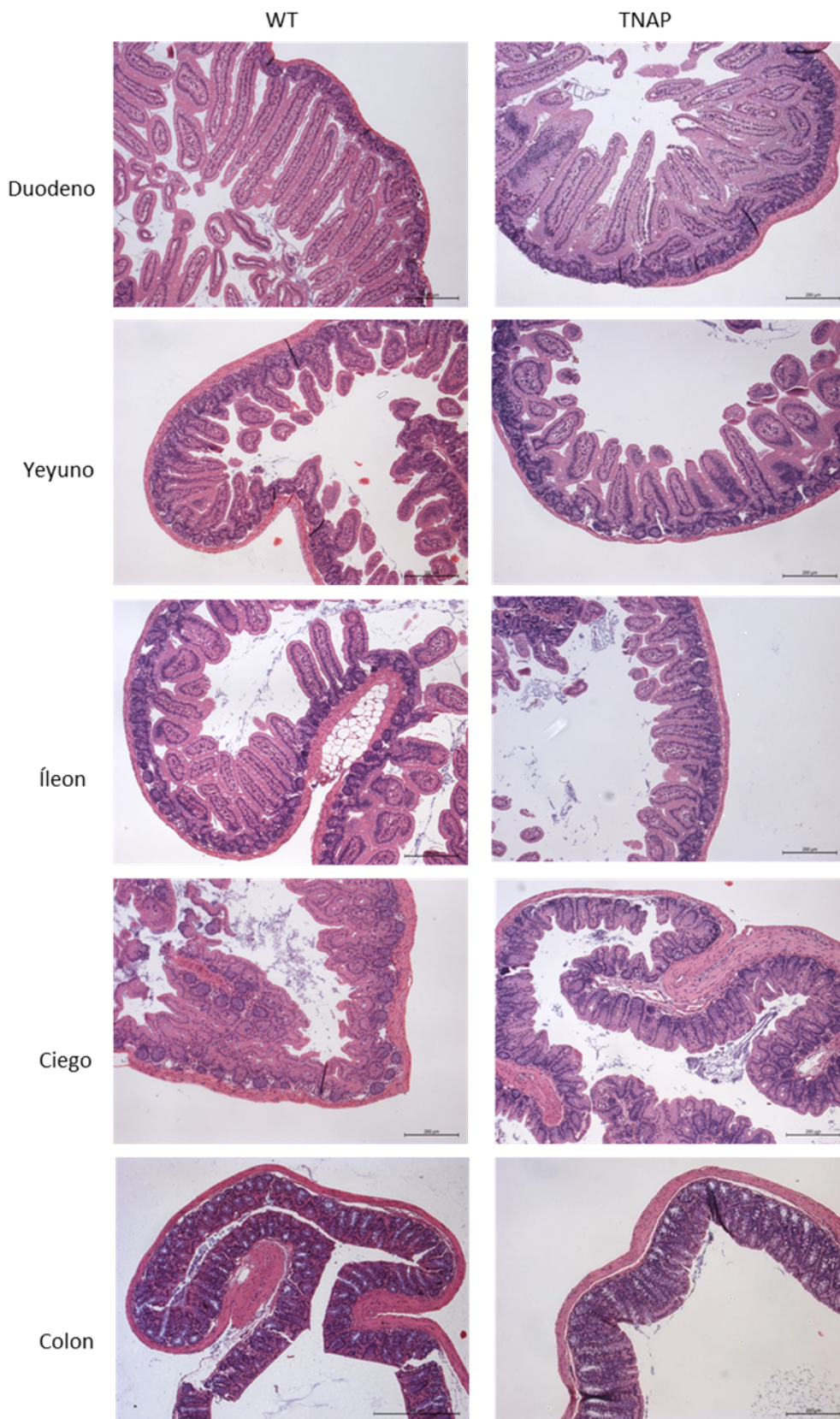


Figura 38. Imágenes representativas de tinciones con hematoxilina-eosina de colon, duodeno, yeyuno, íleon y ciego de ratones WT (n=3) y TNAP (n=3) (10x).

Así mismo, mediante citometría de flujo se determinaron las poblaciones de células sanguíneas, no encontrándose diferencias tomando todos los experimentos, aunque sí se observó en general una menor presencia de macrófagos en el grupo TNAP (Figura 39).

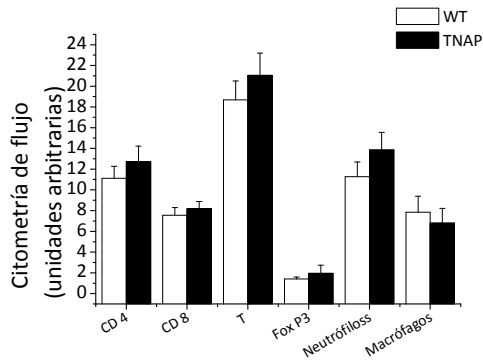


Figura 39. Poblaciones celulares sanguíneas determinadas por citometría de flujo. Células T CD4, T CD8, T totales, T reguladoras (Fox P3), neutrófilos y macrófagos. Datos expresados como media±EEM. Grupos: WT (n=4-8) y TNAP (n=4-12). + p<0,05 (vs. WT).

Por otra parte, se cultivaron esplenocitos para comprobar la respuesta de estos frente a estímulos como la Con A y el LPS. La estimulación con Con A permite el estudio de los linfocitos, mientras que la estimulación con LPS facilita el estudio de los macrófagos. Tras determinar la producción de citoquinas por los esplenocitos estimulados tanto con Con A, como con LPS, se observaron diferencias significativas en cuanto a la menor producción de TNF- α por los esplenocitos del grupo TNAP estimulados con Con A y también de IL-6 e IL-10. En cuanto a los esplenocitos estimulados con LPS, se observó una menor producción de IL-10 del grupo TNAP. Estas citoquinas son características de los macrófagos, sugiriendo diferencias entre ambos grupos (Figura 40).

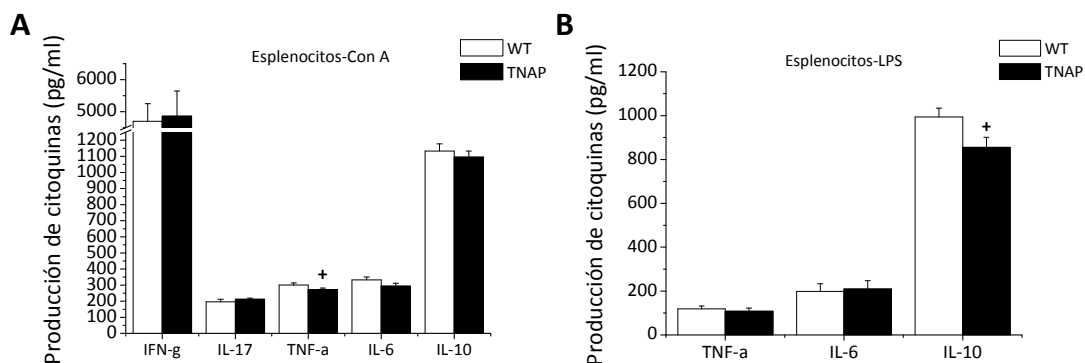


Figura 40. A. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por esplenocitos cultivados estimulados con Con A expresados en pg/ml. **B.** Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por esplenocitos cultivados estimulados con LPS expresados en pg/ml. Los resultados se expresan como media±EEM de los grupos control WT (n=72) y TNAP (n=67). + p<0,05 (vs. WT).

Ya que el colon es la parte fundamental para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, además de las determinaciones de la actividad AP ($44,8 \pm 2,7$ (WT) vs. $38,5 \pm 2,1^+$ (TNAP)) y la sensibilidad a levamisol ($13 \pm 1,7$ (WT) vs. $4,7 \pm 1,2^+$ (TNAP)), determinamos el peso y la longitud del colon tanto en ratones WT como en heterocigotos y se observó un menor peso en el grupo TNAP, aunque no se observaron diferencias en cuanto a la longitud (Figura 41).

Mediante inmunohistoquímica (IHC) se detectó la presencia de la IAP en los ratones WT y la TNAP, observando una mayor presencia de IAP en los ratones heterocigotos TNAP (Figura 42). La IAP se localizó fundamentalmente en las células caliciformes, observándose una mayor expresión de la IAP y una mayor intensidad en el grupo TNAP (Figura 43, panel superior). La TNAP se detectó en algunas células, probablemente neutrófilos, sin observar diferencias significativas entre grupos. (Figura 43, panel inferior). Se valoró la expresión de IAP en las tinciones utilizando para ello un índice basado en el porcentaje de células caliciformes teñidas (0-4), la intensidad de tinción de éstas (0-5) así como la intensidad de la tinción de las células infiltradas (0-5), observándose una mayor expresión de IAP en los ratones heterocigotos para la expresión de TNAP o ratones TNAP (Figura 42).

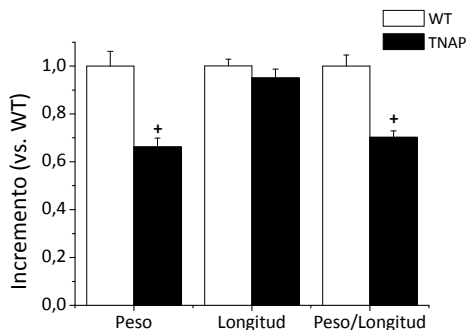
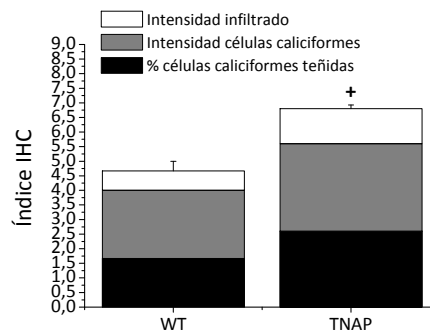


Figura 41. Incremento (vs. WT) en el peso, longitud y relación peso-longitud del colon expresado en tanto por 1. Resultados expresados como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=24) y TNAP (n=14). + p<0,05 (vs. WT)

Figura 42. Índice IHC para cuantificar la presencia de IAP. Índice basado en el porcentaje de células caliciformes teñidas (0-4), la intensidad de tinción de éstas (0-5) así como la intensidad de la tinción de las células infiltradas (0-5). Resultados expresados como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6). + p<0,05 (vs. WT).



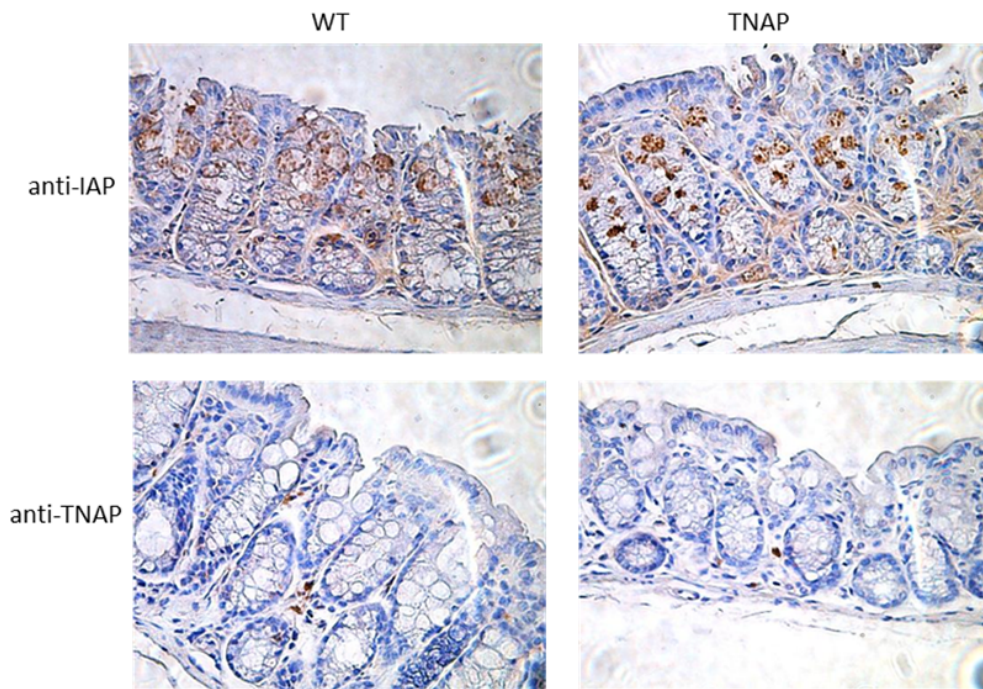


Figura 43. Imágenes representativas de IHC colónicas con anti-IAP (panel superior) y anti-TNAP (panel inferior) (40x). Panel superior: tinciones con anti-IAP, izquierda: grupo WT y derecha grupo TNAP. Panel inferior: tinciones con anti-TNAP, izquierda: grupo WT y derecha grupo TNAP. Imágenes representativas de los grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6).

Mediante Western blot se determinó la presencia de IAP y TNAP y se observó que la expresión de IAP en los ratones heterocigotos es mayor que en los WT, no observándose diferencias en cuanto a la expresión de TNAP (Figura 44).

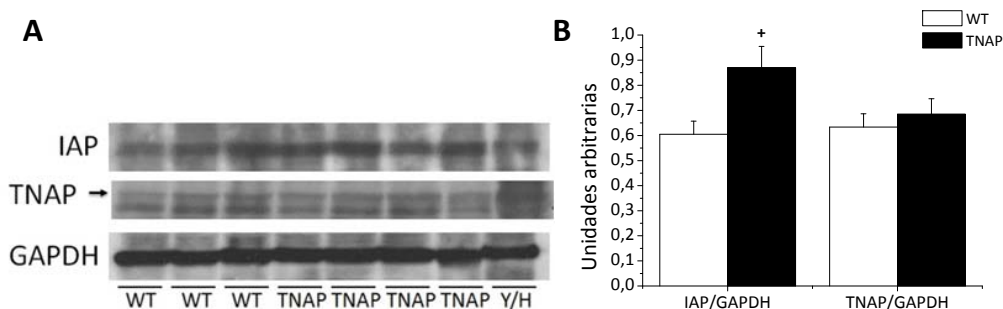


Figura 44. Detección de IAP y TNAP en colon mediante Western Blot. A. Western blot que muestra la expresión de IAP y TNAP en WT (n=3) y TNAP (n=4) así como sus controles yeyuno (Y) e hígado (H) respectivamente; y su control de carga GAPDH. B. Cuantificación de la expresión de IAP y TNAP respecto a la expresión de GAPDH realizada con el programa Image J.

Se cultivaron células aisladas de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) con la finalidad de determinar la participación de los linfocitos T de las CGLM, para lo que se estimuló el cultivo con Con A. Las determinaciones de citoquinas de las CGLM estimuladas con Con A mostraron diferencias significativas en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10, observándose una mayor producción en el grupo TNAP y además encontramos diferencias significativas en la producción de IL-17, sugiriendo diferencias a nivel colónico en la respuesta Th 17 (Figura 45).

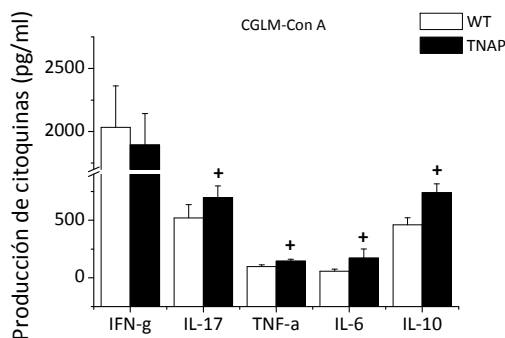


Figura 45. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por las CGLM estimulados con Con A expresados en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=33) y TNAP (n=40); + p<0,05 (vs. WT).

Se determinó la producción de citoquinas de explantes colónicos cultivados tanto sin estimular como estimulados con Con A o con LPS. La estimulación con Con A nos facilita el estudio de la contribución de los linfocitos T mientras que el LPS estimula a los macrófagos. En todos los casos se observó un marcado incremento en la producción de IL-6 del grupo TNAP. (Figuras 46 y 47).

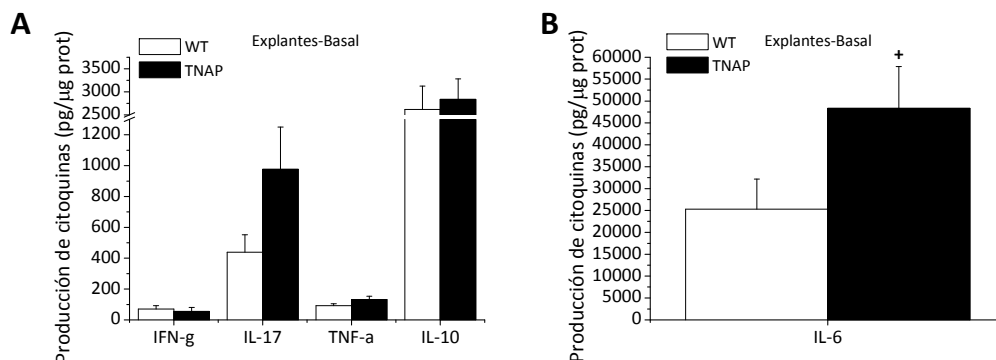


Figura 46. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (A) e IL-6 (B) por los explantes colónicos cultivados sin estimular. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=16-28) y TNAP (n=16-32). + p<0,05 (vs. WT).

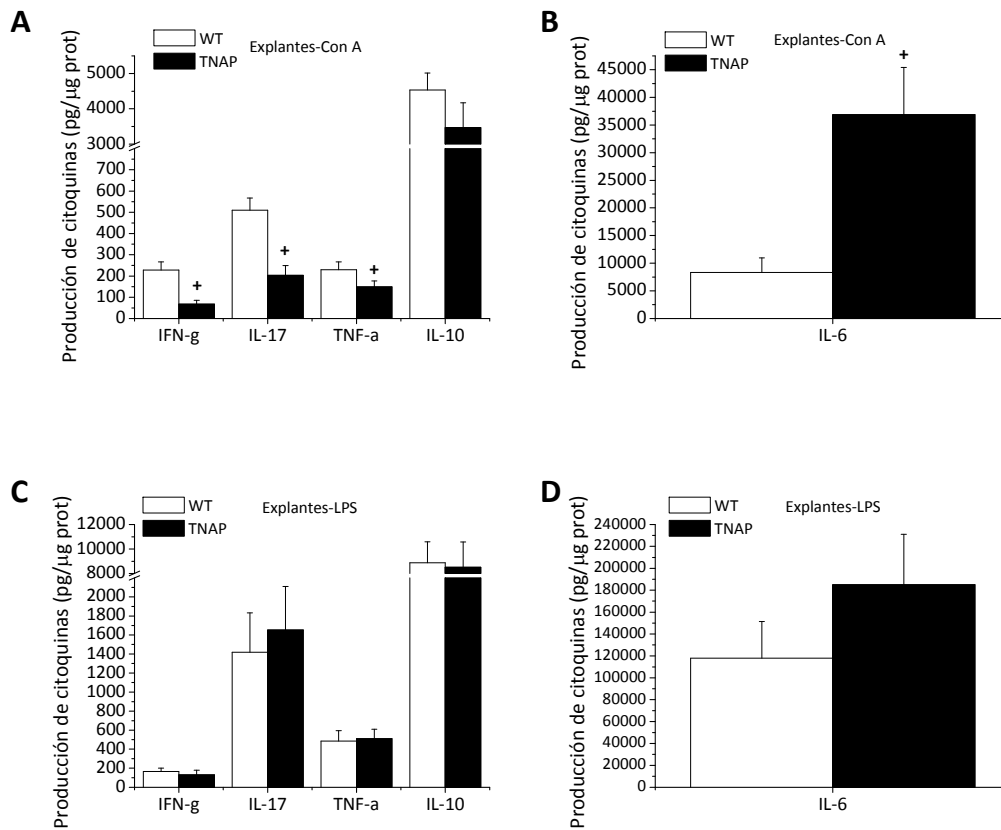


Figura 47. A y B. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (**A**) e IL-6 (**B**) por los explantes colónicos cultivados estimulados con Con A. **C y D.** Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (**C**) e IL-6 (**D**) por los explantes colónicos cultivados estimulados con LPS. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=16-28) y TNAP (n=16-32). + p<0,05 (vs. WT).

IV. IMPORTANCIA DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN LA INFLAMACIÓN INTESTINAL

Se estudió la importancia de la TNAP en distintos procesos que cursan con inflamación intestinal – colitis, infección intestinal bacteriana y mucositis – utilizando ratones heterocigotos para la expresión de la TNAP (grupo TNAP^{+/-}: TNAP) frente a los ratones *wild-type* (grupo WT: WT). En todos ellos, siempre se utilizaron dos grupos control sanos, uno WT y otro TNAP y otros dos grupos a los que se indujo la inflamación.

1. Importancia de la TNAP en la EII

1.1. Importancia de la TNAP en la colitis aguda inducida por DSS

En una primera aproximación del modelo de colitis aguda inducida por la administración de DSS, comenzamos un experimento con la administración de DSS al 2% (P/V) en el agua de bebida en un grupo WT (WT-DSS 2%, n=7) y en un grupo TNAP (TNAP-DSS 2%, n=9). Estos ratones comenzaron a morir el día 7 y como consecuencia interrumpimos la administración de DSS. De hecho, el 100% de los animales colíticos del grupo WT-DSS 2% murieron el día 9. En el grupo TNAP-DSS 2% los ratones comenzaron a morir más tarde y el día 11 todavía el 12,5% de los animales estaban vivos (Figura 48). Este incremento en la mortalidad estuvo asociado a un mayor índice de la actividad de la enfermedad, alcanzando el 20 (muerte) el día 9 en el grupo WT-DSS 2%(Figura 48).

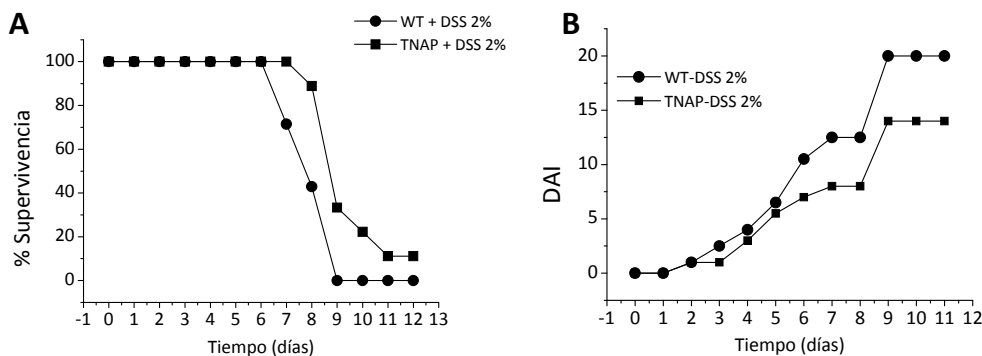


Figura 48. A. Curva de mortalidad de ratones WT y TNAP tras la administración de DSS al 2% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días, expresado en porcentaje de supervivencia. **B.** Índice de la actividad de la enfermedad (DAI). Grupos colíticos: WT-DSS 2% (n=7) y TNAP-DSS 2% (n=9).

Debido a la alta mortalidad de esta cepa al administrar en el agua de bebida DSS al 2% (P/V), procedimos a realizar un modelo de colitis aguda administrando DSS a una concentración inferior (1% P/V). Se administró DSS al 1% (P/V) en el agua de bebida durante 9 días en un grupo WT (WT-DSS, n= 10) y en un grupo TNAP (TNAP-DSS, n= 14). Así mismo también contamos con dos grupos control a los que se les administró únicamente agua de bebida, los grupos WT (n= 9) y TNAP (n= 11). La administración en el agua de bebida de DSS al 1% (P/V) durante 9 días provocó un estado colítico marcado en el grupo WT-DSS, que fue menor en el grupo TNAP-DSS, como se puede observar en la evolución de pesos y en el índice de la actividad de la enfermedad (DAI) (Figura 49).

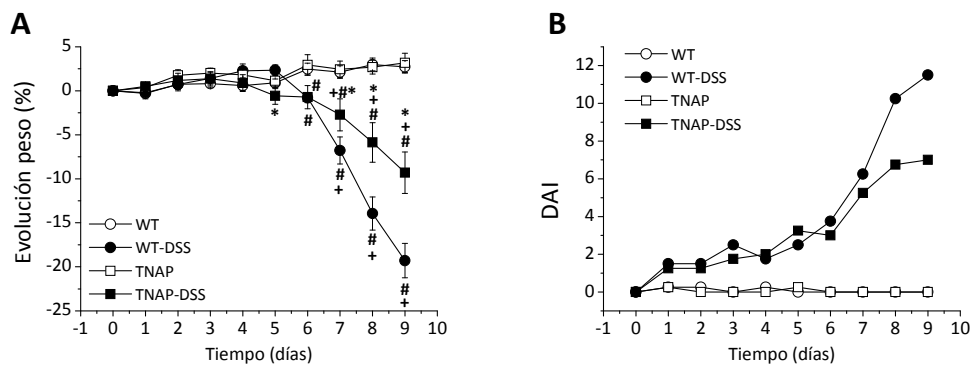


Figura 49. A. Evolución del peso corporal con respecto al día 0 expresado en porcentaje (%) tras la administración de DSS al 1% (P/V) de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=11); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=10) y TNAP-DSS (n=14). Resultados expresados como media±EEM. + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP). **B.** Índice de la actividad de la enfermedad (DAI).

Se determinó el peso y la longitud del colon, así como la relación entre ambos parámetros, observándose en los grupos colíticos un mayor peso del colon así como un acortamiento, lo que hizo que en estos grupos estuviese incrementada la relación peso/longitud comparándolos con sus controles (Figura 50 A).

A partir de las tinciones con hematoxilina-eosina, con un aumento de 20x, se realizó la medida de las diferentes capas del epitelio intestinal, observando un alargamiento en las criptas, la submucosa y la capa muscular en los grupos colíticos que fueron significativamente menos marcados en el grupo TNAP-DSS (vs. WT-DSS) (Figura 50 B). En estas tinciones, puede observarse como en el grupo TNAP-DSS se mantuvo más la estructura del epitelio colónico y hubo menos infiltración celular (Figura 51).

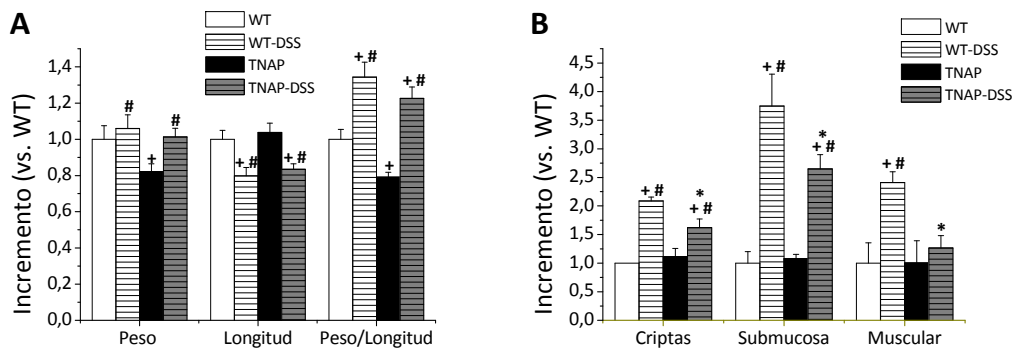


Figura 50. A. Incremento (vs. WT) en el peso, longitud y relación peso-longitud del colon expresado en tanto por 1. **B.** Incremento (vs. WT) de la longitud de las criptas, la submucosa y la capa muscular colónicas expresado en tanto por 1. Resultados expresados como media±EEM de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=11); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=10) y TNAP-DSS (n=14). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

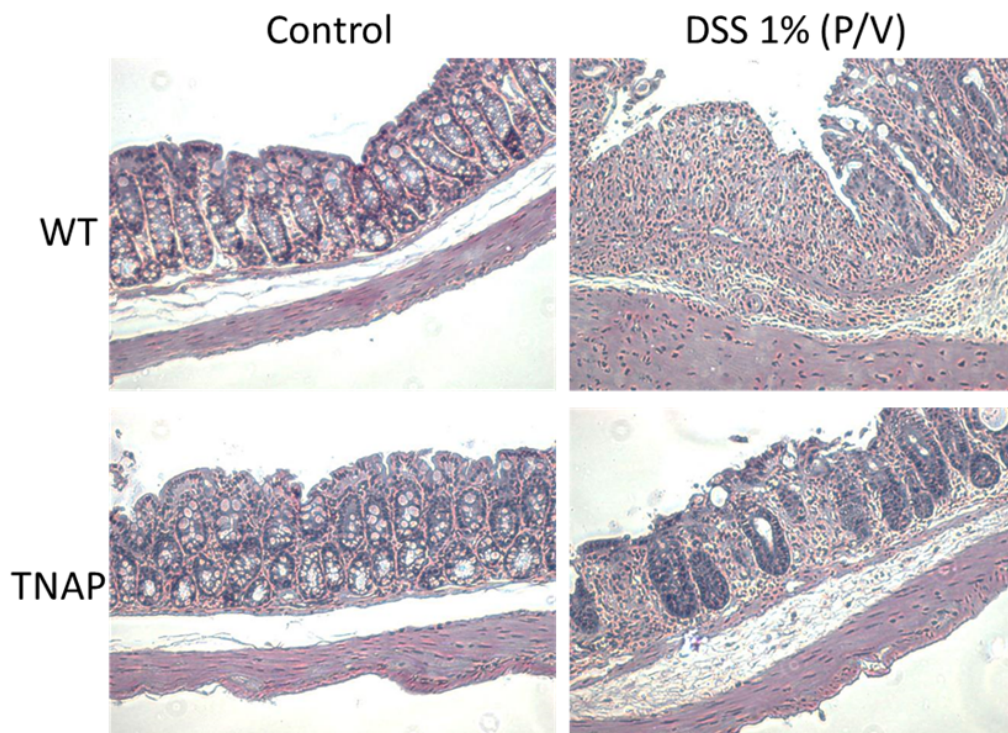


Figura 51. Imágenes representativas de tinciones colónicas con hematoxilina-eosina (20x). Panel superior: grupos WT: izquierda Control, derecha: DSS 1% (P/V). Panel inferior: grupos TNAP: izquierda: Control, derecha DSS 1% (P/V). Grupos control: WT (n=3) y TNAP (n=6); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=4) y TNAP-DSS (n=6).

Se determinó la actividad la actividad AP en colon, así como la sensibilidad a levamisol y se observó un incremento en la actividad AP colónica así como una mayor sensibilidad a levamisol en los grupos colíticos con respecto a los controles (Figura 52 A). Este incremento de actividad AP fue inferior en el grupo TNAP-DSS (vs. WT-DSS), así como la sensibilidad a levamisol (Figura 52 B). También se determinó la actividad MPO en colon, que fue elevada en los grupos colíticos, aunque significativamente inferior en el grupo TNAP-DSS (vs. WT-DSS) (Figura 53).

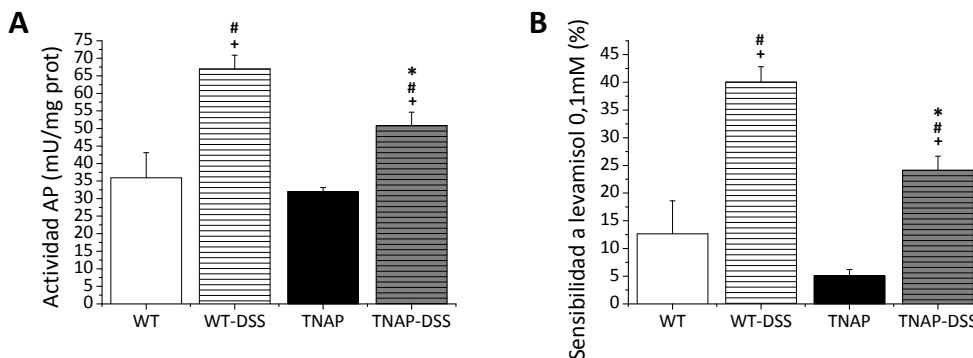


Figura 52. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM. **A.** Actividad AP expresada como mU/mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 0,1mM expresada como porcentaje. Resultados expresados como media±EEM de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=11); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=10) y TNAP-DSS (n=14). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

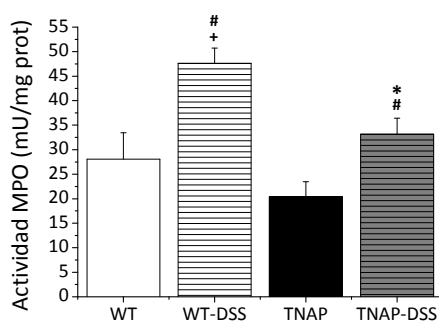


Figura 53. Actividad MPO colónica expresada como mU/mg proteína. Resultados expresados como media±EEM de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=11); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=10) y TNAP-DSS (n=14). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

Mediante citometría de flujo se analizó la población linfocitaria en sangre periférica, sin observarse diferencias entre grupos (datos no mostrados). También se analizaron las poblaciones de linfocitos T CD4, CD8 y totales en las células aisladas de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM),

observándose un marcado incremento de la población linfocitaria, tanto de CD4 como de CD8, en el grupo TNAP-DSS con respecto al WT-DSS (Figura 54).

Con objeto de determinar el papel de los linfocitos en las CGLM, se cultivaron las CGLM con Con A, que estimula a los linfocitos, y se determinó la producción de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17 mediante ELISA., encontrándose un incremento significativo en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en el grupo TNAP-DSS, mientras que la producción de IL-17 fue significativamente inferior con respecto al grupo WT-DSS. (Figura 55)

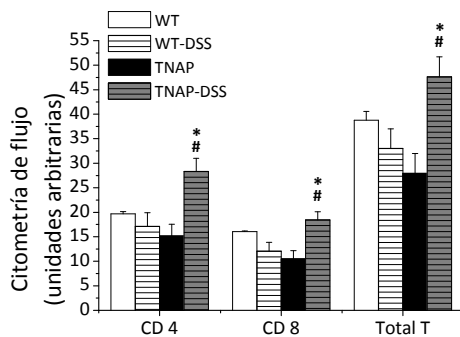


Figura 54. Población linfocitaria en las CGLM. Linfocitos T CD4, CD8 y totales en las CGLM determinados por citometría de flujo. Resultados expresados como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=6); y los grupos colíticos: WT-DSS (n=4) y TNAP-DSS (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

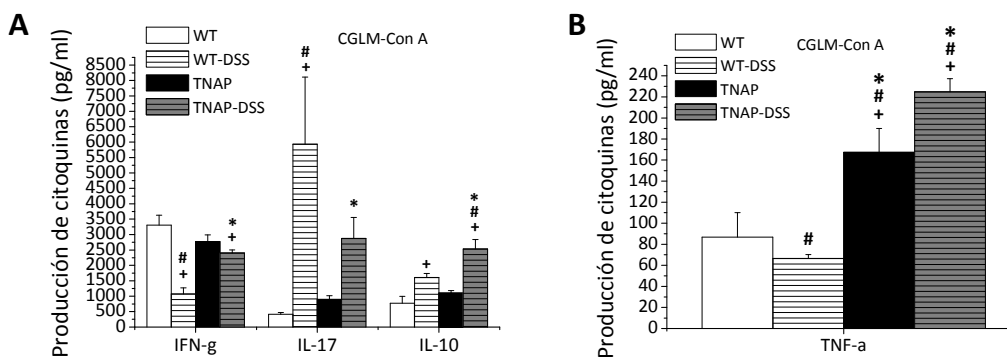


Figura 55. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-10 (A) y TNF- α (B) por las CGLM estimulados con Con A expresada como pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=7) y TNAP (n=16); y grupos colíticos: WT-DSS (n=11) y TNAP-DSS (n=18). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

También se determinó la producción de citoquinas por los explantes colónicos en cultivo, tanto sin estimular como estimulados con LPS, para determinar la contribución de los macrófagos. En este caso, en los explantes no estimulados observamos una mayor producción de TNF- α en los grupos colíticos con respecto a los controles, así como una mayor producción de IL-10 e IL-17 del grupo TNAP-DSS. En la determinación de citoquinas producidas por los explantes colónicos estimulados con LPS, pudimos observar un marcado incremento en la producción de TNF- α e IL-10 del grupo TNAP-DSS (Figura 56).

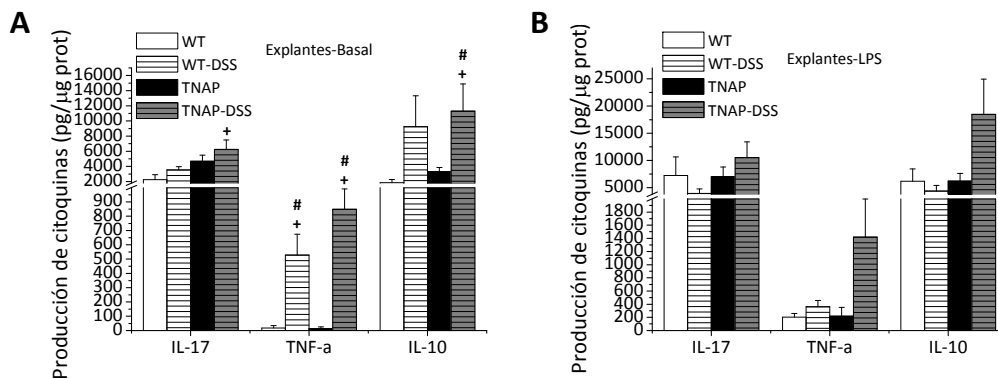


Figura 56. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , e IL-10 por los explantes colónicos cultivados sin estimular (A) y estimulados con LPS (B) expresada en pg/ μ g proteína. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos de control: WT (n=3) y TNAP (n=3); y grupos colíticos: WT-DSS (n=6) y TNAP-DSS (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSS); # p<0,05 (vs. TNAP).

Mediante IHC se determinó la expresión de la IAP y de la TNAP en los grupos colíticos. Como se observó en la Figura 43, la IAP se detectó principalmente en las células caliciformes. Es característico de la colitis, la pérdida de un elevado número de células caliciformes, por lo que en el grupo WT-DSS que estaba más afectado, se detectó menos IAP que en el grupo TNAP-DSS (Figura 57). Además, se observó la presencia de IAP en fibroblastos en ambos grupos (Figura 58, panel superior). En cuanto a la TNAP, prácticamente no se detectó su presencia en animales sanos (Figura 43), sin embargo, sí se detectó TNAP en el infiltrado celular de los grupos colíticos, probablemente debido a los neutrófilos (Figura 58, panel inferior).

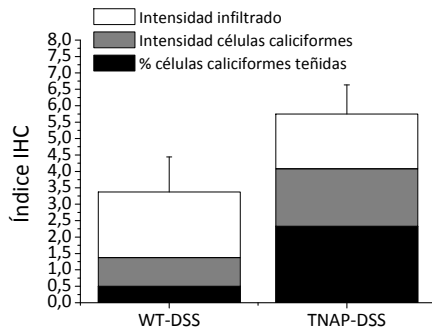


Figura 57. Índice IHC para cuantificar la presencia de IAP. Índice basado en el porcentaje de células caliciformes teñidas (0-4), la intensidad de tinción de éstas (0-5) así como la intensidad de la tinción de las células infiltradas (0-5). Resultados expresados como media±EEM de los grupos colíticos: WT-DSS (n=4) y TNAP-DSS (n=6).

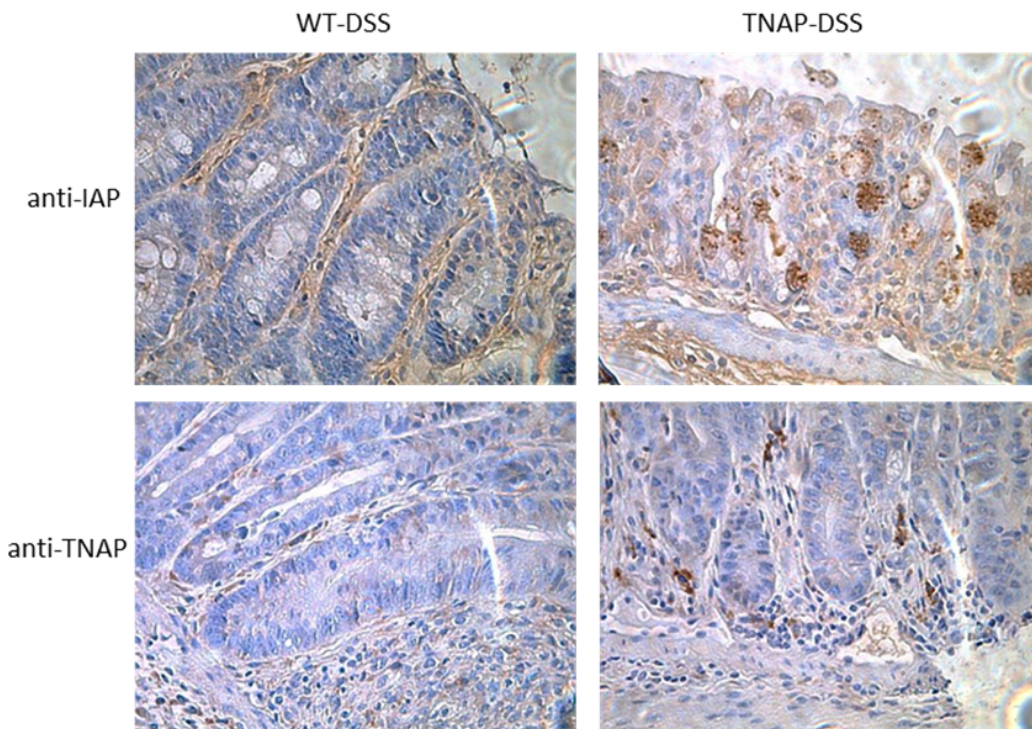


Figura 58. Imágenes representativas de IHC colónicas con anti-IAP (panel superior) y anti-TNAP (panel inferior) (40x). Panel superior: tinciones con anti-IAP, izquierda: grupo WT-DSS y derecha grupo TNAP-DSS. Panel inferior: tinciones con anti-TNAP, izquierda: grupo WT-DSS y derecha grupo TNAP-DSS. Imágenes representativas de los grupos colíticos: WT-DSS (n=4) y TNAP-DSS (n=6).

1.2. Importancia de la TNAP en la colitis crónica inducida por DSS

Con el objeto de determinar la importancia de la TNAP en la colitis crónica inducida por DSS, se les administró DSS al 1% (P/V) a un grupo WT (WT-DSSc, n=9) y a otro grupo TNAP (TNAP-DSSc, n=12) durante 3 ciclos de 5 días. Así mismo, contamos con dos grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3). Tras tres ciclos de DSS al 1% (P/V), se registró una mortalidad del 35,7 % de los animales del grupo WT-DSSc murió mientras que del grupo TNAP-DSSc sólo murió un 14,3% (Figura 59). Además tras el tercer ciclo de DSS los ratones del grupo TNAP-DSSc recuperaron el peso perdido durante los primeros ciclos, alcanzando el del grupo control TNAP. Puede observarse una bajada de peso después de los ciclos de administración de DSS, aunque el grupo TNAP-DSSc fue capaz de recuperarse mejor del último ciclo (Figura 59).

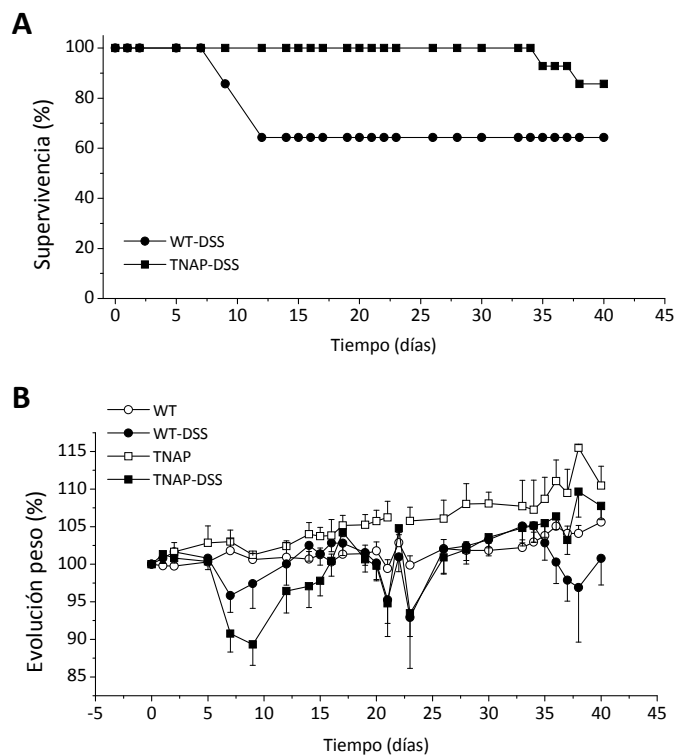


Figura 59. A. Supervivencia de los ratones tras la administración durante tres ciclos de DSS al 1% (P/V). **B.** Evolución del peso corporal desde el inicio de la administración de DSS el día 0 de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3); y los grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=12). Resultados expresados como media±EEM.

Se determinó el peso y la longitud del colon, así como su relación. Mientras que la longitud colónica disminuyó en los animales colíticos, el peso y la relación peso/longitud colónicas se incrementaron en la colitis (Figura 60). Se determinó la actividad AP y la sensibilidad a levamisol, no encontrándose diferencias significativas con respecto a la actividad AP, mientras que sí se encontró un incremento de la sensibilidad a levamisol 0,1mM en los grupos colíticos con respecto a los grupos control (Figura 61). De igual modo, se determinó la actividad MPO colónica, encontrándose disminuida la actividad del grupo TNAP-DSSc con respecto al WT-DSSc (Figura 62).

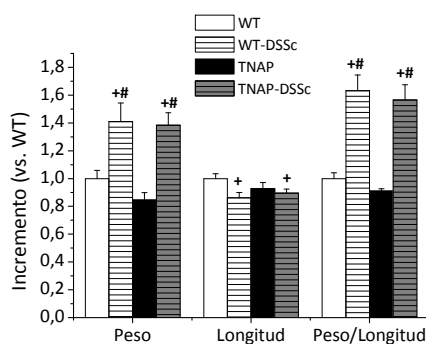


Figura 60. Incremento (vs. WT) del peso, la longitud y la relación peso-longitud del colon expresado en tanto por 1 de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3); y los grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=12). Resultados expresados como media±EEM. + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

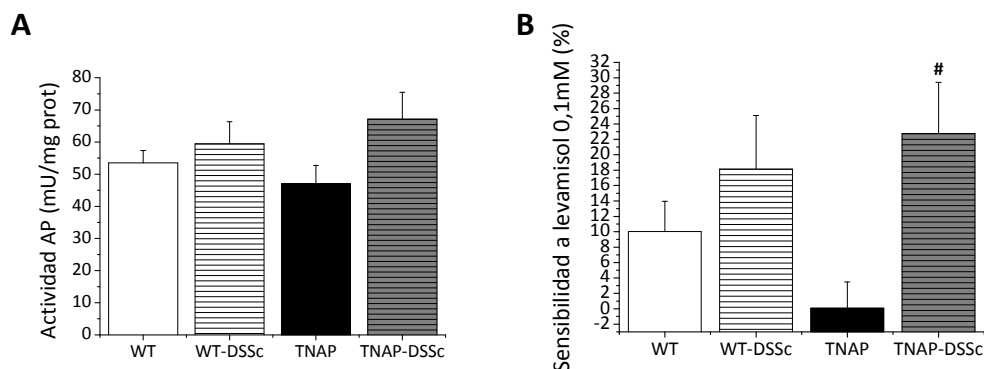
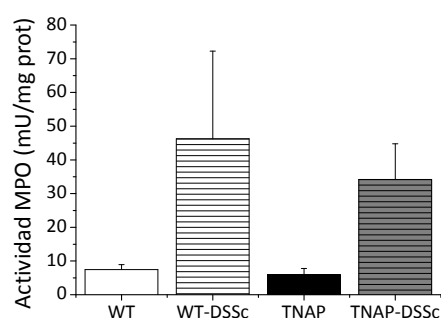


Figura 61. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM. **A.** Actividad AP colónica expresada en mU/mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 0,1mM expresada como porcentaje. Grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3); y grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=12). Resultados expresados como media±EEM. + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

Figura 62. Actividad MPO colónica expresada como mU/mg proteína. Grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3); y grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=12). Resultados expresados como media±EEM. + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).



El Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada realizó las medidas de las poblaciones hematológicas en sangre total, sin detectar diferencias significativas entre los grupos colíticos, aunque se pudo observar una menor población de glóbulos blancos, así como un menor porcentaje de monocitos/macrófagos (Tabla 17). Esta menor población de macrófagos también se observó mediante citometría de flujo (Figura 63) así como en el grupo control TNAP (Tabla 16).

GLÓBULOS BLANCOS

	WBC (Totales)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
WT-DSSc	5,3±1	90,6±2,1	4,22±1,6	2,5±0,6	0,2±0,1	2,5±0,8
TNAP-DSSc	4,5±0,5	90,3±4,3	3,78±2,2	3,6±1,2	0,1±0	2,1±2,2

GLÓBULOS ROJOS

	RBC (Totales)	HGB	HCT	MCH	MCV	RDW
WT-DSSc	7,9±0,7	12,6±0,9	34,1±3,3	43,1±0,8	16,1±0,6	16,2±0,6
TNAP-DSSc	8,9±0,4	13,7±0,5	38,6±1,6	43,3±0,1	14,8±0,2	14,8±0,2

PLAQUETAS

	PLT	MPV	PCT	PDW
WT-DSSc	305±89,8	9±0,5	0,3±0,1	41,2±0,6
TNAP-DSSc	348±190,7	9,1±0,3	0,3±0,1	41,4±2,1

Tabla 17. Poblaciones celulares sanguíneas. WBC: glóbulos blancos totales ($10^3/\mu\text{l}$). RBC: glóbulos rojos totales ($10^6/\mu\text{l}$). HGB: hemoglobina (g/dl). HCT: hematocrito. MCH: HMG corpuscular media. MCV: volumen corpuscular medio (fl). RDW: distribución de tamaños de glóbulos rojos. PLT: plaquetas totales ($10^3/\mu\text{l}$). MPV: volumen plaquetario medio (fl). PCT: trombocrito. PDW: distribución de tamaños de plaquetas. Datos expresados como media±EEM. Grupos colíticos WT-DSSc (n=4) y TNAP-DSSc (n=5).

Con objeto de caracterizar la producción de citoquinas a nivel sistémico, se obtuvieron los esplenocitos y se cultivaron tanto estimulados sin estimular (datos no mostrados) así como estimulados con Con A y con LPS. La estimulación con Con A provoca una expansión de los linfocitos T de los esplenocitos, lo que nos permite su estudio, mientras que la estimulación con LPS provoca la estimulación de los macrófagos. El grupo sin estimular se utilizó como control. La estimulación con Con A dio lugar a una elevada producción de IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por los grupos heterocigotos para la expresión de TNAP, que fue significativo en el caso del grupo colítico TNAP-DSSc (Figura 64 A y B). Mientras que la estimulación con LPS no mostró grandes diferencias entre grupos (Figura 64 C).

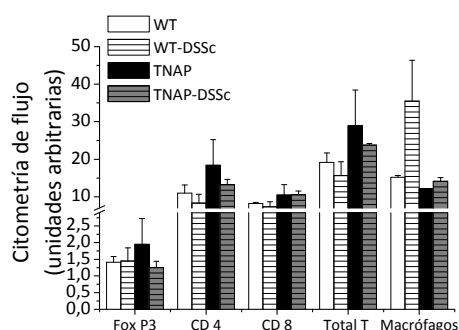


Figura 63. Poblaciones celulares sanguíneas. Linfocitos T reguladores, CD4, CD8, totales y macrófagos determinados mediante citometría de flujo. Resultados expresados como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=9) y TNAP (n=3); y grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=12). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

Se determinó la producción de citoquinas en células aisladas de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) estimulados con Con A para determinar el papel de los linfocitos T. Encontrándose una mayor producción de citoquinas en los grupos colíticos con respecto a sus controles, siendo significativamente inferior la producción de IL-17, TNF- α e IL-6 por parte del grupo TNAP-DSSc con respecto al WT-DSSc (Figura 65).

También se determinó la producción de citoquinas por los explantes colónicos en cultivo, tanto sin estimular como estimulados con LPS, para determinar la contribución de los macrófagos. En este caso, en los explantes no estimulados no observamos prácticamente diferencias mientras que en los estimulados con LPS se observó una mayor producción de TNF- α e IL-6 por parte del grupo TNAP-DSSc con respecto al grupo WT-DSSc (Figura 66).

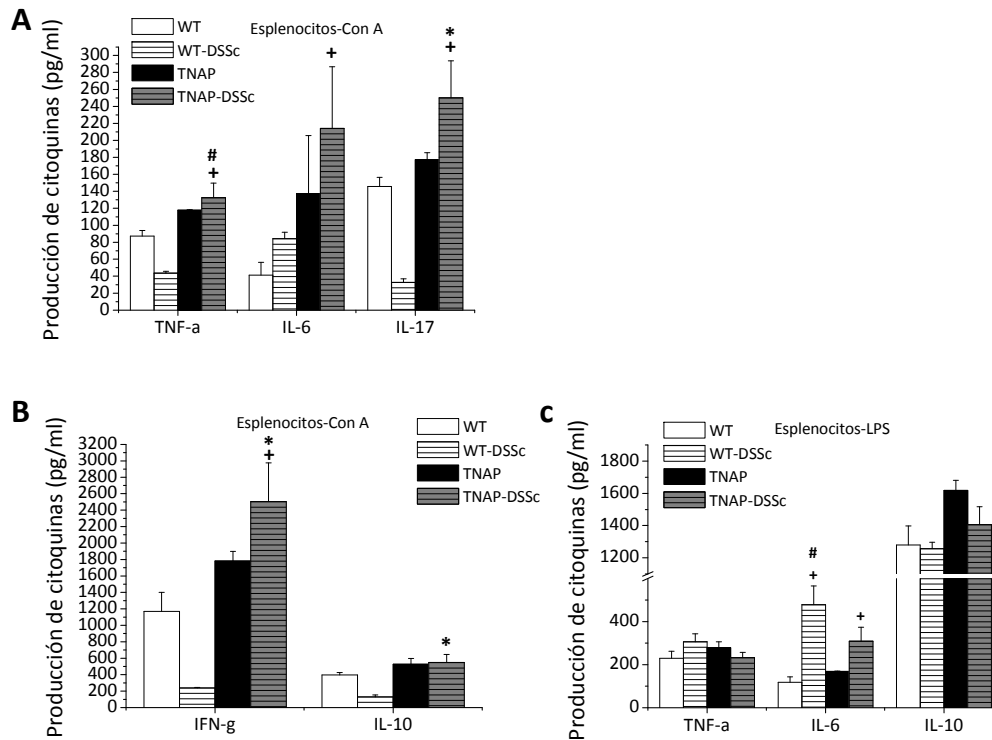


Figura 64. Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6, IL-17 (**A**), IFN- γ e IL-10 (**B**) por los esplenocitos cultivados estimulados con Con A expresada en pg/ml. **C.** Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados LPS expresados en pg/ml. Resultados expresados como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=2); y grupos colícticos: WT-DSSc (n=2) y TNAP-DSSc (n=10). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

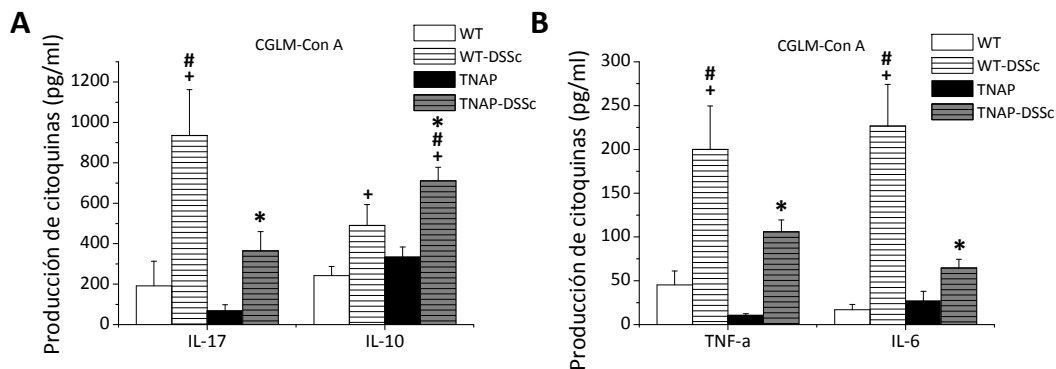


Figura 65. Producción de las citoquinas IL-17, IL-10 (**A**), TNF- α e IL-6 (**B**) por las CGLM estimulados con Con A expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=12) y TNAP (n=4); y grupos colícticos: WT-DSSc (n=12) y TNAP-DSSc (n=17). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

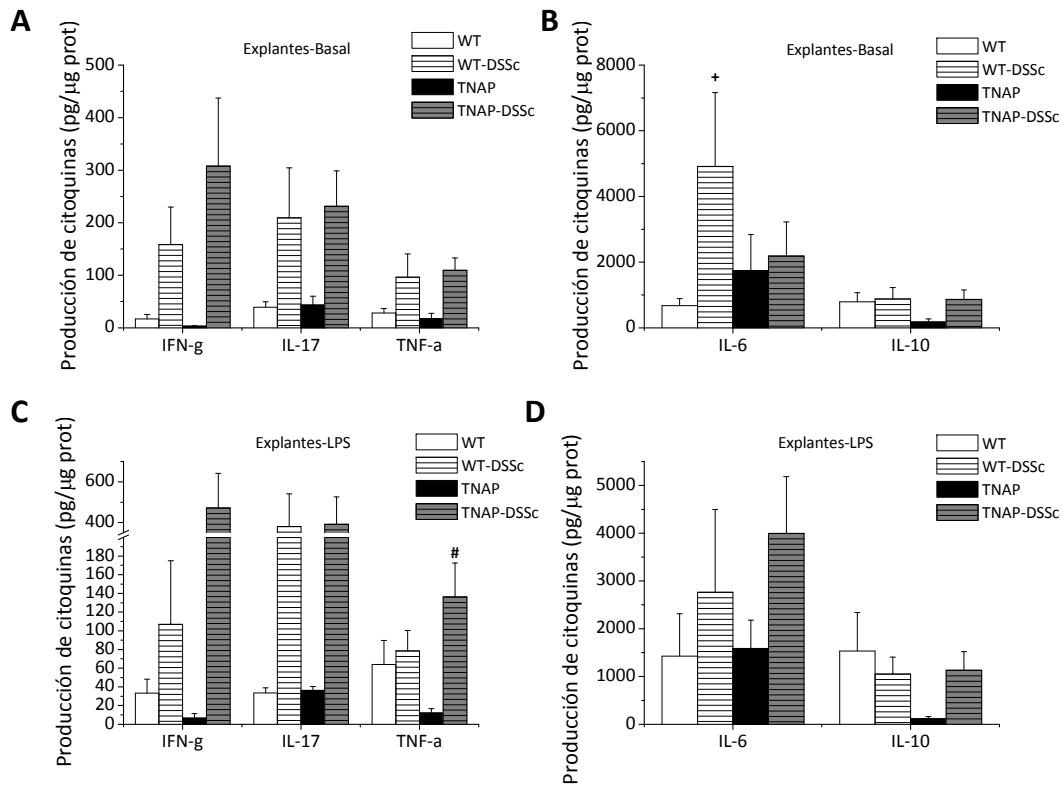


Figura 66. A y B. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α (A), IL-6 e IL-10 (B) por los explantes colónicos cultivados sin estimular. **C y D.** Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α (C), IL-6 e IL-10 (D) por los explantes colónicos cultivados estimulados con LPS. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=3); y grupos colíticos: WT-DSSc (n=9) y TNAP-DSSc (n=11). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-DSSc); # p<0,05 (vs. TNAP).

1.3. Importancia de la TNAP en la colitis aguda inducida por TNBS

Siete días después de la presensibilización de los grupos colíticos (WT-TNBS, n=7 y TNAP-TNBS, n=8) con una solución oleosa tópica de TNBS al 1% (V/V) se les administró intrarrectalmente una solución de TNBS al 2% (V/V) en etanol al 50% (V/V). En estos experimentos también contamos con dos grupos control (WT, n=2 y TNAP, n=2) a los que se les administró una solución oleosa tópica sin TNBS y el día de la inducción de la colitis se les administró una solución de etanol al 50% (V/V). La administración de TNBS provocó un estado colítico que se vio reflejado en la pérdida de peso de los animales de los grupos WT-TNBS y TNAP-TNBS (Figura 67).

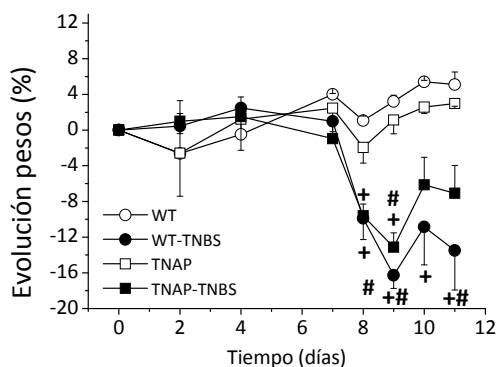


Figura 67. Evolución de pesos en los animales desde la presensibilización (día 0) hasta la administración del TNBS (día 7) y el desarrollo de la colitis hasta el día 11. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y grupos colíticos: WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

La medida del peso y la longitud del colon, mostró un aumento de peso en los grupos colíticos y un acortamiento, la relación de ambos parámetros fue significativamente superior en el grupo TNAP-TNBS (Figura 68). En este caso no hemos podido establecer un criterio de valoración del daño macroscópico, ya que en ratón las manifestaciones macroscópicas son menos evidentes.

Al determinar las actividades enzimáticas colónicas, se observó un incremento en la actividad AP en los grupos colíticos, que fue inferior en el TNAP-TNBS (Figura 69 A) así como la sensibilidad a levamisol 0,1 mM (Figura 69 B). La actividad MPO en colon significativamente menor en el grupo TNAP-TNBS con respecto al grupo WT-TNBS (Figura 70).

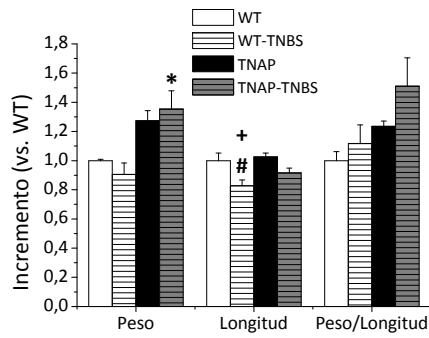


Figura 68. Incremento (vs. WT) del peso, la longitud y la relación peso-longitud del colon expresado en tanto por 1. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y grupos colícticos: WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

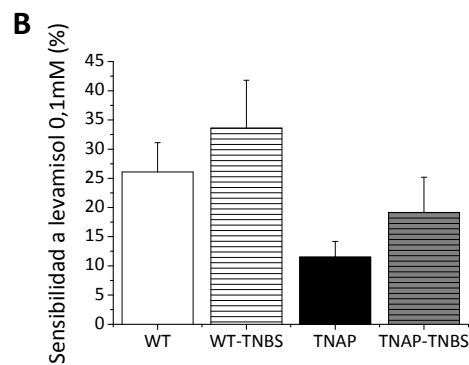
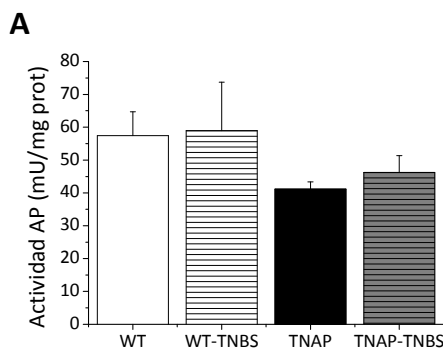
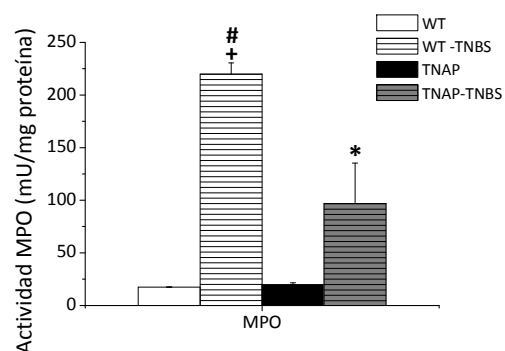


Figura 69. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM. **A.** Actividad AP expresada en mU/mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 0,1mM expresada en porcentaje. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y grupos colícticos: WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

Figura 70. Actividad MPO colónica expresada en mU/mg proteína. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y grupos colícticos: WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).



Se determinó la fórmula sanguínea a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, observándose una población de macrófagos inferior en el grupo TNAP-TNBS, probablemente relacionado con la menor proporción de macrófagos observada en animales

control TNAP (Tabla 16), así como diferencias significativas en las plaquetas entre los grupos WT-TNBS y TNAP-TNBS (Tabla 18).

GLÓBULOS BLANCOS						
	WBC (Totales)	Linfoc. (%)	Monoc. (%)	Neutrófilos (%)	Eosino. (%)	Basófilos (%)
WT-TNBS	3,7±0,5	86,6±2,7	7,3±1,7	3,4±0,2	0,1±0	2,5±1,2
TNAP-TNBS	4,1±0,1	92,1±2,8	4,1±1,7	2,8±0,8	0,1±0	1±1,1
GLÓBULOS ROJOS						
	RBC (Totales)	HGB	HCT	MCH	MCV	RDW
WT-TNBS	7,8±0,5	12,1±0,8	34,7±2,4	15,4±0,1	44,2±0,2	14,1±0,3
TNAP-TNBS	9,2±0,9	14,4±1,3	41,6±4,1	15,6±0,1	45±0,3	14,3±0,3
PLAQUETAS						
	PLT	MPV	PCT	PDW		
WT-TNBS	159,7±34,7	7,7±0,2	0,12±0	41,7±0,8		
TNAP-TNBS	315±34,8*	6,55±0,3*	0,21±0	32,3±0,7*		

Tabla 18. Poblaciones celulares sanguíneas. WBC: glóbulos blancos totales ($10^3/\mu\text{l}$). RBC: glóbulos rojos totales ($10^6/\mu\text{l}$). HGB: hemoglobina (g/dl). HCT: hematocrito. MCH: HMG corpuscular media. MCV: volumen corpuscular medio (fl). RDW: distribución de tamaños de glóbulos rojos. PLT: plaquetas totales ($10^3/\mu\text{l}$). MPV: volumen plaquetario medio (fl). PCT: trombocrito. PDW: distribución de tamaños de plaquetas. * $p < 0,05$ (vs. WT-TNBS) (t Student). Datos expresados como media±EEM. Grupos colíticos WT-TNBS (n=4) y TNAP-TNBS (n=4). * $p < 0,05$ vs. WT-TNBS.

Con objeto de caracterizar la producción de citoquinas a nivel sistémico, se obtuvieron los esplenocitos y se cultivaron tanto estimulados sin estimular (datos no mostrados) así como estimulados con Con A y con LPS. La estimulación con Con A provoca una expansión de los linfocitos T dentro de los esplenocitos, lo que nos permite su estudio, mientras que la estimulación con LPS provoca la estimulación de los macrófagos. El grupo sin estimular se utilizó como control. La estimulación con Con A dio lugar a una elevada producción de IFN- γ e IL-17 por los grupos heterocigotos para la expresión de TNAP (Figura 71 A y B). Mientras que la estimulación con LPS no mostró grandes diferencias entre grupos (Figura 71 C).

Se determinó la producción de citoquinas en células aisladas de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) estimulados con Con A para determinar el papel de los linfocitos T. Encontrándose una mayor producción de citoquinas por parte de los grupos colíticos (Figura 72).

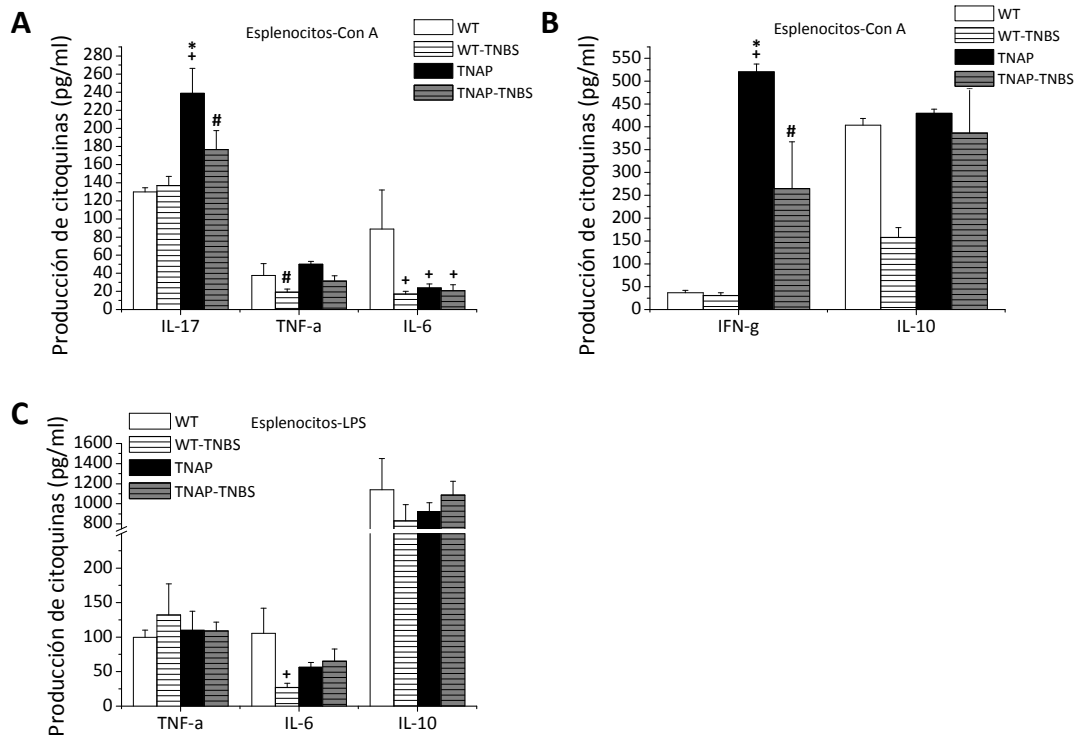


Figura 71. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-6 (A), IFN- γ e IL-10 (B) por los esplenocitos cultivados estimulados con Con A expresada como pg/ml. C. Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados con LPS expresada como pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=4) y los grupos colíticos WT-TNBS (n=8) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

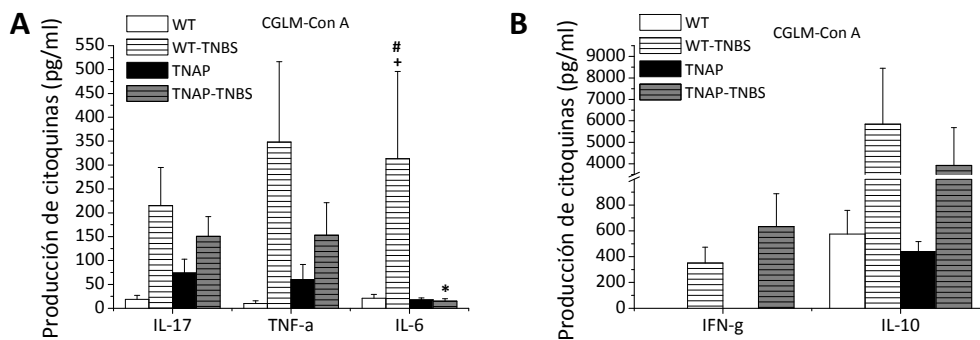


Figura 72. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-6 (A), IFN- γ , e IL-10 (B) por las CGLM estimulados con Con A expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=4) y los grupos colíticos WT-TNBS (n=22) y TNAP-TNBS (n=23). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

También se determinó la producción de explantes colónicos, tanto sin estimular como estimulados con LPS, para determinar la contribución de los macrófagos. En este caso no observamos diferencias significativas en la producción de citoquinas (Figuras 73 y 74).

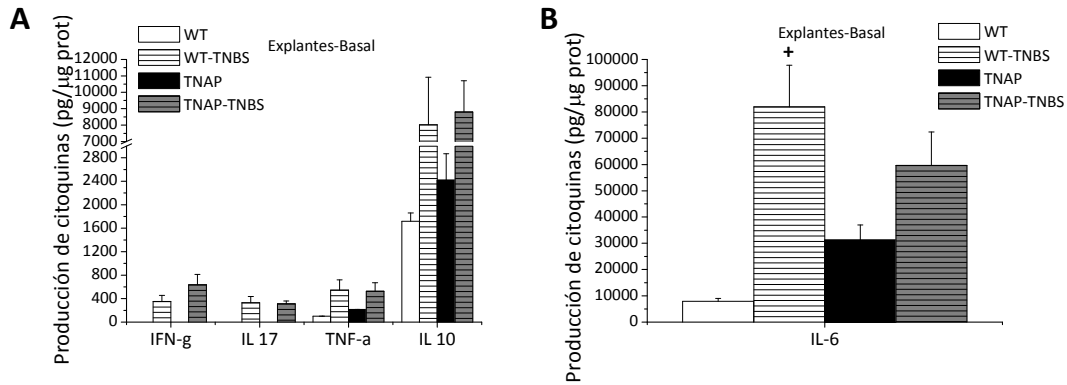


Figura 73. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (A) e IL-6 (B) por los explantes colónicos cultivados sin estimular expresada en pg/ml. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y los grupos colíticos WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

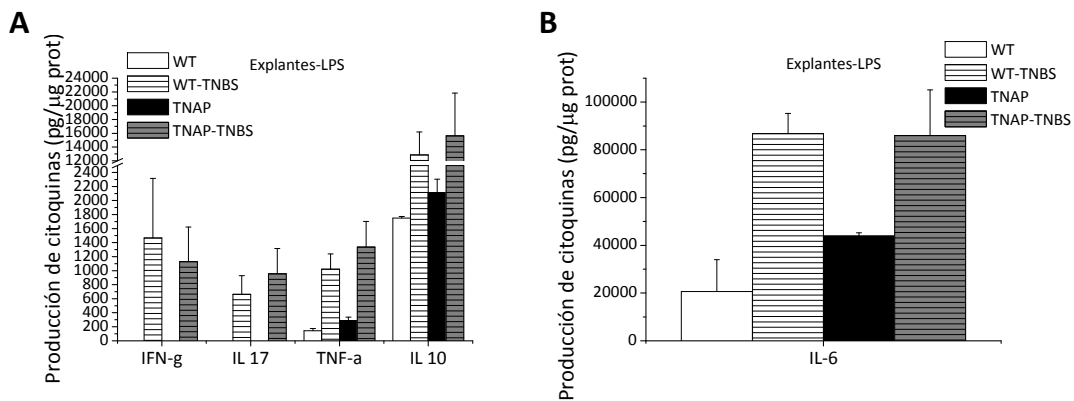


Figura 74. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (A) e IL-6 (B) por los explantes colónicos cultivados estimulados con LPS expresada en pg/ml. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos de los grupos control: WT (n=2) y TNAP (n=2) y los grupos colíticos WT-TNBS (n=7) y TNAP-TNBS (n=8). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-TNBS); # p<0,05 (vs. TNAP).

1.4. Importancia de la TNAP en la colitis inducida por transferencia celular adoptiva

Con objeto de comprobar la importancia de la TNAP en la colitis inducida por transferencia celular adoptiva, se obtuvieron células CD4+ CD25- procedentes por una parte de ratones WT y por otra de ratones TNAP y se introdujeron en ratones inmunodeficientes SCID siendo los dos grupos de estudio: WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4). La evolución del peso corporal desde la transferencia celular adoptiva hasta el comienzo del desarrollo de la colitis fue similar en los grupos hasta que se estableció la enfermedad, en este caso se observó una mayor afectación del grupo WT Transfer., que perdieron más peso (Figura 75 A) y mostraron una mayor afectación a nivel endoscópico (Figura 75 B y 76). Sin embargo, en la valoración de los cortes histológicos del colon no se observaron diferencias (datos no mostrados).

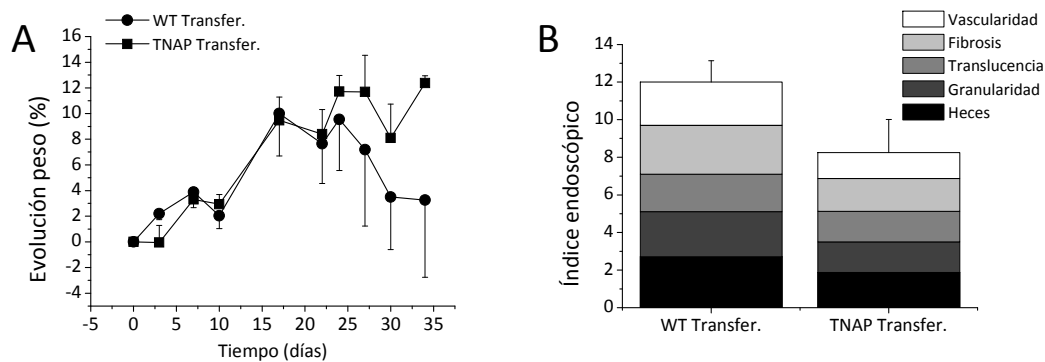


Figura 75. A. Evolución del peso corporal de los animales desde la transferencia celular adoptiva (día 0), expresado como % peso corporal con respecto al día 0. **B.** Índice de inflamación endoscópico el día 34. Datos expresados como media±EEM. WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

En cuanto a la AP, no se encontró aumentada su actividad en los grupos colíticos, aunque sí se incrementó la sensibilidad a levamisol 10mM, en menor medida en el grupo TNAP Transfer. (Figura 77). Aunque la actividad MPO se incrementó en los grupos transferidos (Figura 78), en este caso no observamos diferencias significativas entre ellos.

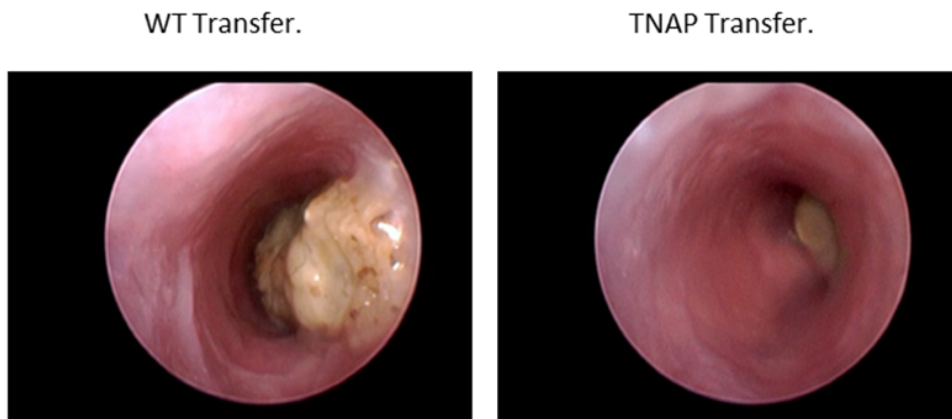


Figura 76. Imagen tomada con endoscopio. WT Transfer. IE=13 (vascularidad: 2,5; fibrosis: 2,5; translucencia: 2,5; granularidad: 3; heces: 2,5) TNAP Transfer. IE=9 (vascularidad: 1; fibrosis: 2,5; translucencia: 1,5; granularidad: 1,5; heces: 2,5). Imágenes representativas de WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

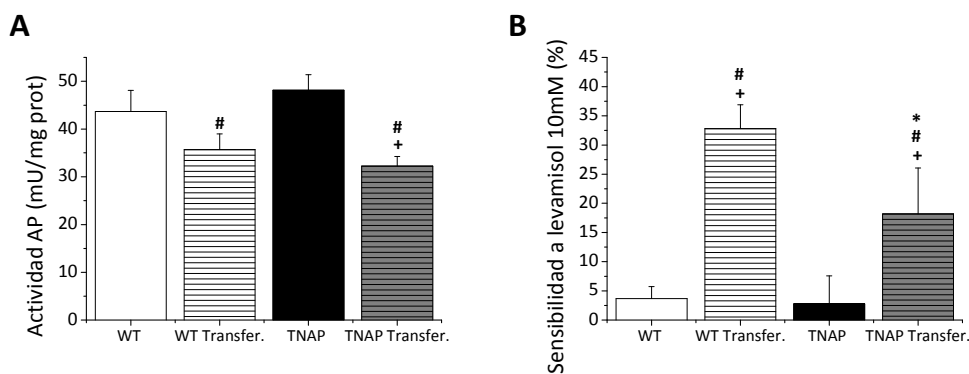


Figura 77. Actividad AP colónica. **A.** Actividad AP colónica expresada como mU7Mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 10mM expresada en porcentaje. Datos expresados como media±EEM + $p < 0,05$ (vs. WT); * $p < 0,05$ (vs. WT Transfer.); # $p < 0,05$ (vs. TNAP) Grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=7); grupos transferidos WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

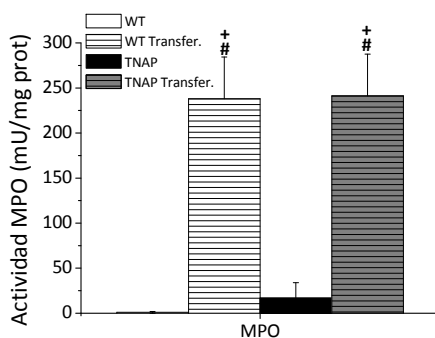


Figura 78. Actividad MPO colónica expresada en mU/mg proteína. Datos expresados como media±EEM + $p < 0,05$ (vs. WT); * $p < 0,05$ (vs. WT Transfer.); # $p < 0,05$ (vs. TNAP) Grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=7); grupos transferidos WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

Se aislaron células de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) de los grupos transferidos y se cultivaron en presencia de CD3/CD28. La estimulación de las CGLM con CD3/CD28 produce la expansión de las células T, lo que permite el estudio de la función de los linfocitos T presentes en las CGLM. No se observaron diferencias significativas en la producción de citoquinas por las CGLM (Figura 79).

También se cultivaron explantes colónicos de ambos grupos y se determinó la producción de citoquinas en el medio de cultivo. En este caso se observó una mayor producción de citoquinas en el grupo TNAP Transfer., aunque este incremento no fue significativo (Figura 80).

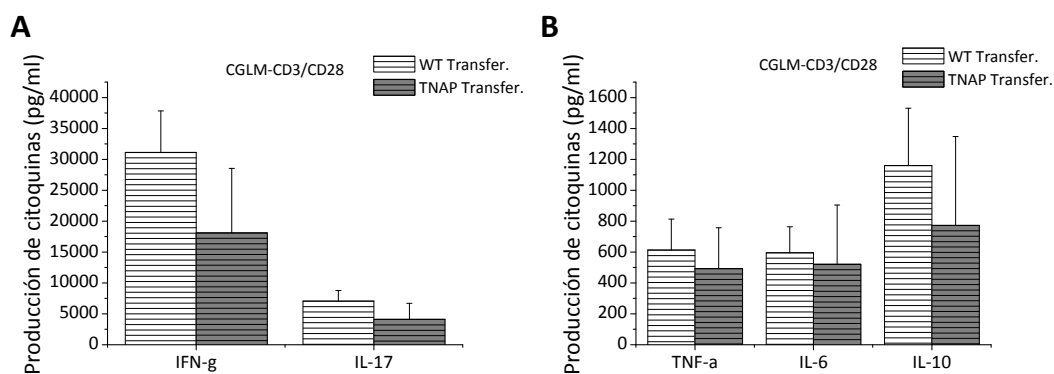


Figura 79. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17 (A), TNF- α , IL-6 e IL-10 (B) por las CGLM estimulados con CD3/CD28 expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos transferidos: WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

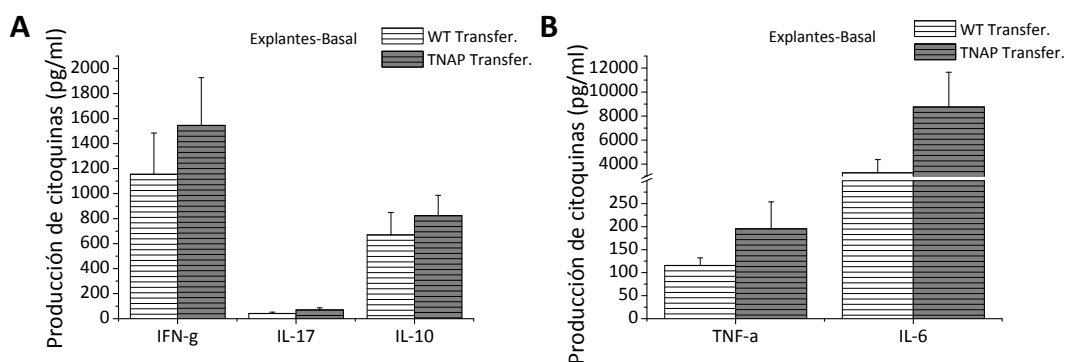


Figura 80. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-10 (A) TNF- α e IL-6 (B) por los explantes colónicos cultivados expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos transferidos: WT Transfer. (n=5) y TNAP Transfer. (n=4).

2. Importancia de la TNAP en la infección bacteriana intestinal

2.1. Importancia de la TNAP en la infección intestinal por *Citrobacter rodentium* (*C.rodentium*)

La administración oral de *Citrobacter rodentium* bioluminiscente provocó una infección intestinal que fue de menor intensidad en los ratones WT (WT *Citrobacter*, n=18). Aunque no se observaron diferencias en cuanto al peso de los animales, la carga bacteriana determinada por el sistema IVIS® fue mayor en el grupo TNAP *Citrobacter* (n=19), especialmente durante los días 4 y 5 post-infección. Del mismo modo, la detección de bacterias en heces, cultivadas en placas de LB, fue menor en el grupo TNAP *Citrobacter*, por lo que la mayor carga observada podría estar relacionada con un aclaramiento bacteriano ineficiente (Figura 81).

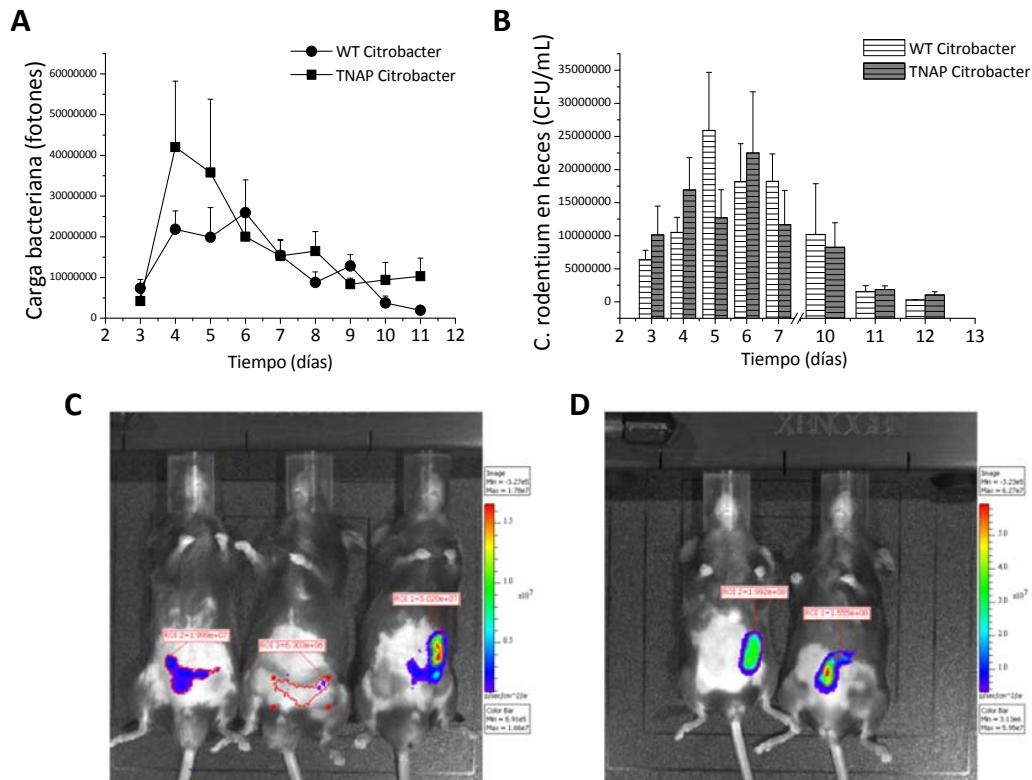


Figura 81. **A.** Determinación de la carga bacteriana expresada en fotones con el sistema IVIS® a diario tras la infección con *C. rodentium*. **B.** *C. rodentium* viables contadas a diario en placas de LB con eritromicina expresadas como CFU/ml. Datos expresados como media±EEM. Grupos infectados: WT *Citrobacter* (n=18) y TNAP (n=19) **C** y **D.** Imágenes representativas de la carga bacteriana en el grupo WT *Citrobacter* (**C**) y en el grupo TNAP *Citrobacter* (**D**) el día 5 post-infección.

Comparando los grupos infectados con los grupos control (WT, n=6 y TNAP, n=7), en este caso no se produjo un aumento de la actividad fosfatasa alcalina, aunque sí se produjo un incremento de la sensibilidad a levamisol 10mM, cuyo aumento fue significativamente menor en el grupo TNAP Citrobacter (Figura 82). La actividad MPO colónica se incrementó en ambos grupos, siendo muy elevada en el grupo TNAP Citrobacter, indicando una mayor infiltración leucocitaria en los animales deficientes en TNAP (Figura 83).

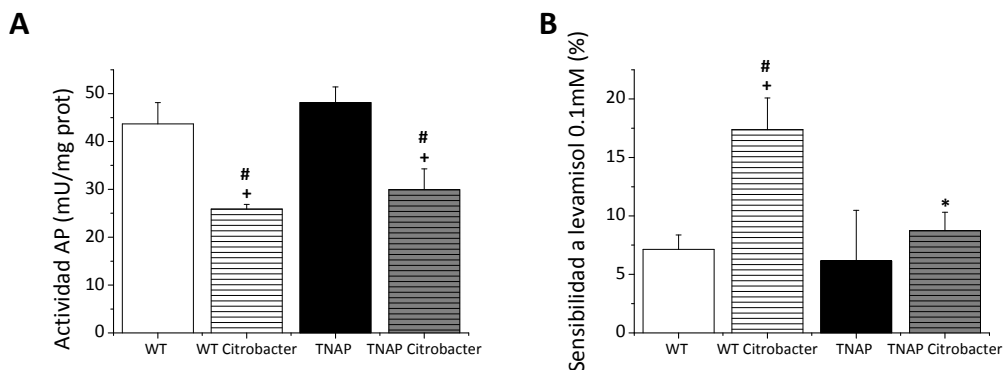
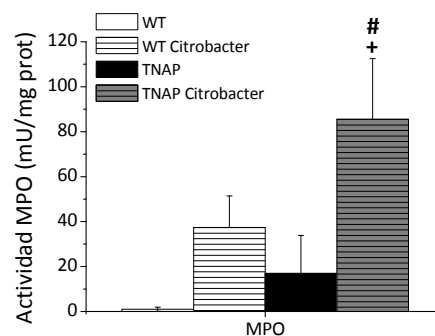


Figura 82. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 10mM **A.** Actividad AP colónica expresada como mU/mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 10mM expresada como porcentaje. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=7) y grupos infectados: WT Citrobacter (n=18) y TNAP (n=19). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT Citrobacter); # p<0,05 (vs. TNAP).

Figura 83. Actividades MPO colónica expresada como mU/mg proteína. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=6) y TNAP (n=7) y grupos infectados: WT Citrobacter (n=18) y TNAP (n=19). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT Citrobacter); # p<0,05 (vs. TNAP).



En la observación de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, tanto el índice de inflamación colónica (IIC) (debido tanto a la infiltración celular como al daño tisular) como la longitud de las criptas (marcador de hiperplasia), se incrementaron de forma significativa en

el grupo TNAP Citrobacter (Figura 84). En la Figura 84 D se puede observar una infiltración masiva acompañada de daño tisular y elongación de las criptas.

Se aislaron células de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) de los grupos infectados y se cultivaron en presencia de CD3/CD28. La estimulación de las CGLM con CD3/CD28 produce la expansión de las células T, lo que permite el estudio de la función de los linfocitos T presentes en las CGLM. No se observaron diferencias significativas en la producción de citoquinas por las CGLM (Figura 85).

También se cultivaron explantes colónicos de ambos grupos y se determinó la producción de citoquinas en el medio de cultivo. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas (Figura 86).

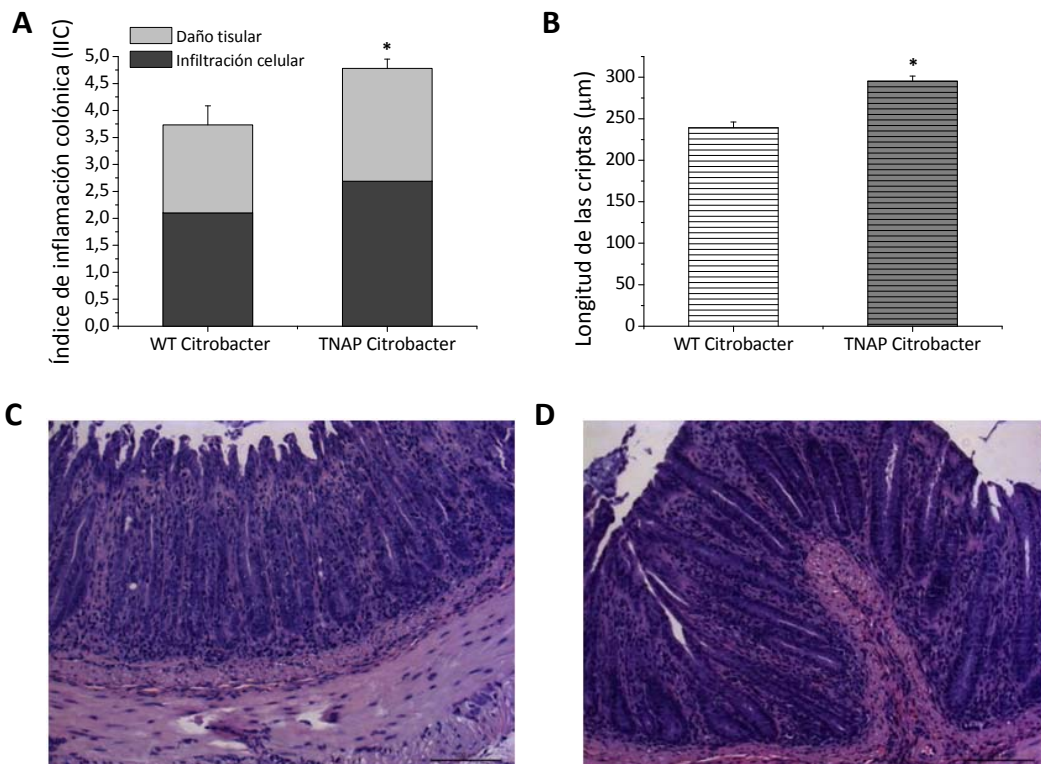


Figura 84. **A.** Índice de inflamación colónica determinado en las tinciones de hematoxilina-eosina (20x). **B.** Longitud de las criptas (μm), determinando >5 criptas/muestras. Datos expresados como media \pm EEM de los grupos infectados: WT Citrobacter (n=19) y TNAP Citrobacter (n=19). * $p < 0,05$ (vs. WT Citrobacter). **C** y **D.** Imágenes representativas de tinciones con hematoxilina-eosina (Índice de inflamación colónica) **C.** WT (IIC=3,5) **D.** TNAP (IIC=5).

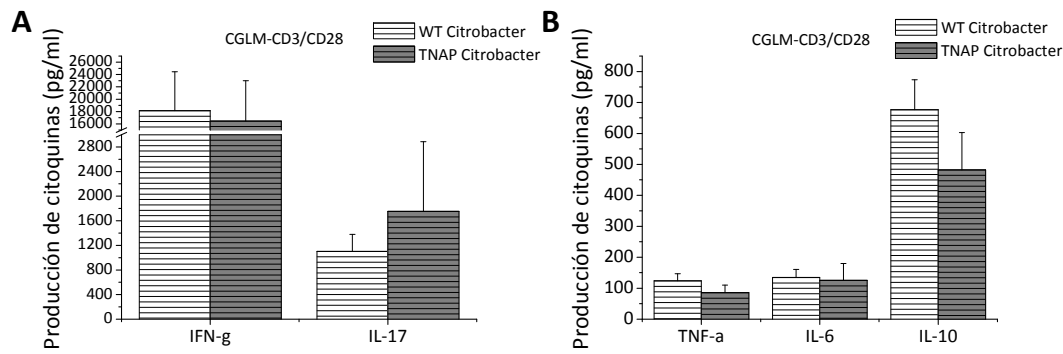


Figura 85. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17 (A), TNF- α , IL-6 e IL-10 (B) por las CGLM estimuladas con CD3/CD28 expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos transferidos: WT Citrobacter (n=5) y TNAP Citrobacter (n=6).

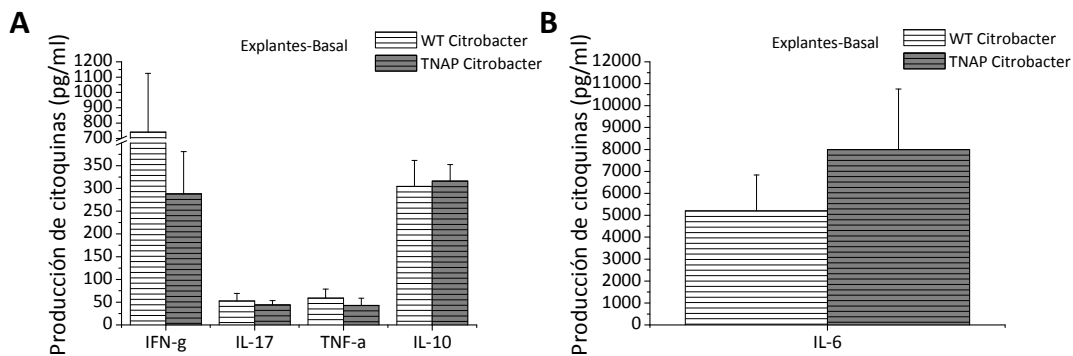


Figura 86. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 (A) e IL-6 (B) por los explantes colónicos cultivados expresada en pg/ml. Los resultados se expresan como media \pm EEM de los grupos transferidos: WT Citrobacter (n=9) y TNAP Citrobacter (n=10).

Mediante qRT-PCR se determinó la presencia en colon de angiotensina 4 (Ang4), fosfolipasa A2 (Plag2), la lectina Reg3 β (*regenerating islet-derived protein III beta*) y las interleuquinas IL-22, IL-17 e IL-1 β , encontrándose diferencias significativas en la expresión de IL-1 β , así como una menor expresión de Reg3b en el grupo TNAP Citrobacter (Figura 87).

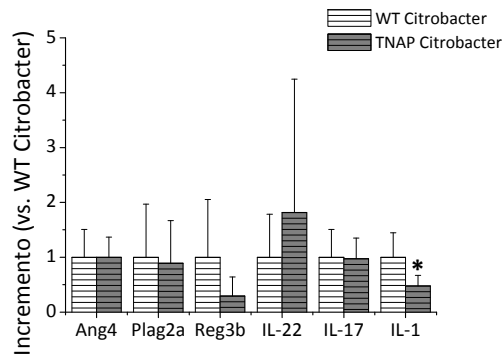


Figura 87. Incremento (vs. WT Citrobacter) de la expresión de angiotensina 4 (Ang4), fosfolipasa A2 (Plag2), la lectina Reg3 β (*regenerating islet-derived protein III beta*) y las interleuquinas IL-22, IL-17 e IL-1 en colon determinada por qRT-PCR. Valores expresados como media \pm EEM en tanto por uno. * $p < 0,05$ vs. WT Citrobacter.

2.2. Importancia de la TNAP en la infección intestinal por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*)

Posteriormente se comenzó a estudiar un modelo más agresivo de infección intestinal, la infección con *Salmonella* Typhimurium. Estudios preliminares, aunque con un número muy bajo de animales por grupo ($n=3$) demuestran que la TNAP ejerce un papel protector frente a la infección con *Salmonella*, ya que los ratones heterocigotos para la expresión de la TNAP mueren antes que los WT (datos no mostrados) y además se observó una mayor carga bacteriana en el grupo TNAP *Salmonella* (Figura 88), presentando por tanto una menor resistencia a la infección.

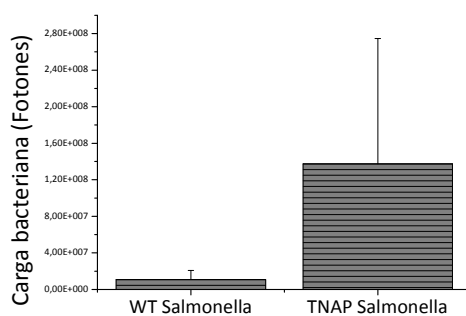


Figura 88. Carga bacteriana determinada por el sistema IVIS®, cuatro días después de la infección con *S.Typhimurium* en los grupos WT *Salmonella* ($n=3$) y TNAP *Salmonella* ($n=3$). Resultados expresados como media \pm EEM.

3. Importancia de la TNAP en la mucositis gastrointestinal

3.1. Importancia de la TNAP en la mucositis inducida por 5-FU

La administración intraperitoneal diaria de 5-FU provocó una mucositis gastrointestinal moderada, como se puede observar en la pérdida de peso en ambos grupos (WT-5FU, n=12 y TNAP-5FU, n=6) que fue de un 10-12% el día 5 y aunque no fue significativa, esta pérdida fue mayor en el grupo WT-5FU. Así mismo contamos con dos grupos control (WT, n=8 y TNAP, n=4) (Figura 89).

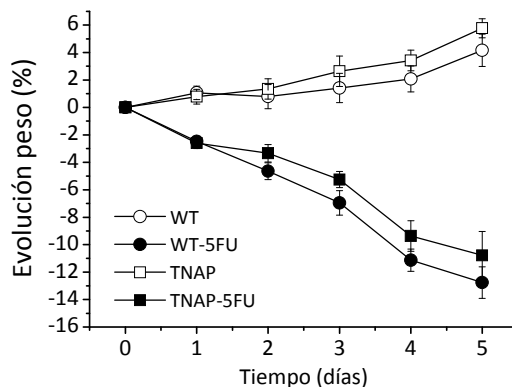


Figura 89. Evolución del peso corporal en los grupos control (WT, n=8 y TNAP, n=4) así como en los grupos enfermos (WT-5FU, n=12 y TNAP-5FU, n=6). Datos expresados como media±EEM.

Se determinó la actividad AP en todos los segmentos intestinales, encontrándose en todos los casos de mucositis aumentada, y este incremento fue mayor en el grupo WT-5FU en colon, aunque en íleon el grupo TNAP-5FU fue el que más incrementó, además este incremento estuvo asociado a un incremento a la sensibilidad a levamisol (Figura 90). Por lo que la AP también puede utilizarse como marcador de inflamación en la mucositis gastrointestinal. Sin embargo no se observó incremento en la actividad MPO determinada en todos los segmentos intestinales, este parámetro no se incrementa en este modelo (datos no mostrados), sin embargo si se incrementó el S100A8 en íleon, determinado mediante qRT-PCR (Figura 91).

Mediante citometría se hizo un *screening* de poblaciones celulares sanguíneas. Tras la inducción de la mucositis se incrementaron las poblaciones linfocitarias, los linfocitos T CD8+ del grupo TNAP-5FU lo hicieron significativamente con respecto a los WT-5FU. Así mismo la población de neutrófilos estaba aumentada en la mucositis, aunque en menor medida en el grupo TNAP-5FU (Figura 92).

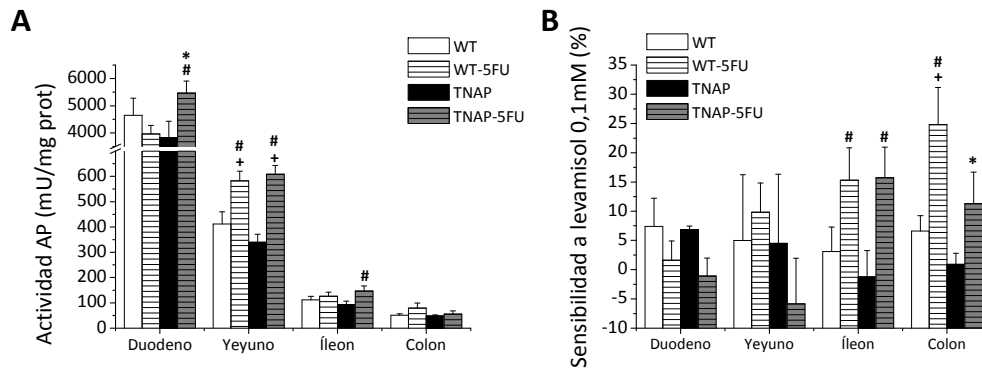


Figura 90. Actividades AP intestinales. **A.** Actividad AP en los diferentes segmentos intestinales (duodeno, yeyuno, íleon y colon) expresada en mU/mg proteína. **B.** Sensibilidad a levamisol 0,1mM en duodeno, yeyuno, íleon y colon, expresada en porcentaje. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6) y grupos con mucositis WT-5FU (n=6) y TNAP-5FU (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-5FU); # p<0,05 (vs. TNAP).

Figura 91. Expresión de S100A8 en íleon determinado por RT-PCR. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6) y grupos con mucositis WT-5FU (n=6) y TNAP-5FU (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-5FU); # p<0,05 (vs. TNAP).

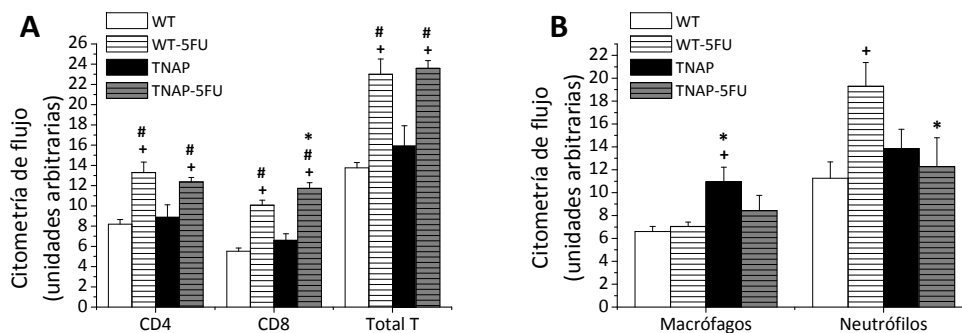
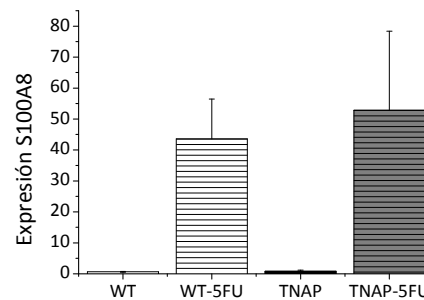


Figura 92. Poblaciones celulares sanguíneas. **A.** Linfocitos T CD4, CD8 y totales determinados por citometría de flujo. **B.** Neutrófilos y macrófagos determinados por citometría de flujo. Datos expresados como media±EEM. Grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6) y grupos con mucositis WT-5FU (n=6) y TNAP-5FU (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-5FU); # p<0,05 (vs. TNAP).

Se cultivaron células aisladas de los ganglios linfáticos mesentéricos (CGLM) y se cultivaron con Con A. La adición de Con A provoca la estimulación de los linfocitos T presentes en las CGLM, lo que permite el estudio de esta población. La producción de citoquinas de las CGLM determinada por ELISA dio lugar a una mayor producción de IFN- γ e IL-10 tanto en el grupo control TNAP como en el grupo con mucositis (TNAP-5FU) (Figura 93).

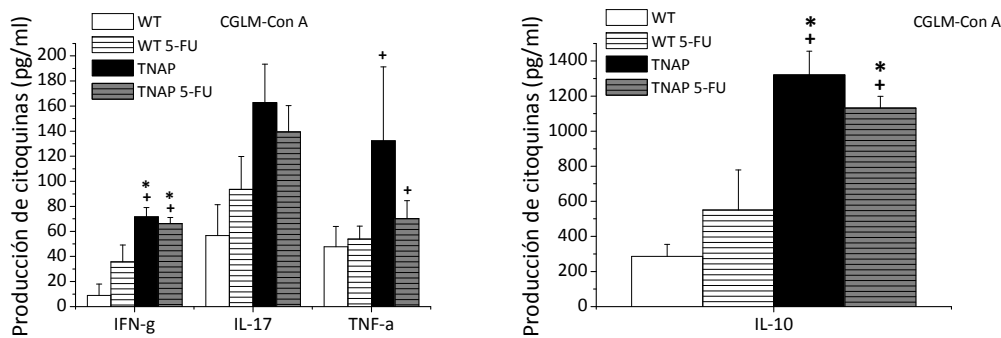


Figura 93. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-10 (A) e IFN- γ (B), por las CGLM estimuladas con Con A expresada en pg/ml. Datos expresados como media \pm EEM. Grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6) y grupos con mucositis WT-5FU (n=6) y TNAP-5FU (n=6). + p<0,05 (vs. WT); * p<0,05 (vs. WT-5FU); # p<0,05 (vs. TNAP).

También se cultivaron explantes colónicos sin estimular y estimulados con LPS. La adición de LPS es capaz de estimular a los macrófagos, lo que permite el estudio de esta población. La producción de IL-6 por los explantes colónicos sin estimular y estimulados con LPS fue mayor en los animales con mucositis en estado basal, y la producción de ésta incrementó has 6 veces en el grupo TNAP-5FU (Figura 94).

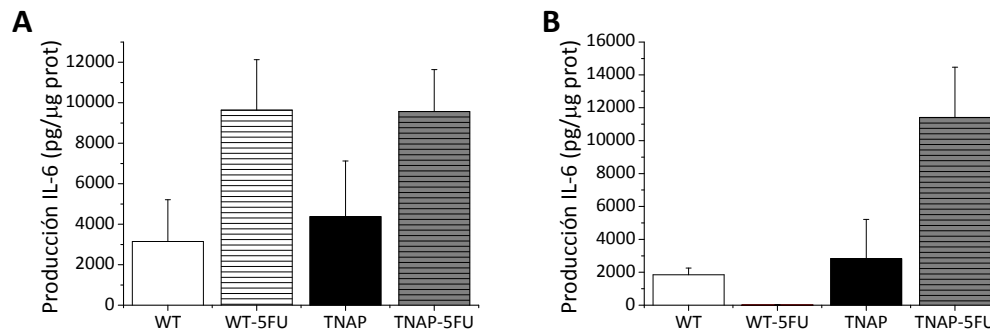


Figura 94. Producción de IL-6 en explantes colónicos sin estimular (**A**) y estimulados con LPS (**B**) expresada en pg/ μ g proteína. Datos expresados como media \pm EEM. Grupos control: WT (n=4) y TNAP (n=6) y grupos con mucositis WT-5FU (n=6) y TNAP-5FU (n=6). + $p < 0,05$ (vs. WT); * $p < 0,05$ (vs. WT-5FU); # $p < 0,05$ (vs. TNAP).

DISCUSIÓN

La fosfatasa alcalina es una enzima “clásica”, conocida desde antiguo a nivel puramente bioquímico, pero también clínico. Por ejemplo, la determinación de los niveles plasmáticos para la detección de colestasis es harto conocida, así como su presencia en múltiples tejidos y tipos celulares, que de hecho le confieren un carácter prácticamente ubicuo. Además, la AP es una enzima muy antigua desde el punto de vista filogenético, puesto que está presente no sólo en el hombre, sino en mamíferos, vertebrados e incluso bacterias [1]. Resulta sorprendente, por tanto, que hasta hace pocos años no se supiera prácticamente nada sobre la función desempeñada por esta enzima. Pero fue con el desarrollo de modelos de silenciamiento genético en ratones cuando se obtuvieron algunas respuestas definitivas a esta cuestión largo tiempo planteada. La primera isoforma de la que se consiguió obtener ratones silenciados (*knockout*) fue la TNAP. Dos grupos de investigación generaron de forma independiente estos. Los resultados fueron en general muy similares [30, 964]. Los ratones homocigotos (TNAP^{-/-}) eran viables y aparentemente normales, pero pocos días después de nacer presentaban problemas de crecimiento, ataques neurológicos, apnea, acumulación de gas en el intestino (considerado un signo de alteraciones en la motilidad) y finalmente una muerte temprana. Los ataques fueron relacionados con malformaciones en el sistema nervioso y también con un déficit en la biosíntesis de GABA (neurotransmisor inhibitorio), secundario a una escasa captación celular de piridoxina [30, 964-966]. De hecho, los ratones mejoran su estado y viven más tiempo si se aporta un suplemento de piridoxal. Ambos modelos difirieron en su capacidad de respuesta a este tratamiento, por razones desconocidas, pero en ninguno de los casos se consiguió normalizar la supervivencia y el estado de salud. Una de las consecuencias de la delección de TNAP son las malformaciones óseas, relacionadas con la acumulación de pirofosfato. En este sentido, los ratones TNAP^{-/-} presentan grandes similitudes con la hipofosfatasa infantil humana, en la que también hay niveles muy bajos de esta enzima. El PPI es un inhibidor de la deposición de hidroxapatito cálcico, responsable de la mineralización de la matriz ósea, y la AP (TNAP) está implicada en la contención de sus niveles en el hueso. Por el contrario, el PPI inhibe la calcificación en otras regiones, como el vaso sanguíneo. La función de TNAP en el hueso, osteoblastos y osteoclastos parece por tanto bastante clara. En este sentido, los osteoblastos y osteoclastos TNAP^{-/-} y TNAP^{+/-} presentan un fenotipo indistinguible de los TNAP^{+/+} excepto obviamente por la capacidad de producir la enzima, lo que se traduce en una menor capacidad de mineralización *in vitro* [967]. Hasta donde sabemos, no se han descrito otras anomalías en ratones TNAP^{-/-} o TNAP^{+/-}.

Posteriormente se desarrolló el ratón con delección genética de IAP. A diferencia del anterior modelo, los ratones IAP^{-/-} son esencialmente normales, y la única peculiaridad descrita inicialmente era una mayor tendencia a engordar al recibir dietas enriquecidas en grasa [131, 968]. Este hecho fue interpretado como indicio de que la IAP estaba implicada en la absorción de lípidos, pero recientemente se ha relacionado también con una menor absorción de LPS [969] y con protección frente al síndrome metabólico [969]. Posteriormente, el grupo de Richard Hodin demostró que estos ratones presentaban una mayor susceptibilidad al daño intestinal y no intestinal inducido por isquemia-reperfusión [138]. La protección conferida por la IAP se relacionó prontamente con la capacidad de la IAP para desfosforilar, y por tanto desactivar, el LPS bacteriano, y posteriormente se identificaron otros sustratos relevantes, incluyendo flagelina, CpG DNA y uridina difosfato [970, 971]. El grupo de Tuin, Poelstra, et al. mostró a continuación que estos ratones eran más susceptibles también a la inflamación inducida por DSS [146]. Más aún, aportaron datos en muestras intestinales humanas que mostraban un menor nivel de expresión (ARNm) de IAP en enfermos de Crohn y colitis ulcerosa. Como se verá posteriormente, esta disminución es específica de esta isoforma, de forma que la TNAP y la propia actividad enzimática AP están de hecho aumentadas.

Además de la TNAP y la IAP, la forma embrionaria [30] ha sido también silenciada genéticamente, sin haberse detectado efecto alguno a nivel embrionario o postembrionario, lo que indica que la enzima es prescindible o que puede ser sustituida eficazmente por otra isoforma.

Así pues, la TNAP parece estar relacionada principalmente con la homeostasis ósea y secundariamente con funciones neurológicas, mientras que la IAP ejerce preferentemente un papel protector frente a componentes bacterianos en la mucosa intestinal, con implicaciones metabólicas [969, 972]. La IAP no se expresa únicamente en el intestino, pero sí existe una clara predominancia del tubo digestivo. Se desconoce sin embargo qué función puede desarrollar la TNAP en el riñón y en el hígado, así como en los neutrófilos y otros múltiples tipos celulares que la expresan. El colon es uno de los órganos que expresan predominantemente TNAP, aunque el nivel de actividad es relativamente bajo. Dado que la IAP puede neutralizar componentes bacterianos gracias a su actividad enzimática genérica [114], es lógico inferir que la TNAP puede, siquiera potencialmente, ejercer una función similar en el propio intestino, en hígado y en colon, así como en leucocitos a nivel celular, expuestos también de forma natural a estas moléculas. Nuestros datos indican que en el ratón la IAP se expresa también en el intestino grueso, concretamente en las células caliciformes, en contraste con la TNAP, que se expresa tanto en el epitelio como en leucocitos de la lámina propia. Debido a la mermada viabilidad de los ratones

TNAP^{-/-}, las consecuencias de la delección genética en la actividad AP tisular se ha estudiado en los ratones heterocigóticos TNAP^{+/-} en esta Tesis Doctoral. Es importante recordar que estos ratones muestran un comportamiento y fenotipo indistinguible en principio del de los ratones WT, excepto lógicamente en cuanto a la propia expresión de la enzima [30]. Concretamente, los artículos originales muestran un descenso de aproximadamente el 50% en la actividad AP presente en plasma, riñón, y hueso. Por tanto, iniciamos una serie de estudios con esta línea genética, mantenida localmente.

A diferencia de los estudios originales, únicamente el riñón mostró un descenso marcado de actividad AP, que fue efectivamente del 50% aproximadamente. Por el contrario, no se apreciaron cambios en la actividad enzimática del hueso. En ambos tejidos se produjo una disminución pequeña, pero significativa, de la sensibilidad al levamisol *in vitro*, lo que no concuerda con el mantenimiento de la isoforma ósea (BAP) o renal (KAP). Como se esperaba, la actividad AP más acusada se observó en duodeno y yeyuno, sin cambios apreciables en ratones TNAP^{+/-}. En el colon se observó una disminución pequeña de la actividad AP, asociada en este caso a un descenso considerable de la sensibilidad a levamisol. En este sentido, es interesante considerar que en ratas y ratones la actividad AP colónica normal es poco sensible a levamisol, así como a la homoarginina y al calor, y además presenta inmunoreactividad frente a anticuerpos anti-TNAP. Por tanto, es razonable considerar que el colon normal (no inflamado) expresa fundamentalmente LAP, con niveles variables de BAP o KAP, ya que ambas presentan una sensibilidad mucho mayor. Esta cantidad variable de BAP/KAP permite justificar las oscilaciones de sensibilidad a levamisol que se producen en este tejido en animales en condiciones basales. Como se discute más adelante, en la inflamación se produce un cambio de expresión de LAP a BAP/KAP responsable en gran medida del incremento de la actividad enzimática. Teniendo en cuenta esta consideración, los ratones TNAP^{+/-} sin embargo, deberían presentar una actividad reducida en torno al 50%, sin cambios en la sensibilidad al levamisol, si la ausencia de uno de los alelos *Tnap* no afecta a este equilibrio. Por lo tanto, nuestros datos indican que se produce relativamente más cantidad de TNAP del tipo hepático, disminuyendo la abundancia relativa de BAP/KAP, o bien que la contribución de la IAP es mayor. Esta última posibilidad se ve reforzada por la observación de mayores niveles de expresión de IAP en colon por Western blot e inmunohistoquímica. Sin embargo, los cambios registrados en riñón y hueso sugieren que se produce efectivamente una alteración de la isoforma TNAP como consecuencia de la presencia de un único alelo. Teniendo en cuenta que tanto en hígado como en riñón sólo se expresan las isoformas hepática y

renal respectivamente, el cambio de sensibilidad indicaría que la falta de un alelo produce cambios postranscripcionales que alteran la estructura.

Nuestros resultados indican que en los ratones TNAP^{+/-} se producen cambios significativos en el fenotipo de esplenocitos, linfocitos de ganglios mesentéricos, e incluso en explantes colónicos ex vivo. La diferencia más notable es posiblemente el aumento de secreción de IL-6 en tejido colónico, pero se observa asimismo un descenso de IFN- γ y un aumento de IL-10 en linfocitos de ganglios mesentéricos y otros cambios de menor magnitud. Aunque nuestros datos no permiten aventurar una posible explicación mecanística, sí dan pie a afirmar que los linfocitos TNAP^{+/-} muestran un comportamiento anómalo en cuanto a la secreción de citoquinas. De hecho, los linfocitos naive TNAP^{+/-} presentan un mayor potencial colitogénico que los WT, lo que presumiblemente está relacionado con el perfil de secreción de citoquinas. Sin embargo, la conexión mecanística no está clara. Actualmente nuestro grupo está estudiando activamente esta línea. Por otra parte, los ratones heterocigotos presentan cambios apreciables aunque no consistentes en los niveles sanguíneos de monocitos.

A diferencia de los ratones IAP^{-/-} [973], los ratones TNAP^{+/-} son claramente menos susceptibles a la inducción de colitis por DSS, tanto en el protocolo agudo como el crónico, así como por TNBS. Este fenómeno fue muy consistente y claro, por lo que consideramos que los datos son plenamente representativos. La utilización de distintos modelos de inflamación en este estudio obedece a la necesidad de superar las limitaciones que tiene cada uno de ellos. Efectivamente, no existe un modelo animal ideal de IBD, lo que ha dado lugar en los últimos 20-30 años a una variedad considerable de alternativas [948, 974].

La interpretación inmediata de estos resultados es que la TNAP colónica ejerce un papel perjudicial en la inflamación intestinal. Sin embargo, en los distintos modelos animales de colitis que hemos utilizado (modelo de administración de DSS agudo, de DSS crónico y de TNBS) no hay una relación clara entre la ausencia de TNAP, la actividad AP y la gravedad de la inflamación. De hecho, aunque en el modelo de agudo de colitis inducida por administración de DSS sí hay una relación entre actividad AP y una menor inflamación, éste no es el caso del modelo crónico o del modelo del TNBS. Es posible que la clave esté relacionada con la mayor expresión de IAP en el colon de los ratones TNAP^{+/-}. Ésta se localiza en las células caliciformes en el intestino grueso, y la colitis suele asociarse a una depleción generalizada de moco, por lo que la IAP podría verse al lumen colónico arrastrado con la secreción de mucinas, por lo que estos animales podrían estar *a priori* protegidos frente a la colitis gracias a una mayor expresión de IAP. Es necesario resaltar que no existen cambios apreciables en la actividad AP de

intestino delgado, por lo que la posible protección debe de ser de origen colónico.

En estudios realizados previamente por nosotros, podrían reforzar el papel perjudicial de la TNAP en la colitis, dado que tanto el levamisol como el anticuerpo B4-78 presentaron cierto efecto beneficioso en la colitis por TNBS en ratas [47]. Sin embargo, estos resultados no son en realidad totalmente compatibles con esta hipótesis ya que el levamisol tiene propiedades inmunomoduladoras reconocidas que podrían justificar dicho efecto independientemente de su acción sobre la AP, mientras que el B4-78 no tiene capacidad bloqueante de la enzima (resultados no mostrados), por lo que su efecto puede achacarse a una acción citotóxica mediada por anticuerpo en neutrófilos u otros leucocitos.

Alternativamente, la explicación a la menor inflamación observada en los animales TNAP^{+/-} puede residir en las diferencias observadas en la respuesta inmunológica. Así, la mayor producción de IL-10 y menor liberación de IFN- γ por parte de los linfocitos aislados de ganglios mesentéricos puede reflejar una menor respuesta linfocitaria a nivel de la mucosa, lo que se traduciría en una menor intensidad de la colitis. Por otra parte, la mayor producción de IL-6 en el tejido colónico puede interpretarse en sentido contrario, esto es, como indicador de una mayor respuesta de defensa. Ambos mecanismos pueden atenuar la gravedad de la colitis, dependiendo de las células afectadas, de la secuencia temporal, etc. Aunque en principio un aumento de IL-6 debería traducirse en una potenciación de la respuesta inmunológica, el efecto global puede depender de las circunstancias en el intestino. La razón es que existe una acción directa proinflamatoria de mediadores como la IL-6, TNF, IL-1 β y otras, pero al mismo tiempo el reforzamiento de la defensa inmunológica a nivel de la mucosa intestinal tiende a potenciar su función natural de barrera. En consecuencia, mejora el control de los microorganismos y antígenos procedentes del lumen y puede prevenirse la necesidad de una respuesta inmunológica mayor, más agresiva. Puede establecerse un paralelismo con la actuación de la policía y el ejército: éste es más eficaz pero también más dañino, y una actuación solvente de la primera puede hacer innecesario el toque de queda. Existen numerosos estudios que apoyan esta hipótesis. Posiblemente los más sobresalientes sean los relacionados con el poliformismo del gen NOD2, uno de los primeros vinculados con el riesgo de padecer IBD [232]. Aunque inicialmente las variantes relacionadas positivamente con el riesgo parecían incrementar la señalización por NF- κ B, posteriormente se ha podido comprobar que la realidad es la contraria, es decir, las células que expresan estas variantes exhiben una menor respuesta proinflamatoria (pese a lo cual están correlacionadas obviamente con la inflamación intestinal idiopática). El grupo de Markus Neurath publicó hace

pocos años un estudio muy revelador en el que ratones que presentan expresión epitelial inducible de NEMO, también llamado IKK- γ , proteína reguladora del complejo IKK que fosforila $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ y activa por tanto la vía NF- κB [672]. La represión de NEMO se traducía en una reacción inflamatoria intensa del colon. La reacción inflamatoria aguda en roedores y en el hombre está caracterizada por la infiltración intensa de neutrófilos, cuyo papel primario es la defensa frente a microorganismos pero que también participan en el daño tisular consustancial a la inflamación. Sin embargo, la depleción de neutrófilos da lugar no a una disminución sino a un incremento de la respuesta inflamatoria. Resultados similares se obtienen con ratones con delección genética de GM-CSF, los cuales son más susceptibles a la colitis experimental. El propio GM-CSF (sargramostina) tiene efectos antiinflamatorios intestinales en ratones y ha mostrado resultados en humanos. Considerados globalmente, estos estudios apoyan firmemente la hipótesis de que la función de barrera ejerce un papel central en la homeostasis intestinal, de forma que la respuesta inflamatoria puede estar modulada de forma no convencional por su funcionamiento.

En este sentido, es posible que el fenotipo manifestado por los linfocitos TNAP^{+/-} esté relacionado con un reforzamiento inmunológico de esta función de barrera. Consideramos necesario realizar más experimentos para dilucidar la respuesta (ver apartado III del capítulo Resultados).

Otro factor a considerar es la posibilidad de que la TNAP desempeñe papeles sustancialmente distintos en neutrófilos/linfocitos y en enterocitos. La pérdida de uno de los alelos *Alpl* podría traducirse en una mayor respuesta inmunológica en los primeros, mientras que en las células epiteliales cabría esperar una menor defensa frente a LPS. En este caso predominaría la primera acción *in vivo*, dando lugar a una menor susceptibilidad a la colitis. La potenciación de la respuesta inmunológica no justifica por otra parte la mayor infección producida por *C. rodentium* y *Salmonella*. *C. rodentium* no es enteroinvasivo [975], por lo que la interacción primaria en este caso es con el epitelio intestinal. En la inflamación intestinal por DSS, y en menor medida por TNBS, se produce una erosión importante de la capa epitelial. Es importante destacar al respecto que la respuesta inmunológica en ambos modelos infecciosos era indistinguible en ratones TNAP^{+/-} y WT, mientras que sí hay diferencias significativas en los modelos de colitis, lo que sugiere que la inmunomodulación debida a la delección genética de TNAP puede tener más importancia en un caso que en otro. Es tentador por tanto especular con la posibilidad de que la defensa epitelial tiene un mayor peso en los modelos infecciosos, si bien no tenemos datos que apoyen esta hipótesis de forma directa.

Nuestros datos demuestran que la colitis experimental en ratas se acompaña de un incremento en los niveles de TNAP y actividad AP, pero no IAP, en las heces. Nuestro interés en la actividad AP luminal surge de dos consideraciones: en primer lugar, la IAP endógena protege frente a la colitis, según se deduce de los experimentos con animales IAP^{-/-} [973], pero como la IAP se encuentra fundamentalmente en intestino delgado, debería ser secretada de algún modo al lumen para poder llegar al colon y ejercer ahí su acción protectora en la colitis. En segundo lugar, nuestros estudios iniciales mostraron una mayor expresión y liberación de TNAP a nivel epitelial, lo que, unido al hecho de que los enterocitos se descaman hacia el lumen tanto en condiciones de inflamación como normales, sugiere que parte de esta enzima puede transferirse al lumen y presumiblemente ejercer su labor protectora localmente. De hecho, los datos recogidos en la presente Tesis Doctoral demuestran que la TNAP se induce en enterocitos como parte de la reacción al estrés celular (fundamentalmente oxidativo), lo que sugiere que la inducción de la enzima puede formar parte de un programa de “suicidio altruista”, a través del cual las células se cargan de AP al sucumbir al estrés celular.

La inducción de la actividad AP en enterocitos en condiciones de inflamación había sido apuntada ya en un estudio de nuestro grupo de investigación [47] en el que las células epiteliales quedaban marcadas por el anticuerpo B4-78 y presentaban una mayor sensibilidad a levamisol y homoarginina ex vivo. El incremento de actividad AP en el colon inflamado no se debe únicamente desde luego a este fenómeno, ya que la infiltración leucocitaria, y notablemente la de los neutrófilos, contribuye significativamente a aumentar la presencia de la enzima en el tejido intestinal. Sin embargo, se cree que los neutrófilos no experimentan cambios en la expresión de la enzima, de forma que este incremento se debe únicamente al acúmulo de leucocitos, mientras que en el caso de los enterocitos se produce un cambio de expresión, el cual hemos podido caracterizar en detalle in vitro.

Dado que la inflamación es una respuesta multicelular compleja que no puede ser reproducida in vitro más que de forma parcial e incompleta, optamos por estudiar inicialmente el efecto del estrés oxidativo en distintas líneas celulares. El uso de células inmortalizadas es inevitable en este caso porque la viabilidad de los enterocitos/colonocitos ex vivo es muy limitada. No obstante, al igual que ocurre en las células epiteliales aisladas de ratas con colitis por TNBS, 3 agentes oxidativos diferentes produjeron efectos inductores de actividad AP en líneas celulares tanto murinas como humanas, lo que apuntaba a que el estrés oxidativo reproduce el efecto de la inflamación a este nivel. De las líneas celulares que mostraban este comportamiento seleccionamos las células IEC18 para caracterizar la

respuesta, fundamentalmente por su carácter no tumoral; la AP ha sido considerada un marcador de diferenciación, al menos en intestino delgado, y las posibles consecuencias de utilizar células cancerosas son claras. Es preciso recordar no obstante que esta línea celular está transformada, como ocurre con virtualmente todas las células inmortalizadas.

Nuestros resultados indican que estas células expresan de forma basal una AP del tipo no específica de tejido que, por su baja sensibilidad a levamisol, calor y homoarginina corresponde a la isoforma hepática, análogamente a lo que se registra in vivo en el colon de rata. En condiciones de estrés oxidativo aumenta la inmunoreactividad TNAP y la sensibilidad térmica y química de la enzima, con cambios documentados en el patrón de glicosilación. Por tanto, las células IEC18 pasan a expresar AP del tipo óseo o renal. Como las tres isoformas del tipo TNAP proceden del mismo gen y comparten la secuencia de aminoácidos, este cambio representa exclusivamente un cambio en el patrón de glicosilación. De hecho, el nivel de mRNA no cambia y ni la actinomicina D ni la cicloheximida tienen un efecto inhibitorio de la inducción de AP. La glicosilación de proteínas tiene lugar de forma simultánea a la traducción, pero también existe un proceso de maduración más o menos complejo en función de la proteína considerada. Por tanto, lo más probable es que el cambio de isoforma sí esté asociado a la síntesis proteica, pero que el estrés celular ocasionado por el bloqueo de la transcripción o la traducción module el patrón en el mismo sentido que los agentes oxidantes. Alternativamente, es posible que la LAP madura pueda verse alterada a posteriori de forma que reproduzca el patrón de la BAP/KAP o genere otro compatible con sus características bioquímicas. Por el momento sólo podemos especular sobre el mecanismo concreto. Sea éste cual fuere, sin embargo, es claro que está vinculado a una pérdida de viabilidad celular. De hecho, el desoxicolato sódico y la saponina incrementan la AP asimismo al tiempo que producen citotoxicidad.

Esta modulación de la TNAP en enterocitos no se induce por una amplia variedad de agentes que alteran mecanismos de transducción de señal: cAMP, Ca, tirosín kinasas, etc. Sin embargo el butirato sí produjo un efecto reproducible, no tóxico pero presumiblemente asociado a apoptosis.

A pesar de que en la ileítis por TNBS se induce también la AP, no hemos estudiado si los enterocitos ileales experimentan cambios similares a los observados en el epitelio colónico, o si la IAP, que es expresada fundamentalmente por este tipo celular, se ve afectada por el estrés oxidativo o la inflamación en general. Sin embargo, los datos aportados por Tuin et al. sugieren que el RNAm la IAP tiende más bien a disminuir en muestras de IBD humana [146], aunque se ha descrito que la actividad AP sí está incrementada en la colitis en humanos. En nuestro análisis genómico del

modelo de colitis por TNBS en ratas la IAP tampoco cambiaba sustancialmente, en tanto que la TNAP estaba claramente aumentada. Este incremento de mRNA de TNAP se debe exclusivamente a la aportación de los leucocitos, no de los enterocitos, ya que el cambio de isoforma es en este caso esencialmente no transcripcional, y el mRNA no varía [976]. De acuerdo con este principio, en un estudio genómico realizado en colonocitos aislados de ratas con colitis por TNBS tampoco hubo cambios en el mRNA de Alpl (correspondiente a TNAP, datos no publicados). Por tanto, la evidencia disponible no sugiere que se produzca una inducción de IAP en el intestino inflamado, sino que por el contrario podría disminuir la expresión. Esta circunstancia invita a pensar que la mayor expresión colónica de TNAP en el colon podría suplir esta relativa falta de IAP en la inflamación. De hecho, en el modelo de colitis por TNBS la actividad AP en las heces, y por tanto presumiblemente en el lumen colónico, aumenta de forma paralela a la inflamación debido a la presencia de TNAP, mientras que la IAP permanece relativamente constante. La evidencia disponible no permite identificar la fuente celular de esta TNAP, pero es razonable suponer que tanto enterocitos como neutrófilos y tal vez otros leucocitos pueden contribuir.

Algunas de las cuestiones que quedan abiertas podrán contestarse mediante la utilización del modelo de colitis por transferencia linfocitaria utilizando de forma cruzada ratones TNAP^{+/-} como donantes o como receptores.

Así pues, es posible que tanto la IAP como la TNAP ejerzan efectos protectores en el intestino delgado y colon sobre la inflamación. Como se ha indicado, la IAP fue identificada inicialmente como factor protector frente a la inflamación secundaria a la isquemia-reperfusión, en función de su capacidad inactivadora del LPS y otros productos bacterianos [138, 971]. De hecho, la IAP es un factor modulador de la propia microbiota intestinal [973]. De ahí al estudio de la enzima como fármaco antiinflamatorio intestinal media sólo un paso. Nuestro grupo de investigación abordó la persecución de este objetivo en el contexto de la presente Tesis Doctoral, aun asumiendo que otros grupos desarrollarían posiblemente experimentos similares, como de hecho ocurrió [146, 977]. Por razones de disponibilidad utilizamos inicialmente IAP, cuyos resultados discutiremos a continuación. Posteriormente realizamos un ensayo con TNAP pero que resultó fallido.

Nuestro estudio presenta como rasgos diferenciales frente a los otros la utilización de dos vías distintas, oral (gastroesofágica) e intrarrectal, y el estudio de la translocación bacteriana mediante la determinación de DNA 16 S en hígado, además de la comparación con un grupo de referencia tratado con el corticoide budesonida. Nuestros resultados confirman la actividad antiinflamatoria intestinal de la IAP e indican que la vía intrarrectal

es más eficaz, lo que es coherente con la destrucción parcial de la enzima en el estómago. Es importante constatar que, a diferencia de la budesonida, la IAP reduce la translocación bacteriana, lo que sugiere una acción luminal frente a la microbiota. La IAP también ejerce efectos protectores en la peritonitis experimental en ratones cuando se administra de forma local, lo que se considera una acción del mismo tipo [978]. La expresión de MHC-II en el hígado de ratones IAP^{-/-} está asimismo aumentada, lo que es coherente con una mayor exposición a LPS/bacterias [972]. Curiosamente sin embargo los ratones con delección genética de IAP son menos susceptibles a la infección por *Salmonella typhimurium*, mostrando un mejor estado global y menor translocación bacteriana [972]. En este mismo estudio se determinó la respuesta al LPS in vivo, que paradójicamente fue más acusada en los ratones WT, mientras que la respuesta in vitro (en sangre periférica) fue la contraria. Por tanto, el papel de la IAP es más complejo de lo que cabría pensar. La IAP exógena por el contrario ejerce efectos positivos en todos los estudios realizados hasta la fecha, incluyendo el de nuestro grupo de investigación en colitis por TNBS en ratas [953], el de Tuin et al. utilizando el modelo de colitis por DSS en ratas [146], y ensayos en el mismo modelo en ratones, así como en colitis espontánea en ratones deficientes en la proteína del síndrome Wiskott–Aldrich [977]. La enzima se ha ensayado de forma preliminar en humanos por vía intraduodenal, en un estudio realizado con 21 pacientes de CU [979]. No se detectaron efectos adversos de consideración y se observó un cierto beneficio en términos de reducción a corto plazo del índice de actividad de la enfermedad, proteína C reactiva plasmática y calprotectina fecal.

Aunque se trata de resultados aún preliminares, hemos considerado adecuado incluir en esta tesis los datos obtenidos con el modelo de transferencia linfocitaria, así como con los modelos de infección con *C. rodentium* y *S. typhimurium*. En el primer caso el protocolo seguido ha sido la utilización de linfocitos CD4⁺ CD25⁻ procedentes de ratones TNAP^{+/-} como donantes, comparados con linfocitos equivalentes obtenidos de ratones WT. Ambas poblaciones linfocitarias mostraron un potencial colitogénico sustancial, a tenor de los resultados obtenidos, pero la intensidad de la colitis tiende a ser menor con los linfocitos TNAP^{+/-}. Curiosamente esta observación se asoció a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias en el colon (explantes colónicos), pero no en linfocitos de ganglios mesentéricos. Este resultado es muy significativo por el hecho de que en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria la inflamación intestinal es el resultado de la expansión de la población linfocitaria donante con predominio de los linfocitos colaboradores/efectores frente a los reguladores. La inflamación se manifiesta primariamente en el intestino como consecuencia de la presencia de la microbiota, de forma que la colitis es el resultado de la reacción

inmunológica mediada por linfocitos frente a dicha microbiota. Como se ha comentado anteriormente, los ratones TNAP^{+/-} presentan un fenotipo inmunológicamente complejo; los esplenocitos, que incluyen los linfocitos que se utilizan como fuente de células para la transferencia, presentan diferencias sutiles en cuanto a secreción de citoquinas con respecto a la población WT. Los linfocitos obtenidos de ganglios mesentéricos, una población más homogénea, presenta como características diferenciales en los ratones heterocigotos una menor producción de IFN- γ y una mayor liberación de IL-10. Es probable que los linfocitos transferidos estén sesgados hacia un fenotipo menos proinflamatorio, y en este sentido es clara la necesidad de determinar su fenotipo pre-transferencia in vitro. Sin embargo, es muy revelador que la mucosa colónica de los ratones con colitis presente una mayor producción de IL-6, exactamente igual que ocurre en los ratones donantes de forma espontánea. Por tanto, consideramos prematuro aventurar una hipótesis mecanística, aunque es perfectamente posible que la respuesta inflamatoria se reduzca como consecuencia de una mejor contención de la microbiota y sus componentes, como se ha explicado anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, la contrapartida a este experimento es la inducción de colitis por transferencia de linfocitos WT a ratones TNAP^{+/-}, mediante la irradiación de ratones receptores, técnica en funcionamiento en el CIC de la UGR. Este experimento permitirá aportar información relevante para dilucidar el papel de la TNAP epitelial, así como de otras células que expresan la enzima. Será necesario igualmente identificar el grado de afectación de IECs, neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos por la delección parcial de *Alpl*, tanto en su funcionamiento normal como en lo que se refiere a la propia expresión enzimática de AP, que hasta el momento no hemos tenido ocasión de estudiar en profundidad. En concreto, desconocemos el mecanismo que vincula la presumible alteración de la expresión de AP y el cambio en la expresión de citoquinas. Además, es preciso verificar posibles efectos relacionados, como cambios en la viabilidad celular, capacidad fagocítica, etc. Dada la presencia predominante de IAP en células caliciformes en el colon, parece interesante estudiar su papel también. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos de silenciamiento génico de IAP y TNAP en líneas celulares intestinales, así como experimentos de expresión génica (*microarrays*) en células Caco-2 tratadas con ambas isoformas de AP.

En lo que respecta a los dos modelos de infección, los resultados contrastan abiertamente con los obtenidos en los modelos de inflamación, puesto que en este caso los ratones TNAP^{+/-} resultan ser más susceptibles, de forma comparable a lo que se ha observado en ratones IAP^{-/-}. Tanto en los modelos inflamatorios como en la infección por *C. rodentium* se aprecia un menor incremento de la TNAP en el colon, coherente con la delección de uno

de los alelos del gen *Alpl*. Por tanto, la actividad AP global no permite explicar este comportamiento dispar. La explicación más probable es la relacionada con la modulación del sistema inmunológico, pero la complejidad de los datos y la necesidad de realizar más experimentos hace necesario posponer esta cuestión por el momento.

En el modelo de mucositis por 5-FU se observaron diferencias interesantes entre los ratones *TNAP^{+/-}* y sus controles WT. Aunque el estado general de los animales fue similar, el incremento en la actividad AP colónica y su sensibilidad a levamisol no se observó en los ratones heterocigóticos, sugiriendo la implicación de esta isoforma en la respuesta, al igual que ocurre en los modelos de colitis y de infección por *C. rodentium*. Por otra parte, la neutrofilia característica de la mucositis no llega a producirse en los ratones *TNAP^{+/-}*. El mecanismo de la mucositis se ha relacionado tradicionalmente con la alteración de la homeostasis del epitelio intestinal [913], el cual presenta un ritmo elevado de proliferación y recambio, como es conocido. El 5-FU, al igual que otros agentes antiproliferativos, introduciría cambios sustanciales en este equilibrio, lo que redundaría en alteraciones en la permeabilidad epitelial y se traduciría en una respuesta inflamatoria secundaria. Es importante recordar que no se observaron cambios en la producción de citoquinas por MLNC, mientras que nuevamente la producción de IL-6 se incrementó en el tejido colónico.

**CONCLUSIONS/
CONCLUSIONES**

1. TNAP is induced in the intestinal epithelial cells under inflammatory conditions / cellular stress, by a mechanism involving primarily changes in glycosylation pattern, with a minor role, if any, changes in the transcription / translation. / *La TNAP es inducida en células del epitelio intestinal en condiciones de inflamación/estrés celular, por un mecanismo que implica principalmente cambios en el patrón de glucosilación, con un papel menor, si acaso, de variaciones en la transcripción/traducción.*

2. The inflamed colon from various animal models of colitis expresses higher levels of AP, which are due to an increase of renal or bone TNAP, but not of IAP. / *El colon inflamado de distintos modelos animales de colitis expresa mayores niveles de AP, los cuales se deben al incremento de TNAP del tipo renal u oseo, no de IAP.*

3. Experimental colitis in rats increases luminal alkaline phosphatase due to increased TNAP. / *La colitis experimental en ratas aumenta actividad fosfatasa alcalina luminal, debido a un incremento de TNAP.*

4. IAP treatment results in the protection against experimental colitis in rats associated with reduced bacterial translocation. / *El tratamiento con IAP da lugar a la protección frente a la colitis experimental en ratas, asociada a una menor translocación bacteriana.*

5. Genetic deletion of one allele of *Alpl* has significant opposite effects in the response to colitis and infection, decreasing susceptibility to colitis while increasing sensitivity to infection by *S. Typhimurium* and *C. rodentium*. / *La delección genética de un alelo del Alpl tiene importantes efectos en la respuesta a estímulos colitogénicos e infección de carácter opuesto: disminuye la susceptibilidad a la colitis mientras que aumenta la sensibilidad a la infección por S. Typhimurium y C. rodentium.*

SUMMARY

This Thesis is based in the relationship between **alkaline phosphatase** and intestinal inflammation. First of all I will introduce the alkaline phosphatase matter. Mammalian alkaline phosphatases (orthophosphoric monoester phosphohydrolase-alkaline optimum, EC 3.1.3.1, APs) are a family of enzymes that cleave phosphate moieties at alkaline pH. At least four gene loci have been described in humans: the tissue nonspecific or bone/liver/kidney (TNAP), plus the intestinal (IAP), the placental, and the germ cell or placental-like isoforms, which are expressed predominantly in these tissues and thus are tissue specific. All isoforms are glycoproteins that differ in their glucidic residues as well as in their linkage to the protein [3]. The tissue nonspecific gene gives rise to the bone, kidney and liver isoforms, which differ at the messenger RNA (mRNA) level, so that the first exon (exon 1A) of the bone isoform is different from that of the other two isoforms (exon 1B) [7]. However, the three isoforms are identical at the amino acid level because the first exon is untranslated. In addition, there are differences in terms of sensitivity to chemical inhibitors (as levamisole or homoarginine) and heat, which are ascribed to differences in the glycosylation pattern [980]. The placental and intestinal enzymes have an 87-90% similarity at genomic level [981] and generally similar in their sensitivity to chemical inhibitors, displaying only minor differences [982, 983]. AP distribution is ubiquitous among cell types and tissues, but its physiological function is still under study. In the bone AP is thought to mediate phosphate assimilation, since patients lacking this enzyme as well as knockout mice display important skeletal abnormalities [984, 985]. In the intestine, AP is localized to the brush border membrane and has been classically assumed to participate in nutrient absorption. Thus it has been proposed to participate in the intestinal transport of lipids [986] and nucleotides. In fact, IAP knockout mice exhibit increased fat absorption, decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects but no other major alteration [987]. Conversely, TNAP deletion leads to death before weaning. The examination of this animals indicated abnormal bone mineralization and morphological changes in osteoblasts, aberrant development of the lumbar nerve roots, disturbances in intestinal physiology, increased apoptosis in the thymus, and abnormal spleens [30]. Similarly, AP may play a role in the renal transport of phosphate [988]. A possible role in phosphate binding has also been proposed [989].

The small intestine of the adult mouse is thought to express exclusively IAP, although the TNAP is transiently expressed in the fetal stage [990]. On the other hand, the large bowel does express TNAP which is secreted by the colonocytes in surfactant-like particles [145]. This isoform seems to be important in the maintenance and/or function of some intestinal structures [144], but its specific physiological role is unknown. In the last few years AP has drawn attention because of its protective anti-

inflammatory role. Intestinal inflammation has previously been shown to be associated with a marked increase in AP activity in animal models [47, 142] and in humans, as well [145, 990]. This increase appears to arise in part from the influx of neutrophils bearing AP [144] and in part from a change in AP expression at the epithelial level [991]. On the other hand, this increase is coupled to a change in AP isoform at the colonic level. The wide majority of the studies assessing the expression or the defensive role of AP do not take into account the presence of difference APs.

Interestingly, lipopolysaccharide (LPS) has been shown to be a substrate for IAP [114]. Other bacterial components (CpGDNA and flagellin) have been also identified as AP substrates. A recent article indicates that IAP is involved in the maintenance of normal gut microbial homeostasis, and could therefore have a therapeutic potential against disbiosis and pathogenic infections [973]. Furthermore, a protective role has been suggested by the deleterious effect of the AP inhibitor levamisole in rats infected intraperitoneally with *Escherichia coli* [992]. Of note, treatment with specific antibodies directed against the surfactant-like particles seems to be beneficial in experimental colitis; nevertheless recent data indicate a protective role of AP in colitis. In fact, oral administration of IAP ameliorated experimental dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis in mice [146]. Several human studies have also assessed the defensive role of AP. Administration of AP has been associated with short-term improvement in disease activity scores in patients with ulcerative colitis [979].

As we wanted to know the role of AP in intestinal inflammation we decided to study about **inflammatory bowel disease**, bacterial intestinal infection and mucositis. As our research group has a wide experience in the inflammatory bowel disease (IBD) field [47, 697, 950-952, 993-996], we started to investigate about it. IBD which is composed of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a chronic and relapsing condition of the intestine that has a relatively high (and increasing) prevalence in developed countries [189]. Although these two diseases have some characteristics in common, important clinical and genetic differences exist. UC primarily affects the mucosal lining of the colon and rectum, whereas CD usually affects the whole intestinal wall and potentially may extend to any part of gastrointestinal tract [165]. The etiology of both CD and UC still remains largely unclear. However, in recent years, epidemiologic and genetic studies in man and particularly, in IBD-related animal models suggested that a combination of genetic susceptibility factors and altered immune response driven by microbial factors in the enteric environment contributes to the initiation and chronification of these diseases.

The clinical appearance of human IBD is heterogeneous, a fact that is also reflected by the steadily increasing number of transgenic or gene-targeted mouse strains displaying IBD-like intestinal alterations [948, 997, 998]. Chemically induced models of intestinal inflammation are the most commonly used to work about IBD [948]. In this thesis we used some chemically induced IBD models, as acute and chronic colitis induced by the oral administration of dextran sodium sulfate (DSS) and acute colitis induced by intrarectal administration of trinitro benzene sulfonic acid (TNBS), as well as chronic colitis induced by adoptive cell transfer, introducing CD4⁺ CD25⁻ T cells or CD4⁺ CD62L⁺ T cells into immunodeficient mice (SCID or Rag^{-/-}).

The multifactorial mechanisms underlying IBD are emphasized by the large number of host IBD susceptibility genes that have been identified in recent years [999, 1000]. The contributions of the host immune system and the genetic factors that predispose to IBD have been extensively researched and recently reviewed [1001, 1002]. Both the innate and adaptive immune systems contribute to the response to the intestinal microbiota [1003, 1004] and to IBD-like disease manifestations. For example, pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), are involved because they recognize conserved microbial molecules (termed microorganism-associated molecular patterns; MAMPs), and regulatory T cells have an important role in maintaining tolerance and immune homeostasis to prevent chronic inflammation [1005]. As it has been described that IAP can dephosphorylate LPS we wanted to know if TNAP was also involved. As bioluminescent imaging has become a valuable tool for studying **bacterial intestinal infections** in real time in small animal models, we carried on two different experiments of bacterial infection at the University of Nuremberg-Erlangen by using *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) and *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*).

Finally we wanted to assess the implication of alkaline phosphatase in **gastrointestinal mucositis**. Mucositis is defined as inflammatory and/or ulcerative lesions of the oral and/or gastrointestinal tract that can be caused by infectious disease, immune deficiency and medications. One of the major causes of mucositis is high-dose cancer therapy. Thus mucositis is a clinically important and sometimes dose-limiting complication of cancer therapy [909]. Mucositis lesions can be painful, affect nutrition and quality of life, and have a significant economic impact. The pathogenesis of mucositis is multifactorial and complex. Current clinical management of mucositis is largely focused on palliative measures such as pain management, nutritional support and maintenance of good oral hygiene [913]. The model we chose to reproduce gastrointestinal mucositis in vivo was the daily intraperitoneal administration of 5-fluorouracil (5-FU).

The aims of this study were:

1. To characterize the effect of the oxidative stress on AP in intestinal epithelial cell lines in vitro.
2. To study the therapeutic effect of the administration of IAP in experimental colitis in rats.
3. To investigate the role of TNAP in intestinal inflammation: IBD, intestinal infection and mucositis.

Previous studies of our research group demonstrated the upregulation of AP and the mechanisms involved in experimental colitis [47]. In this study, all models of ileal and colonic inflammation examined, which were characterized by significant oxidative stress and neutrophil infiltration, resulted in an increase in alkaline phosphatase activity which was attributable to both epithelial cells and cells of the lamina propria, mainly leukocytes. The increase in alkaline phosphatase sensitivity to the inhibitors levamisole and homoarginine, together with changes in the apparent molecular size and in the sialylation of the enzyme, indicated a change in the isoform expressed. An increase in TNAP expression was observed by Western blotting. Treatment with the bone/kidney alkaline phosphatase inhibitor levamisole or a monoclonal antibody resulted in significant protection from colonic inflammation. Taken together, these results indicate that the kidney isoform is a marker of intestinal inflammation and that it might even constitute a target for pharmacological intervention.

Based on the work previously described, we focused initially on the effects of several oxidative stimuli on AP activity in intestinal epithelial cultured cell lines as IEC18, CACO-2, T84 and HT-29. Basal AP activity was induced in IEC18 cells by tert-butyl hydroperoxide (tButOOH), and it was the TNAP isoform the responsible of this increase as we could test by Northern and Western blot analysis. Oxidative stress (monochloramine, H₂O₂, tButOOH) augmented AP activity and the sensitivity of the enzyme to levamisole, homoarginine, and heat in IEC18 cells. Increased immunoreactivity to TNAP antibodies suggested an isoform shift from liver to either kidney or bone type. This effect occurred without changes at the mRNA level and was sensitive tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation, and neuraminidase digestion. Saponine and deoxycholate, which are non-oxidative agents, produced similar effects to oxidants. Butyrate but not proinflammatory cytokines or LPS could induce a similar effect but without toxicity. We also observed that the AP increase was not prevented by modulators of the mitogen-activated protein kinases (MAPK), nuclear factor

kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), calcium or cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathways, and was actually enhanced by actinomycin D via higher cell stress. So we concluded that oxidative stress causes a distinct increase in enterocyte AP activity together with cell toxicity via changes in the glycosylation of the enzyme that correspond to a shift in isotype within the TNAP paradigm. We speculated that this may have physiological implications for gut defense. This work was published in 2011 [991] it is the first part of the Results Chapter (I. CARACTERIZACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO).

We next tried to assess the therapeutic potential of exogenous IAP and its complementarity with endogenous enzyme protection in the intestine, as had been evidenced before in DSS model. IAP was given by oral or intrarectal route (700 U/Kg day) to TNBS induced colitic Wistar rats, using oral budesonide (1 mg/Kg day) as a reference treatment. Treatment with intrarectal IAP resulted in a 54.5% and 38% lower colonic weight and damage score, respectively, and an almost complete normalization of S100A8, LCN2 and IL-1 β ($p < 0.05$). Oral IAP was less efficacious, while budesonide had a more pronounced effect on most parameters. Both oral and intrarectal IAP counteracted bacterial translocation effectively (78 and 100%, respectively, $p < 0.05$ for the latter), while budesonide failed to exert a positive effect. We also measured AP activity in feces, it was increased in TNBS colitic animals, associated with augmented sensitivity to the inhibitor levamisole, suggesting enhanced luminal release of this enzyme. This was observed in the mouse lymphocyte transfer model of chronic colitis too. In a separate time course study, TNAP was shown to increase 2-3 days after TNBS colitis induction, while DSS was a much weaker inducer of this isoform. We concluded that exogenous IAP exerts beneficial effects on experimental colitis, which includes protection against bacterial translocation. TNAP is shed in higher amounts to the intestinal lumen in experimental colitis, possibly aiding in intestinal protection. This work was published in 2012 [953] and it is the second part of the Results Chapter (II. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL EN RATAS CON COLITIS INDUCIDA POR TNBS).

After this work, we wanted to investigate about the role of the TNAP in the intestinal inflammation. We got some **TNAP heterozygous mice** (C57BL/6: B.6129s7-Akp2tm1Sor/J) from the Jackson Laboratory® and after some breedings we started to work with them. The first thing we did was to try to characterize the strain. First, we took some organs and tissues and we measured AP activity (Figure 36) and their sensitivity to levamisole (Figure 37). We observed that AP was significantly diminished in kidney, an colon ($p = 0,07$) and their sensitivity to levamisole was significantly diminished in

bone and kidney, but it was a tendency in all the intestinal segments (Figures 36 and 37).

After that, we analyzed the blood cell populations, and we found that TNAP mice were having less monocytes/macrophages and also neutrophils (Table 16). We did not observe differences between red blood cells or platelets (Table 16).

By flow cytometer we also determine blood cell populations and we observed a diminished in macrophages too (Figure 39).

In order to know the differences in the production of cytokines in splenocytes, we cultivated them with concanavalin A (Con A) and LPS. The stimulation with Con A let you study the importance of T lymphocytes, and LPS let you know the role of macrophages. Splenocytes stimulated with Con A showed less production of TNF- α , IL-6 and IL-10 in TNAP mice, while the stimulation with LPS showed an increase in the production of IL-6 (Figure 40).

After that we examined the colon of both groups as is the most important organ in the development of this study. We measured the weight, the length and the weight/length relation in colon and we observed that TNAP mice had a smaller colon as the weight was significantly lower than WT mice (Figure 41).

By immunohistochemistry (IHC) we analyze the presence of TNAP and IAP in colon. IAP was located basically in the goblet cells and TNAP in some infiltrated neutrophils. We found no differences in TNAP expression but IAP seemed to be more expressed in TNAP mice (Figure 42 and 43). We could observe this by Western blot too (Figure 48).

We cultured the cells isolated from mesenteric lymph nodes (MLNC) stimulated with Con A in order to test the importance of T lymphocytes. And we observed a significant increase in the production of IL-17, TNF- α IL6 d IL-10 in TNAP mice (Figure 45).

All these data are explained more in detail in the third part in the Results Chapter (III. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA EN RATONES HETEROCIGOTOS PARA LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO).

Acute DSS colitis. Trying to know the role of TNAP in IBD, we first administered DSS 2% (W/V) in drinking water and as mice started to die we stopped the DSS administration day 7, by day 9 all WT (n=7) mice had died

while 27% of TNAP (n=9) mice were still alive (Figure 48). So we decided to administer DSS 1% (W/V) in drinking water for 9 days to TNAP heterozygous mice (TNAP-DSS, n=14) and their wild-type controls (WT-DSS, n=10). We also had two control groups (WT, n=9 and TNAP, n=11) that received normal water. After 9 days, the body weight loss in TNAP-DSS was higher than in WT-DSS mice (Figure 49), and the disease activity index (DAI) was also increased in WT-DSS (Figure 49). We could assess that by hematoxylin-eosin (H&E) staining (Figure 51).

The AP activity and their sensitivity to levamisole in colon were increased in colitic groups (WT-DSS and TNAP-DSS) but this increase was significantly lower in TNAP-DSS mice (Figure 52). Colonic myeloperoxidase activity was also lower in TNAP-DSS (Figure 53).

Flow cytometry analysis revealed an enrichment of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in cells isolated from mesenteric lymph nodes of TNAP-DSS mice (Figure 54), along with an increased production of IFN- γ and IL-10 but not IL-17 in MLNC stimulated with Con A (Figure 55), suggesting a possible involvement of lymphocytes in the differential response.

Chronic DSS colitis. After the acute DSS model, we asked about chronic colitis, so we administered 3 cycles of DSS 1% (W/V) for 5 days a 10 days with drinking between each cycle to WT (WT-DSSc, n=9) and TNAP mice (TNAP-DSSc, n=12). We also had two control groups (WT, n=9 and TNAP, n=3) that received normal water.

We did not observe big differences between WT-DSSc and TNAP-DSSc in the percentage of body weight gain (Figure 59), but during the experiment the 35.7% of WT-DSSc mice died while only the 14.3% of TNAP-DSSc died (Figure 59).

We measured colonic AP and MPO activities. We did not observe the increase we are used to observe in colitic mice but we could observe the increase in the sensitivity to levamisole 0.1mM that was lower in TNAP-DSSc group (Figure 61). Colonic MPO activity was increased in colitic groups, but significantly diminished in TNAP-DSSc mice suggesting that they were less affected (Figure 62).

We analyze blood cell populations but we did not observe any differences between groups (not shown). Nevertheless, when we cultured splenocytes from all the groups, we could see an increase production of cytokines by splenocytes stimulated with Con A (mainly lymphocytes effect), but not in splenocytes stimulated with LPS (Figure 64).

The cultured MLNC stimulated with Con A from colitic mice shown an increase in the production of cytokines, but not big differences between groups (Figure 65).

TNBS colitis. We administered TNBS to WT (WT-TNBS, n=7) and TNAP (TNAP-TNSB, n=8) mice. We also had some control mice that only received ethanol 50% (V/V) intrarectally (WT, n=2 and TNAP, n=2). Before the intrarectally administration of TNBS, we presensitized the mice by administering a topic solution of TNBS 1% (V/V) (day 0). The TNBS administration (day 7) was marked by a loss of body weight that reached the 10-12% in the colitic groups on day 11, that was higher in WT-TNBS group (Figure 67).

Colonic AP activity was increased in colitic groups, but significantly less in TNAP-TNBS groups, as well as the sensitivity to levamisole 0.1mM (Figure 69). Colonic MPO activity was drastically diminished in TNAP-TNBS group from WT-TNBS mice, suggesting some colitis protection of TNAP mice (Figure 70).

The production of cytokines by MLNC stimulated by Con A did not show big differences between groups (Figure 72).

Adoptive transfer colitis. The transfer of CD4⁺ CD25⁻ T cells to immunodeficient mice induces chronic colitis. We used this approximation to study the differences between WT and TNAP heterozygous mice. We isolated these cells from WT and TNAP mice and injected into SCID mice, so we had two colitic groups: WT-Transfer. (n=5) and TNAP-Transfer. (n=4). Until the starting of colitis all groups were gaining the same percentage of body weight, but since the colitis started WT Transfer mice lost more body weight than TNAP Transfer group (Figure 75). WT-Transfer mice were more affected as it was also shown by endoscopy. WT-Transfer mice showed a higher endoscopic index (EI), based on vascularity, fibrosis, translucency, granularity and feces aspect (Figure 76).

Colonic AP activity was not increased in this case in colitic mice, but it was their sensitivity to levamisole 10mM, that was lower in TNAP Transfer mice (Figure 77). In spite of this we did not see differences in colonic MPO activity that was dramatically increased in both groups (Figure 78).

We did not observe difference in the production of cytokines by MLNC stimulated with Con A or in cultured colon explants (Figure 79 and 80).

Bacterial intestinal infections. To investigate the role of TNAP in bacterial intestinal infection we used two different but related models: *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurim (*S. Typhimurium*).

The oral administration of bioluminescent ***C.rodentium*** induced an intestinal infection that was controlled daily by imaging using the IVIS® system and plating the stools in erythromycin LB plates. In Figure 81 we see as WT *Citrobacter* mice (n=18) were having less bacterial load than TNAP *Citrobacter* mice (n=19). The counts of *C.rodentium* in feces were higher in WT mice, suggesting problems in the clearance in the TNAP *Citrobacter* group.

Colonic AP activity was not increased in this model of infection, but it was their sensitivity to levamisole 10mM, that was lower in TNAP Transfer mice (Figure 82). In spite of this we could observe a big increase in colonic MPO activity suggesting that TNAP mice were worse than WT mice (Figure 83).

In the H&E colon stainings we could determine the colonic inflammation index, and it was significantly higher in TNAP *Citrobacter*, as well as the crypt length that was longer in this group too (Figure 84).

The colonic expression of angiotensin 4 (Ang 4), phospholipase A2 (Plag2a), Reg3b (Reg3b), and the interleukines IL-22, IL-17 and IL-1 β was measured by qRT-PCR, finding some differences in Reg3b and IL-1 β (Figure 87).

The oral administration of bioluminescent ***S. Typhimurium*** in WT (WT *Salmonella*) and TNAP mice (TNAP *Salmonella*) was capable to induce a severe infection that was higher in TNAP mice. The day 4 after the infection, TNAP *Salmonella* mice showed a higher bacterial load measured by the IVIS® system (Figure 88).

Mucositis. In order to test if TNAP is implicated in the gastrointestinal mucositis, we administered 5-FU intraperitoneally to WT (WT 5-FU) and TNAP mice (TNAP 5-FU). We also had two control groups (WT and TNAP) that were injected daily with PBS. After 5 days of daily administration of 50 mg/Kg of 5-FU intraperitoneally mice suffering mucositis lost as 10-12% of body weight (Figure 89).

Intestinal AP activity was measured in duodenum, jejunum, ileum and colon and it was increased in all ill mice, that was significantly higher in

duodenum, jejunum and colon in TNAP-5FU mice and only in jejunum in WT-5FU mice (Figure 90). Sensitivity to levamisole was only significantly higher in colon (Figure 90).

We analyzed the blood cell populations and we observed some differences in neutrophils that were higher in WT-5FU than in TNAP-5FU mice (Figure 92). The production of cytokines by MLNC stimulated with Con A was significantly higher in the production of IFN- γ and IL-10 by TNAP-5FU mice (Figure 93).

All these experiments about intestinal inflammation in TNAP mice are explained more in detail in the fourth part in the Results Chapter. (IV. IMPORTANCIA DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN LA INFLAMACIÓN INTESTINAL).

DISCUSSION

In sharp contrast with IAP knockout (IAP^{-/-}) mice, TNAP heterozygous (TNAP^{+/-}) mice are less sensitive to colitis than control animals, both in acute and chronic DSS colitis as well as in TNBS colitis. This was quite consistent so we consider the data to be representative. The use of different inflammation models in this thesis was due to the necessity to avoid the limitations of the different experimental colitis models.

The simplest interpretation of the data is that TNAP has a harmful role in intestinal inflammation. Alternatively, the better outcome may be accounted for by the higher expression of IAP in the colon of TNAP^{+/-} mice. IAP is located mainly in the goblet cells in colon and colitis is related to a general mucus depletion, so IAP could be released to the lumen, pulled along with the mucins; or perhaps secretion may be reduced because of mucin depletion. There were no differences between AP activities in small intestine in heterozygous mice, but there was a tendency to a higher levamisole resistance.

Another explanation is that the immune response is modulated substantially in TNAP^{+/-} mice. Thus a higher production of IL-10 and a lower release of IFN- γ by lymphocytes isolated from MLNC may be reflective of a lower immune response, resulting in reduced colitis. On the other hand, an increase in the IL-6 production was observed by the colonic tissue that could be a marker of a higher immunological response. Both mechanisms can diminish colitis severity depending on the affected cells, the time course, and other factors. For instance, heightened IL-6 production is consistent with a potentiation of the immunological response, but the global effect can be just

the opposite, i.e. by strengthening the mucosal barrier function a better control of microorganisms and antigens from the lumen can be achieved, preventing a secondary, more robust immune response.

We also consider that TNAP can have different roles in neutrophils/lymphocytes and enterocytes. The loss of one TNAP allele could be the responsible for a higher immune response by neutrophils/lymphocytes but a lower enterocyte response to LPS. The results observed in the infection models (*C. rodentium* and *S. Typhimurium*) would be consistent then with a more important role of the epithelium.

Although they are preliminary results, we decided to include the transfer colitis model as well as the infection ones. The CD4⁺ CD25⁻ lymphocyte transfer from WT and TNAP^{+/-} mice to immunodeficient mice was capable to induce colitis in mice but it was more severe in the group that received WT lymphocytes than from TNAP^{+/-}. This suggests that TNAP^{+/-} lymphocytes have a less proinflammatory profile than WT, as it is shown in the study of the cytokine production by splenocytes and particularly MLNC. Curiously *C.rodentium* and *S. typhimurium* infection was more pronounced in TNAP^{+/-} mice, indicating a possible different role of enterocytes lacking TNAP. Since the AP activity in the colon is comparable, it is hard to tell how this could directly explain this result. Thus a more logical interpretation is that immunomodulatory changes are involved in the deficient response to infection. This is a field that will require further study.

In the mucositis model we did not observe differences in the general aspect of the animals, but we observed that TNAP^{+/-} mice did not show the neutrophils increase typical of mucositis. We have no explanation for this so far.

Taking all together, we can conclude that:

1. TNAP is induced by intestinal epithelial cells under inflammation/cell stress, by a mechanism that involves mainly changes in the glycosylation pattern, with a minor role, if any, of variations in transcription/translation.
2. The inflamed colon expresses higher levels of AP which is of the BAP/KAP type.
3. Exogenous AP treatment results in protection from experimental colitis in rats, particularly at the level of bacterial translocation.
4. Luminal AP activity, chiefly of the TNAP type, is augmented in rat experimental colitis.

5. Genetic deletion of on Alpl alele has important consequences on the animal response to colitogenic and stimuli and infectious challenge, which may be related in part to immunomodulatory changes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoylaerts, M.F., T. Manes, and J.L. Millan, Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem J*, 1992. 286 (Pt 1): p. 23-30.
2. Millan, J.L., Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*, 2006. 2(2): p. 335-41.
3. Van Hoof, V.O. and M.E. De Broe, Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1994. 31(3): p. 197-293.
4. Smith, M., et al., Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics*, 1988. 2(2): p. 139-43.
5. Toh, Y., et al., Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene. A single gene with two promoters. *Eur J Biochem*, 1989. 182(2): p. 231-7.
6. Terao, M., et al., Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J*, 1990. 268(3): p. 641-8.
7. Matsuura, S., F. Kishi, and T. Kajii, Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. 168(3): p. 993-1000.
8. Toh, Y., et al., Duplicate leader exons in the mouse liver-type alkaline phosphatase gene. *Biochem Int*, 1990. 22(2): p. 213-8.
9. Weiss, M.J., et al., Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(19): p. 7182-6.
10. Toh, Y., et al., Sequence divergence of 5' extremities in rat liver alkaline phosphatase mRNAs. *J Biochem*, 1989. 105(1): p. 61-5.
11. Kishi, F., S. Matsuura, and T. Kajii, Nucleotide sequence of the human liver-type alkaline phosphatase cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(5): p. 2129.
12. Zernik, J., B. Kream, and K. Twarog, Tissue-specific and dexamethasone-inducible expression of alkaline phosphatase from alternative promoters of the rat bone/liver/kidney/placenta gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 176(3): p. 1149-56.
13. Millán, J.L., *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. 2006.
14. Griffin, C.A., et al., Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am J Hum Genet*, 1987. 41(6): p. 1025-34.
15. Martin, D., et al., The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. *Ann Hum Genet*, 1987. 51(Pt 2): p. 145-52.
16. Henthorn, P.S., et al., Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*, 1988. 263(24): p. 12011-9.
17. Knoll, B.J., K.N. Rothblum, and M. Longley, Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. Evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution. *J Biol Chem*, 1988. 263(24): p. 12020-7.

18. Millan, J.L. and T. Manes, Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(9): p. 3024-8.
19. Manes, T., et al., Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics*, 1990. 8(3): p. 541-54.
20. Noda, M., et al., cDNA cloning of alkaline phosphatase from rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *J Bone Miner Res*, 1987. 2(2): p. 161-4.
21. Thiede, M.A., et al., Structure and expression of rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) alkaline phosphatase: product of a single copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(2): p. 319-23.
22. Lowe, M., et al., Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1037(2): p. 170-7.
23. Strom, M., J. Krisinger, and H.F. DeLuca, Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1090(3): p. 299-304.
24. Engle, M.J. and D.H. Alpers, The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. *Clin Chem*, 1992. 38(12): p. 2506-9.
25. Xie, Q. and D.H. Alpers, The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes. *Physiol Genomics*, 2000. 3(1): p. 1-8.
26. Eliakim, R., et al., Differential regulation of mRNAs encoding for rat intestinal alkaline phosphatase. *Am J Physiol*, 1990. 259(1 Pt 1): p. G93-8.
27. Komoda, T., et al., Ontogenic and phylogenic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development. *Gastroenterology*, 1986. 91(2): p. 277-86.
28. Merchant-Larios, H., F. Mendlovic, and A. Alvarez-Buylla, Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse. *Differentiation*, 1985. 29(2): p. 145-51.
29. Hahnel, A.C. and G.A. Schultz, Cloning and characterization of a cDNA encoding alkaline phosphatase in mouse embryonal carcinoma cells. *Clin Chim Acta*, 1990. 186(2): p. 171-4.
30. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*, 1997. 208(3): p. 432-46.
31. Narisawa, S., et al., Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse. *Dev Dyn*, 1994. 201(3): p. 227-35.
32. Kwong, W.H. and P.P. Tam, The pattern of alkaline phosphatase activity in the developing mouse spinal cord. *J Embryol Exp Morphol*, 1984. 82: p. 241-51.
33. Scherer, S.S., Molecular specializations at nodes and paranodes in peripheral nerve. *Microsc Res Tech*, 1996. 34(5): p. 452-61.
34. MacGregor, G.R., B.P. Zambrowicz, and P. Soriano, Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development*, 1995. 121(5): p. 1487-96.

35. Hoshi, K., et al., Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol*, 1997. 107(3): p. 183-91.
36. Goseki, M., et al., Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res*, 1990. 69(3): p. 909-12.
37. Chapin, R.E., et al., Alkaline phosphatase histochemistry discriminates peritubular cells in primary rat testicular cell culture. *J Androl*, 1987. 8(3): p. 155-61.
38. Mori, S. and M. Nagano, Electron-microscopic cytochemistry of alkaline-phosphatase activity in endothelium, pericytes and oligodendrocytes in the rat brain. *Histochemistry*, 1985. 82(3): p. 225-31.
39. Rowan, R.A. and D.S. Maxwell, An ultrastructural study of vascular proliferation and vascular alkaline phosphatase activity in the developing cerebral cortex of the rat. *Am J Anat*, 1981. 160(3): p. 257-65.
40. Grim, M. and B.M. Carlson, Alkaline phosphatase and dipeptidylpeptidase IV staining of tissue components of skeletal muscle: a comparative study. *J Histochem Cytochem*, 1990. 38(12): p. 1907-12.
41. Garcia-Rozas, C., et al., Alkaline phosphatase activity as a membrane marker for activated B cells. *J Immunol*, 1982. 129(1): p. 52-5.
42. Marquez, C., et al., Identity of PB76 differentiation antigen and lymphocyte alkaline phosphatase. *Eur J Immunol*, 1990. 20(4): p. 947-50.
43. Marquez, C., et al., Expression of alkaline phosphatase in murine B lymphocytes. Correlation with B cell differentiation into Ig secretion. *J Immunol*, 1989. 142(9): p. 3187-92.
44. Garattini, E. and M. Gianni, Leukocyte alkaline phosphatase a specific marker for the post-mitotic neutrophilic granulocyte: regulation in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1996. 23(5-6): p. 493-503.
45. Dotti, G., et al., Leucocyte alkaline phosphatase identifies terminally differentiated normal neutrophils and its lack in chronic myelogenous leukaemia is not dependent on p210 tyrosine kinase activity. *Br J Haematol*, 1999. 105(1): p. 163-72.
46. Eliakim, R., et al., Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *Am J Physiol*, 1997. 272(3 Pt 1): p. G425-34.
47. 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.
48. Hustin, J., J. Collette, and P. Franchimont, Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *Int J Androl*, 1987. 10(1): p. 29-35.
49. Fishman, L., et al., Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzymes of human placenta and their occurrence in human cancer. *Cancer Res*, 1976. 36(7 PT 1): p. 2268-73.
50. Garattini, E., et al., Human placental alkaline phosphatase in liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(18): p. 6080-4.
51. Behrens, C.M., C.A. Enns, and H.H. Sussman, Characterization of human foetal intestinal alkaline phosphatase. Comparison with the isoenzymes from the adult intestine and human tumour cell lines. *Biochem J*, 1983. 211(3): p. 553-8.

52. Wada, A., et al., Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin. *Int J Med Microbiol*, 2005. 294(7): p. 427-35.
53. Eliakim, R., et al., Isolation and characterization of a small intestinal surfactant-like particle containing alkaline phosphatase and other digestive enzymes. *J Biol Chem*, 1989. 264(34): p. 20614-9.
54. Alpers, D.H., et al., The secretion of intestinal alkaline phosphatase (IAP) from the enterocyte. *J Gastroenterol*, 1994. 29 Suppl 7: p. 63-7.
55. Alpers, D.H., Y. Zhang, and D.J. Ahnen, Synthesis and parallel secretion of rat intestinal alkaline phosphatase and a surfactant-like particle protein. *Am J Physiol*, 1995. 268(6 Pt 1): p. E1205-14.
56. Calhau, C., et al., Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin Biochem*, 2000. 33(7): p. 571-7.
57. Verpooten, G.F., et al., Segment-specific localization of intestinal-type alkaline phosphatase in human kidney. *Kidney Int*, 1989. 36(4): p. 617-25.
58. Narisawa, S., et al., Conserved epitopes in human and mouse tissue-nonspecific alkaline phosphatase. Second report of the ISOBM TD-9 workshop. *Tumour Biol*, 2005. 26(3): p. 113-20.
59. Studer, M., et al., Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 179(3): p. 1352-60.
60. Sato, N., Y. Takahashi, and S. Asano, Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes. *Blood*, 1994. 83(4): p. 1093-101.
61. Zernik, J., et al., Cloning and analysis of the 5' region of the rat bone/liver/kidney/placenta alkaline phosphatase gene. A dual-function promoter. *Matrix*, 1990. 10(1): p. 38-47.
62. Scheibe, R.J., I. Moeller-Runge, and W.H. Mueller, Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem*, 1991. 266(31): p. 21300-5.
63. Heath, J.K., et al., Retinoic acid stimulates transcriptional activity from the alkaline phosphatase promoter in the immortalized rat calvarial cell line, RCT-1. *Mol Endocrinol*, 1992. 6(4): p. 636-46.
64. Escalante-Alcalde, D., et al., Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression. *Mech Dev*, 1996. 57(1): p. 21-32.
65. Gianni, M., et al., Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells. *Biochem J*, 1993. 296 (Pt 1): p. 67-77.
66. Orimo, H. and T. Shimada, Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-trans-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line. *Bone*, 2005. 36(5): p. 866-76.
67. Hatta, M., et al., Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR. *Int J Mol Med*, 2002. 9(2): p. 147-52.
68. Yusa, N., et al., Transcription factor Sp3 activates the liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase promoter in hematopoietic cells. *J Leukoc Biol*, 2000. 68(5): p. 772-7.

69. Tylzanowski, P., et al., Smad-interacting protein 1 is a repressor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem*, 2001. 276(43): p. 40001-7.
70. Sowa, H., et al., Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(39): p. 36024-31.
71. Sowa, H., et al., Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(7): p. 1190-9.
72. Yeh, K., et al., Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes. *Biochem J*, 1994. 301 (Pt 3): p. 893-9.
73. Hodin, R.A., et al., Thyroid hormone and the gut: selective transcriptional activation of a villus-enterocyte marker. *Surgery*, 1996. 120(2): p. 138-43.
74. Hinnebusch, B.F., et al., Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 286(1): p. G23-30.
75. Malo, M.S., et al., Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 290(4): p. G737-46.
76. Alkhoury, F., et al., Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. 289(2): p. G285-90.
77. Hinnebusch, B.F., et al., The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr*, 2002. 132(5): p. 1012-7.
78. Hinnebusch, B.F., et al., Transcriptional activation of the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is associated with changes in the acetylation state of histone H3 at a specific site within its promoter region in vitro. *J Gastrointest Surg*, 2003. 7(2): p. 237-44; discussion 244-5.
79. Stec, B., K.M. Holtz, and E.R. Kantrowitz, A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J Mol Biol*, 2000. 299(5): p. 1303-11.
80. Le Du, M.H., et al., Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem*, 2001. 276(12): p. 9158-65.
81. Le Du, M.H. and J.L. Millan, Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 2002. 277(51): p. 49808-14.
82. Kozlenkov, A., et al., Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 2002. 277(25): p. 22992-9.
83. Mornet, E., et al., Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*, 2001. 276(33): p. 31171-8.
84. Hoylaerts, M.F. and J.L. Millan, Site-directed mutagenesis and epitope-mapped monoclonal antibodies define a catalytically important conformational difference between human placental and germ cell alkaline phosphatase. *Eur J Biochem*, 1991. 202(2): p. 605-16.

85. Hummer, C. and J.L. Millan, Gly429 is the major determinant of uncompetitive inhibition of human germ cell alkaline phosphatase by L-leucine. *Biochem J*, 1991. 274 (Pt 1): p. 91-5.
86. Kozlenkov, A., et al., Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res*, 2004. 19(11): p. 1862-72.
87. Bossi, M., M.F. Hoylaerts, and J.L. Millan, Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 1993. 268(34): p. 25409-16.
88. Hoylaerts, M.F., T. Manes, and J.L. Millan, Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem*, 1997. 272(36): p. 22781-7.
89. Hooper, N.M., Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta*, 1997. 266(1): p. 3-12.
90. Fedde, K.N., C.C. Lane, and M.P. Whyte, Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells. *Arch Biochem Biophys*, 1988. 264(2): p. 400-9.
91. Koyama, I., et al., Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatases: differences between normal and tumour-associated isozymes. *J Chromatogr*, 1987. 413: p. 65-78.
92. Carr, S.A., M.J. Huddleston, and M.F. Bean, Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci*, 1993. 2(2): p. 183-96.
93. Nosjean, O., et al., Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem J*, 1997. 321 (Pt 2): p. 297-303.
94. Halling Linder, C., et al., Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. *Bone*, 2009. 45(5): p. 987-93.
95. Micanovic, R., et al., Aspartic acid-484 of nascent placental alkaline phosphatase condenses with a phosphatidylinositol glycan to become the carboxyl terminus of the mature enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(5): p. 1398-402.
96. Fishman, W.H., Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin Biochem*, 1990. 23(2): p. 99-104.
97. Fishman, W.H. and H.G. Sie, Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoarginine. *Enzymologia*, 1971. 41(3): p. 141-67.
98. Doellgast, G.J. and W.H. Fishman, Inhibition of human placental-type alkaline phosphatase variants by peptides containing L-leucine. *Clin Chim Acta*, 1977. 75(3): p. 449-54.
99. Lin, C.W. and W.H. Fishman, L-Homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *J Biol Chem*, 1972. 247(10): p. 3082-7.
100. Van Belle, H., Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem*, 1976. 22(7): p. 972-6.
101. Farley, J.R., J.L. Ivey, and D.J. Baylink, Human skeletal alkaline phosphatase. Kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. *J Biol Chem*, 1980. 255(10): p. 4680-6.

102. Fishman, W.H., Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am J Med*, 1974. 56(5): p. 617-50.
103. Mulivor, R.A., L.I. Plotkin, and H. Harris, Differential inhibition of the products of the human alkaline phosphatase loci. *Ann Hum Genet*, 1978. 42(1): p. 1-13.
104. Majeska, R.J. and R.E. Wuthier, Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1975. 391(1): p. 51-60.
105. Fallon, M.D., M.P. Whyte, and S.L. Teitelbaum, Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab Invest*, 1980. 43(6): p. 489-94.
106. Moss, D.W., et al., Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem J*, 1967. 102(1): p. 53-7.
107. Whyte, M.P., Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*, 1994. 15(4): p. 439-61.
108. Rezende, L.A., et al., Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998. 44(2): p. 293-302.
109. Smith, G.P. and T.J. Peters, Subcellular localization and properties of pyridoxal phosphate phosphatases of human polymorphonuclear leukocytes and their relationship to acid and alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1981. 661(2): p. 287-94.
110. Wilson, P.D., G.P. Smith, and T.J. Peters, Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils. *Histochem J*, 1983. 15(3): p. 257-64.
111. Farley, J.R., et al., Monofluorophosphate is hydrolyzed by alkaline phosphatase and mimics the actions of NaF on skeletal tissues, in vitro. *Calcif Tissue Int*, 1987. 40(1): p. 35-42.
112. Say, J.C., et al., Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1074(2): p. 256-62.
113. Nayudu, R.V. and L. de Meis, Energy transduction at the catalytic site of enzymes: hydrolysis of phosphoester bonds and synthesis of pyrophosphate by alkaline phosphatase. *FEBS Lett*, 1989. 255(1): p. 163-6.
114. Bates, J.M., et al., Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(6): p. 371-82.
115. Engle, M.J., A. Mahmood, and D.H. Alpers, Two rat intestinal alkaline phosphatase isoforms with different carboxyl-terminal peptides are both membrane-bound by a glycan phosphatidylinositol linkage. *J Biol Chem*, 1995. 270(20): p. 11935-40.
116. Nakano, T., et al., Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. 297(1): p. G207-14.
117. Persson, E.M., et al., A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory response to a dietary meal in human proximal small intestine. *Pharm Res*, 2006. 23(4): p. 742-51.
118. Eliakim, R., A. Mahmood, and D.H. Alpers, Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1091(1): p. 1-8.

119. Narisawa, S., et al., A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(5): p. G1068-77.
120. Hodin, R.A., S.M. Chamberlain, and S. Meng, Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state. *Am J Physiol*, 1995. 269(2 Pt 1): p. C385-91.
121. Gibson, P.R., et al., Relationship of hydrolase activities to epithelial cell turnover in distal colonic mucosa of normal rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999. 14(9): p. 866-72.
122. Oberreuther-Moschner, D.L., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel, Basal colon crypt cells are more sensitive than surface cells toward hydrogen peroxide, a factor of oxidative stress. *Toxicol Lett*, 2005. 159(3): p. 212-8.
123. Watson, W.C., E.S. Murray, and M.D. Gardner, Regulation of intestinal alkaline phosphatase levels in the rat. Role of the adrenal cortex. *J Clin Pathol*, 1967. 20(2): p. 185-9.
124. Hodin, R.A., S.M. Chamberlain, and M.P. Upton, Thyroid hormone differentially regulates rat intestinal brush border enzyme gene expression. *Gastroenterology*, 1992. 103(5): p. 1529-36.
125. Akiba, Y., et al., Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(6): p. G1223-33.
126. Harada, T., et al., Heat shock induces intestinal-type alkaline phosphatase in rat IEC-18 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. 284(2): p. G255-62.
127. Malo, M.S., et al., The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression. *DNA Cell Biol*, 2006. 25(12): p. 684-95.
128. Lalles, J.P., Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr Rev*, 2010. 68(6): p. 323-32.
129. Mansbach, C.M., 2nd and F. Gorelick, Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(4): p. G645-50.
130. Iqbal, J. and M.M. Hussain, Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. 296(6): p. E1183-94.
131. Narisawa, S., et al., Accelerated Fat Absorption in Intestinal Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. 23(21): p. 7525-7530.
132. Hansen, G.H., et al., Intestinal alkaline phosphatase: selective endocytosis from the enterocyte brush border during fat absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(6): p. G1325-32.
133. Brown, D.A. and E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. 14: p. 111-36.
134. Nauli, A.M., et al., Intestinal alkaline phosphatase release is not associated with chylomicron formation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. 284(4): p. G583-7.
135. Mizumori, M., et al., Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 14): p. 3651-63.

136. Trent, M.S., Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(1): p. 71-86.
137. Jerala, R., Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*, 2007. 297(5): p. 353-63.
138. Goldberg, R.F., et al., Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(9): p. 3551-6.
139. Cario, E., Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 2005. 54(8): p. 1182-93.
140. Fukata, M. and M.T. Abreu, TLR4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 2007. 35(Pt 6): p. 1473-8.
141. Bates, J.M., et al., Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol*, 2006. 297(2): p. 374-86.
142. Renes, I.B., et al., Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis*, 2002. 17(5): p. 317-26.
143. Gibson, P. and O. Rosella, Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1995. 37(4): p. 536-43.
144. Smith, G.P., H. Harris, and T.J. Peters, Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta*, 1984. 142(2): p. 221-30.
145. Torres, M.I., et al., A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. *Pathol Res Pract*, 2007. 203(6): p. 485-7.
146. Tuin, A., et al., Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut*, 2009. 58(3): p. 379-87.
147. Arvanitakis, C., Abnormalities of jejunal mucosal enzymes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestion*, 1979. 19(4): p. 259-66.
148. Beumer, C., et al., Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS)-mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 307(2): p. 737-44.
149. van Veen, S.Q., et al., Bovine intestinal alkaline phosphatase attenuates the inflammatory response in secondary peritonitis in mice. *Infect Immun*, 2005. 73(7): p. 4309-14.
150. van Veen, S.Q., et al., Alkaline phosphatase reduces hepatic and pulmonary injury in liver ischaemia -- reperfusion combined with partial resection. *Br J Surg*, 2006. 93(4): p. 448-56.
151. Kats, S., et al., Anti-inflammatory effects of alkaline phosphatase in coronary artery bypass surgery with cardiopulmonary bypass. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. 3(3): p. 214-20.
152. Verweij, W.R., et al., Protection against an *Escherichia coli*-induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. *Shock*, 2004. 22(2): p. 174-9.
153. Hesse, L., et al., Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(14): p. 9445-9.

154. Harmey, D., et al., Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *The American Journal of Pathology*, 2004. 164(4): p. 1199-1209.
155. Addison, W.N., et al., Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem*, 2007. 282(21): p. 15872-83.
156. Murshed, M., et al., Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*, 2005. 19(9): p. 1093-104.
157. Terkeltaub, R.A., Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(1): p. C1-C11.
158. Rathbun, J.C., Hypophosphatasia; a new developmental anomaly. *Am J Dis Child*, 1948. 75(6): p. 822-31.
159. Mornet, E., Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis*, 2007. 2: p. 40.
160. Orimo, H., The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, 2010. 77(1): p. 4-12.
161. Millan, J.L., et al., Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, 2008. 23(6): p. 777-87.
162. Sands, B.E., Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol*, 2007. 42(1): p. 16-25.
163. Pajares, J.M. and J.P. Gisbert, Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig*, 2001. 93(1): p. 9-20.
164. Lopez San Roman, A. and F. Bermejo, Inflammatory bowel disease in Spain: problems grow. *Rev Esp Enferm Dig*, 2004. 96(5): p. 291-6.
165. Podolsky, D.K., Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 2002. 347(6): p. 417-29.
166. Stokes, M.A., Crohn's disease and nutrition. *Br J Surg*, 1992. 79(5): p. 391-4.
167. Reimund, J.M., et al., Immune activation and nutritional status in adult Crohn's disease patients. *Dig Liver Dis*, 2005. 37(6): p. 424-31.
168. Rigaud, D., et al., Mechanisms of decreased food intake during weight loss in adult Crohn's disease patients without obvious malabsorption. *Am J Clin Nutr*, 1994. 60(5): p. 775-81.
169. Hodges, P., et al., Protein-energy intake and malnutrition in Crohn's disease. *J Am Diet Assoc*, 1984. 84(12): p. 1460-4.
170. Lanfranchi, G.A., et al., Assessment of nutritional status in Crohn's disease in remission or low activity. *Hepatogastroenterology*, 1984. 31(3): p. 129-32.
171. Rocha, R., et al., Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. *Br J Nutr*, 2009. 101(5): p. 676-9.
172. Vaisman, N., et al., Malabsorption is a major contributor to underweight in Crohn's disease patients in remission. *Nutrition*, 2006. 22(9): p. 855-9.
173. Bielefeldt, K., B. Davis, and D.G. Binion, Pain and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(5): p. 778-88.
174. Freeman, H.J., Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades. *J Clin Gastroenterol*, 2003. 37(3): p. 216-9.

175. Malchow, H., et al., [Localization and extent of Crohn disease at initial diagnosis]. *Med Klin (Munich)*, 1987. 82(4): p. 140-5.
176. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 2007. 369(9573): p. 1641-57.
177. Gasche, C., et al., A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*, 2000. 6(1): p. 8-15.
178. Silverberg, M.S., et al., Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 2005. 19 Suppl A: p. 5-36.
179. Louis, E., et al., Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*, 2001. 49(6): p. 777-82.
180. Regueiro, M.D., Diagnosis and treatment of ulcerative proctitis. *J Clin Gastroenterol*, 2004. 38(9): p. 733-40.
181. Haghghi, D.B. and B.A. Lashner, Left-sided ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am*, 2004. 33(2): p. 271-84, ix.
182. Price, A.B., Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol*, 1978. 31(6): p. 567-77.
183. Martland, G.T. and N.A. Shepherd, Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity. *Histopathology*, 2007. 50(1): p. 83-96.
184. Carvalho, R.S., et al., Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12(4): p. 258-62.
185. Guindi, M. and R.H. Riddell, Indeterminate colitis. *J Clin Pathol*, 2004. 57(12): p. 1233-44.
186. Shivananda, S., et al., Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*, 1996. 39(5): p. 690-7.
187. Loftus, E.V., Jr., et al., Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*, 1998. 114(6): p. 1161-8.
188. Sonnenberg, A., D.J. McCarty, and S.J. Jacobsen, Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology*, 1991. 100(1): p. 143-9.
189. Loftus, E.V., Jr., Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 2004. 126(6): p. 1504-17.
190. Lovasz, B.D., et al., New trends in inflammatory bowel disease epidemiology and disease course in Eastern Europe. *Dig Liver Dis*, 2013. 45(4): p. 269-76.
191. Brullet, E., et al., [Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]. *Med Clin (Barc)*, 1998. 110(17): p. 651-6.
192. Lopez Miguel, C., et al., [Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study]. *Gastroenterol Hepatol*, 1999. 22(7): p. 323-8.

193. Arin Letamendia, A., et al., [High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008. 31(3): p. 111-6.
194. Loftus, E.V., Jr., et al., Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut*, 2000. 46(3): p. 336-43.
195. Nordenvall, B., et al., Incidence of ulcerative colitis in Stockholm County 1955-1979. *Scand J Gastroenterol*, 1985. 20(7): p. 783-90.
196. Norlen, B.J., U. Krause, and L. Bergman, An epidemiological study of Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 1970. 5(5): p. 385-90.
197. Ekbohm, A., et al., The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*, 1991. 100(2): p. 350-8.
198. Karlinger, K., et al., The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol*, 2000. 35(3): p. 154-67.
199. Heresbach, D., et al., Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am J Gastroenterol*, 1998. 93(12): p. 2368-72.
200. Hampe, J., et al., Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. *Am J Med Genet*, 2000. 92(3): p. 178-83.
201. Niv, Y., G. Abuksis, and G.M. Fraser, Epidemiology of ulcerative colitis in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(3): p. 693-8.
202. Grossman, A., et al., Epidemiology of ulcerative colitis in the Jewish population of central Israel 1970-1980. *Hepatogastroenterology*, 1989. 36(4): p. 193-7.
203. Leong, R.W., J.Y. Lau, and J.J. Sung, The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(5): p. 646-51.
204. Zheng, J.J., et al., Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis*, 2005. 6(4): p. 175-81.
205. Roth, M.P., et al., Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1989. 97(4): p. 900-4.
206. Zlotogora, J., J. Zimmerman, and D. Rachmilewitz, Crohn's disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*, 1990. 99(1): p. 286-7.
207. Joossens, M., et al., Familial aggregation and antimicrobial response dose-dependently affect the risk for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. 16(1): p. 58-67.
208. Park, J.B., et al., Familial occurrence of inflammatory bowel disease in Korea. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12(12): p. 1146-51.
209. Cipolla, C., et al., Familial aggregation of inflammatory bowel disease in a Mediterranean area. *Eur J Epidemiol*, 1996. 12(2): p. 205-10.
210. Satsangi, J., et al., Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut*, 1994. 35(5): p. 696-700.
211. 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.

212. Orholm, M., et al., Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 1991. 324(2): p. 84-8.
213. Yang, H., et al., Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut*, 1993. 34(4): p. 517-24.
214. Saro Gismera, C., et al., [Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]. *Gastroenterol Hepatol*, 2001. 24(5): p. 228-35.
215. 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.
216. McConnell, R.B., Ulcerative colitis--genetic features. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. 88: p. 14-6.
217. Spehlmann, M.E., et al., Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 14(7): p. 968-76.
218. 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.
219. 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.
220. 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.
221. Orholm, M., et al., Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*, 2000. 35(10): p. 1075-81.
222. Greenberg, D.A. and J.I. Rotter, Two locus models for gluten sensitive enteropathy: population genetic considerations. *Am J Med Genet*, 1981. 8(2): p. 205-14.
223. Rotter, J.I. and E.M. Landaw, Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease. *Clin Genet*, 1984. 26(6): p. 529-42.
224. Lin, H.J., J.I. Rotter, and W.J. Conte, Use of HLA marker associations and HLA haplotype linkage to estimate disease risks in families with gluten-sensitive enteropathy. *Clin Genet*, 1985. 28(3): p. 185-98.
225. Satsangi, J., et al., Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003. 17(1): p. 3-18.
226. Zhang, H., et al., Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull*, 2008. 87: p. 17-30.
227. 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.
228. Hugot, J.P., et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): p. 599-603.
229. Ogura, Y., et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): p. 603-6.
230. Lesage, S., et al., CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 2002. 70(4): p. 845-57.

231. Hampe, J., et al., Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 2001. 357(9272): p. 1925-8.
232. Hampe, J., et al., Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(1): p. 321-6.
233. Leong, R.W., et al., NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. 17(12): p. 1465-70.
234. Yamazaki, K., et al., Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet*, 2002. 47(9): p. 469-72.
235. Guo, Q.S., et al., NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol*, 2004. 10(7): p. 1069-71.
236. 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.
237. 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.
238. McKay, D.M., Intestinal inflammation and the gut microflora. *Can J Gastroenterol*, 1999. 13(6): p. 509-16.
239. Kelsall, B., Getting to the guts of NOD2. *Nat Med*, 2005. 11(4): p. 383-4.
240. Parkes, M., et al., The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet*, 2000. 67(6): p. 1605-10.
241. Achkar, J.P., et al., Phenotype-stratified genetic linkage study demonstrates that IBD2 is an extensive ulcerative colitis locus. *Am J Gastroenterol*, 2006. 101(3): p. 572-80.
242. Barmada, M.M., et al., A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(5): p. 513-20.
243. Hampe, J., et al., The interferon-gamma gene as a positional and functional candidate gene for inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*, 1998. 13(5-6): p. 260-3.
244. Cantor, M.J., P. Nickerson, and C.N. Bernstein, The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2005. 100(5): p. 1134-42.
245. Stokkers, P.C., et al., Analysis of a positional candidate gene for inflammatory bowel disease: NRAM2. *Inflamm Bowel Dis*, 2000. 6(2): p. 92-8.
246. Simmons, J.D., et al., Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut*, 2000. 47(2): p. 211-4.
247. Dresner-Pollak, R., et al., The BsmI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in Jewish Ashkenazi patients. *Genet Test*, 2004. 8(4): p. 417-20.
248. de Jong, D.J. and J.P. Drenth, Absence of an association of the IBD2 locus gene keratin 8 and inflammatory bowel disease in a large genetic association study. *Dig Liver Dis*, 2004. 36(6): p. 380-3.
249. Tumer, Z., et al., Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AVIL gene, and its exclusion as a candidate for locus for inflammatory bowel disease at

- 12q13-14 (IBD2). *Gene*, 2002. 288(1-2): p. 179-85.
250. Klein, W., et al., The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*, 2005. 37(3): p. 159-61.
251. Zhu, J., et al., Distribution of signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism in Chinese patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006. 21(12): p. 1854-7.
252. de Jong, D.J., et al., No evidence for involvement of IL-4R and CD11B from the IBD1 region and STAT6 in the IBD2 region in Crohn's disease. *Eur J Hum Genet*, 2003. 11(11): p. 884-7.
253. Xia, B., et al., Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2003. 131(3): p. 446-50.
254. Satsangi, J., et al., Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 1996. 347(9010): p. 1212-7.
255. Stokkers, P.C., et al., HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*, 1999. 45(3): p. 395-401.
256. Fisher, S.A., et al., Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*, 2008. 40(6): p. 710-2.
257. Ferguson, L.R., et al., Single nucleotide polymorphisms in human Paneth cell defensin A5 may confer susceptibility to inflammatory bowel disease in a New Zealand Caucasian population. *Dig Liver Dis*, 2008. 40(9): p. 723-30.
258. Bouma, G., et al., Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol*, 1999. 115(2): p. 294-300.
259. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., Complotype SC30 is associated with susceptibility to develop ulcerative colitis in Mexicans. *J Clin Gastroenterol*, 1998. 27(2): p. 178-9.
260. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett*, 2004. 95(1): p. 31-5.
261. Bouma, G., et al., Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 1996. 103(3): p. 391-6.
262. Louis, E., et al., Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1996. 39(5): p. 705-10.
263. Duerr, R.H., et al., High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(6): p. 1857-62.
264. Vermeire, S., et al., Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut*, 2004. 53(7): p. 980-6.
265. Pierik, M., et al., The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(1): p. 1-7.
266. Owyang, A.M., et al., Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 2006. 203(4): p. 843-9.

267. Buning, C., et al., The interleukin-25 gene located in the inflammatory bowel disease (IBD) 4 region: no association with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunogenet*, 2003. 30(5): p. 329-33.
268. Ma, Y., et al., A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1999. 5(4): p. 271-8.
269. Silverberg, M.S., OCTNs: will the real IBD5 gene please stand up? *World J Gastroenterol*, 2006. 12(23): p. 3678-81.
270. Rioux, J.D., et al., Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 2000. 66(6): p. 1863-70.
271. Armuzzi, A., et al., Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut*, 2003. 52(8): p. 1133-9.
272. Vermeire, S., et al., Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology*, 2005. 129(6): p. 1845-53.
273. Tomer, G., et al., Polymorphisms in the IBD5 locus are associated with Crohn disease in pediatric Ashkenazi Jewish patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. 48(5): p. 531-7.
274. Brescianini, S., et al., IBD5 is associated with an extensive complicated Crohn's disease feature: implications from genotype-phenotype analysis. *Gut*, 2007. 56(1): p. 149-50.
275. Waller, S., et al., Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut*, 2006. 55(6): p. 809-14.
276. Peltekova, V.D., et al., Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*, 2004. 36(5): p. 471-5.
277. Giallourakis, C., et al., IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet*, 2003. 73(1): p. 205-11.
278. Torok, H.P., et al., Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut*, 2005. 54(10): p. 1421-7.
279. Noble, C.L., et al., The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2005. 129(6): p. 1854-64.
280. Russell, R.K., et al., Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut*, 2006. 55(8): p. 1114-23.
281. Torkvist, L., et al., Contribution of the IBD5 locus to Crohn's disease in the Swedish population. *Scand J Gastroenterol*, 2007. 42(2): p. 200-6.
282. Stoll, M., et al., Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 2004. 36(5): p. 476-80.
283. Bodor, M., E.J. Kelly, and R.J. Ho, Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J*, 2005. 7(1): p. E1-5.
284. McAlindon, M.E. and Y.R. Mahida, Pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996. 10 Suppl 2: p. 72-4.
285. Mahida, Y.R., et al., High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*, 1991. 32(12): p. 1531-4.

286. Waterman, M., et al., [The significance of IL-13 gene +2044G/A mutation in patients with inflammatory bowel disease]. *Harefuah*, 2006. 145(11): p. 789-92, 864.
287. Mahler, M., et al., Genetic analysis of susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Genomics*, 1999. 55(2): p. 147-56.
288. Williams, C.N., et al., Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8(6): p. 375-81.
289. van Heel, D.A., et al., Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(7): p. 763-70.
290. Low, J.H., et al., Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(3): p. 173-81.
291. Tello-Ruiz, M.K., et al., Haplotype-based association analysis of 56 functional candidate genes in the IBD6 locus on chromosome 19. *Eur J Hum Genet*, 2006. 14(6): p. 780-90.
292. Marek, A., et al., TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit*, 2002. 8(7): p. RA145-51.
293. Lee, Y.J., et al., TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol*, 1997. 158(5): p. 2065-75.
294. McKaig, B.C., et al., Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 282(1): p. C172-82.
295. Brant, S.R. and Y.Y. Shugart, Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(3): p. 300-11.
296. Satsangi, J., et al., Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*, 1996. 14(2): p. 199-202.
297. Rector, A., et al., Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Hum Genet*, 2001. 108(3): p. 190-3.
298. Tremelling, M., et al., IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2007. 132(5): p. 1657-64.
299. Duerr, R.H., et al., A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 2006. 314(5804): p. 1461-3.
300. Newman, W.G., et al., Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in a Canadian population. *J Clin Gastroenterol*, 2009. 43(5): p. 444-7.
301. Lakatos, P.L., et al., ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis*, 2008. 40(11): p. 867-73.
302. Hampe, J., et al., A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 207-11.

303. Rioux, J.D., et al., Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*, 2007. 39(5): p. 596-604.
304. Wellcome Trust Case Control, C., Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 2007. 447(7145): p. 661-78.
305. Weersma, R.K., et al., Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut*, 2009. 58(3): p. 388-95.
306. Latiano, A., et al., Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(29): p. 4643-51.
307. Fowler, E.V., et al., ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(10): p. 2519-26.
308. Marquez, A., et al., Role of ATG16L1 Thr300Ala polymorphism in inflammatory bowel disease: a Study in the Spanish population and a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(11): p. 1697-704.
309. Glas, J., et al., The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(3): p. 682-91.
310. Weersma, R.K., et al., Confirmation of multiple Crohn's disease susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort. *Am J Gastroenterol*, 2009. 104(3): p. 630-8.
311. Parkes, M., et al., Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*, 2007. 39(7): p. 830-2.
312. Roberts, R.L., et al., Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun*, 2008. 9(6): p. 561-5.
313. Massey, D.C. and M. Parkes, Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy*, 2007. 3(6): p. 649-51.
314. Latiano, A., et al., Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 2009. 104(1): p. 110-6.
315. Ouburg, S., et al., The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. *Gut*, 2005. 54(3): p. 439-40.
316. Torok, H.P., et al., Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol*, 2004. 112(1): p. 85-91.
317. Pierik, M., et al., Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12(1): p. 1-8.
318. Gewirtz, A.T., et al., Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 290(6): p. G1157-63.

319. McGovern, D.P., et al., Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(10): p. 1245-50.
320. Klein, W., et al., A polymorphism in the IL11 gene is associated with ulcerative colitis. *Genes Immun*, 2002. 3(8): p. 494-6.
321. Takagawa, T., et al., Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(12): p. 1038-43.
322. Fiocchi, C., Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? *Dig Dis*, 2009. 27(3): p. 226-35.
323. Cargill, M., et al., A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*, 2007. 80(2): p. 273-90.
324. Einarsdottir, E., et al., IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet*, 2009. 10: p. 8.
325. Rahman, P., et al., Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(4): p. 1020-5.
326. Sun, S., et al., TLR7/9 antagonists as therapeutics for immune-mediated inflammatory disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007. 6(4): p. 223-35.
327. Wellcome Trust Case Control, C., et al., Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*, 2007. 39(11): p. 1329-37.
328. Goyal, R.K. and I. Hirano, The enteric nervous system. *N Engl J Med*, 1996. 334(17): p. 1106-15.
329. Engel, G.L., Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon. *Gastroenterology*, 1969. 57(3): p. 362-5.
330. Alexander, T., An objective study of psychological factors in ulcerative colitis in children. *Appl Ther*, 1965. 7(10): p. 837-9.
331. Robertson, D.A., et al., Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1989. 30(5): p. 623-6.
332. Helzer, J.E., et al., A controlled study of the association between ulcerative colitis and psychiatric diagnoses. *Dig Dis Sci*, 1982. 27(6): p. 513-8.
333. Helzer, J.E., et al., A study of the association between Crohn's disease and psychiatric illness. *Gastroenterology*, 1984. 86(2): p. 324-30.
334. North, C.S., et al., The relation of ulcerative colitis to psychiatric factors: a review of findings and methods. *Am J Psychiatry*, 1990. 147(8): p. 974-81.
335. Wood, J.D., et al., Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dig Dis Sci*, 2000. 45(2): p. 385-93.
336. Gue, M., et al., Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved. *Am J Physiol*, 1997. 272(1 Pt 1): p. G84-91.
337. Collins, S.M., The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology*, 1996. 111(6): p. 1683-99.

338. Qiu, B.S., et al., The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med*, 1999. 5(10): p. 1178-82.
339. Milde, A.M., O. Enger, and R. Murison, The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. *Physiol Behav*, 2004. 81(1): p. 71-84.
340. Bitton, A., et al., Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*, 2003. 98(10): p. 2203-8.
341. Mardini, H.E., K.E. Kip, and J.W. Wilson, Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity. *Dig Dis Sci*, 2004. 49(3): p. 492-7.
342. Garrett, V.D., et al., The relation between daily stress and Crohn's disease. *J Behav Med*, 1991. 14(1): p. 87-96.
343. Greene, B.R., E.B. Blanchard, and C.K. Wan, Long-term monitoring of psychosocial stress and symptomatology in inflammatory bowel disease. *Behav Res Ther*, 1994. 32(2): p. 217-26.
344. Kiliaan, A.J., et al., Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol*, 1998. 275(5 Pt 1): p. G1037-44.
345. Santos, J., et al., Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol*, 1999. 277(2 Pt 1): p. G391-9.
346. Soderholm, J.D., et al., Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. 283(6): p. G1257-63.
347. 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.
348. Enck, P., et al., Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut*, 1989. 30(4): p. 455-9.
349. 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.
350. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology*, 1988. 94(4): p. 994-8.
351. Saunders, P.R., et al., Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol*, 1994. 267(5 Pt 1): p. G794-9.
352. Velin, A.K., et al., Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut*, 2004. 53(4): p. 494-500.
353. Saunders, P.R., N.P. Hanssen, and M.H. Perdue, Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol*, 1997. 273(2 Pt 1): p. G486-90.
354. Santos, J., et al., Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. 278(6): p. G847-54.
355. Bale, T.L. and W.W. Vale, CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. 44: p. 525-57.
356. Leu, S.J. and V.K. Singh, Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol*, 1992. 143(1): p. 220-7.

357. Singh, V.K., Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression. *J Neuroimmunol*, 1989. 23(3): p. 257-62.
358. Leu, S.J. and V.K. Singh, Modulation of natural killer cell-mediated lysis by corticotropin-releasing neurohormone. *J Neuroimmunol*, 1991. 33(3): p. 253-60.
359. Cantarella, G., et al., Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. *Br J Pharmacol*, 2001. 134(4): p. 837-44.
360. Wilk, M., et al., Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum. *Gastroenterology*, 2002. 123(2): p. 505-15.
361. van Tol, E.A., et al., Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut*, 1996. 39(3): p. 385-92.
362. Kawahito, Y., et al., Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 1995. 37(4): p. 544-51.
363. Muramatsu, Y., et al., Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa. *Peptides*, 2000. 21(12): p. 1799-809.
364. 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.
365. 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.
366. Milne, H.A. and C.L. McWilliam, Considering nursing resource as "caring time". *J Adv Nurs*, 1996. 23(4): p. 810-9.
367. Truelove, S.C., Ulcerative colitis provoked by milk. *Br Med J*, 1961. 1(5220): p. 154-60.
368. Binder, J.H., et al., Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report. *Am J Dig Dis*, 1966. 11(11): p. 858-64.
369. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, Crohn's disease and ulcerative colitis. A review of dietary studies with emphasis on methodologic aspects. *Scand J Gastroenterol*, 1987. 22(4): p. 385-9.
370. Guthy, E., [Crohn's disease and nutritional lipids. Hypothesis on etiology of regional enteritis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 1982. 107(2): p. 71-3.
371. James, A.H., Breakfast and Crohn's disease. *Br Med J*, 1977. 1(6066): p. 943-5.
372. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology*, 1992. 3(1): p. 47-52.
373. 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.
374. Dietary and other risk factors of ulcerative colitis. A case-control study in Japan. Epidemiology Group of the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease in Japan. *J Clin Gastroenterol*, 1994. 19(2): p. 166-71.

375. A case-control study of ulcerative colitis in relation to dietary and other factors in Japan. The Epidemiology Group of the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease in Japan. *J Gastroenterol*, 1995. 30 Suppl 8: p. 9-12.
376. O'Morain, C., et al., Risk factors in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1989. 170: p. 58-60; discussion 66-8.
377. Probert, C.S., et al., Diet of South Asians with inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol*, 1996. 33(3): p. 132-5.
378. Reif, S., et al., Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1997. 40(6): p. 754-60.
379. Russel, M.G. and R.W. Stockbrugger, Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol*, 1996. 31(5): p. 417-27.
380. 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.
381. 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.
382. 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.
383. Kim, Y.I., Can fish oil maintain Crohn's disease in remission? *Nutr Rev*, 1996. 54(8): p. 248-52.
384. Salomon, P., A.A. Kornbluth, and H.D. Janowitz, Treatment of ulcerative colitis with fish oil n-3-omega-fatty acid: an open trial. *J Clin Gastroenterol*, 1990. 12(2): p. 157-61.
385. Stenson, W.F., et al., Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med*, 1992. 116(8): p. 609-14.
386. Lorenz-Meyer, H., et al., Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol*, 1996. 31(8): p. 778-85.
387. Kromann, N. and A. Green, Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, 1980. 208(5): p. 401-6.
388. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair, The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr*, 1980. 33(12): p. 2657-61.
389. Grimble, R.F. and P.S. Tappia, Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z Ernährungswiss*, 1998. 37 Suppl 1: p. 57-65.
390. 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.
391. Belluzzi, A., et al., Polyunsaturated fatty acid pattern and fish oil treatment in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1993. 34(9): p. 1289-90.
392. Macdonald, A., Omega-3 fatty acids as adjunctive therapy in Crohn's disease. *Gastroenterol Nurs*, 2006. 29(4): p. 295-301; quiz 302-3.
393. Hawthorne, A.B., et al., Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut*, 1992. 33(7): p. 922-8.

394. Meister, D. and S. Ghosh, Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ culture: differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(47): p. 7466-72.
395. Barbosa, D.S., et al., Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition*, 2003. 19(10): p. 837-42.
396. Nieto, N., et al., Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr*, 2002. 132(1): p. 11-9.
397. Almallah, Y.Z., et al., Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol*, 2000. 20(1): p. 68-76.
398. Chapman, M.A., et al., Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut*, 1994. 35(1): p. 73-6.
399. Kim, Y.I., Short-chain fatty acids in ulcerative colitis. *Nutr Rev*, 1998. 56(1 Pt 1): p. 17-24.
400. 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.
401. Whorwell, P.J., et al., Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. *Br Med J*, 1979. 1(6160): p. 382.
402. Corrao, G., et al., Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol*, 1998. 27(3): p. 397-404.
403. 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.
404. Koletzko, S., et al., Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *BMJ*, 1989. 298(6688): p. 1617-8.
405. Beaudry, M., R. Dufour, and S. Marcoux, Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr*, 1995. 126(2): p. 191-7.
406. Duffy, L.C., et al., The effects of infant feeding on rotavirus-induced gastroenteritis: a prospective study. *Am J Public Health*, 1986. 76(3): p. 259-63.
407. Howie, P.W., et al., Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ*, 1990. 300(6716): p. 11-6.
408. Pittard, W.B., 3rd, Breast milk immunology. A frontier in infant nutrition. *Am J Dis Child*, 1979. 133(1): p. 83-7.
409. Pittard, W.B., 3rd and K. Bill, Immunoregulation by breast milk cells. *Cell Immunol*, 1979. 42(2): p. 437-41.
410. Bernt, K.M. and W.A. Walker, Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatr Suppl*, 1999. 88(430): p. 27-41.
411. Carver, J.D. and L.A. Barness, Trophic factors for the gastrointestinal tract. *Clin Perinatol*, 1996. 23(2): p. 265-85.
412. Harris, J.E. and A.M. Lammerding, Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: current issues. *J Food Prot*, 2001. 64(12): p. 2103-10.

413. Lerner, A., et al., Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease. Crohn's disease versus ulcerative colitis. *Acta Paediatr Scand*, 1989. 78(3): p. 384-9.
414. Knoflach, P., et al., Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1987. 92(2): p. 479-85.
415. Martini, G.A. and J.W. Brandes, Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr*, 1976. 54(8): p. 367-71.
416. Miller, B., et al., [Sugar consumption in patients with Crohn's disease]. *Verh Dtsch Ges Inn Med*, 1976. 82 Pt 1: p. 922-4.
417. Mayberry, J.F., J. Rhodes, and R.G. Newcombe, Increased sugar consumption in Crohn's disease. *Digestion*, 1980. 20(5): p. 323-6.
418. Geerling, B.J., R.W. Stockbrugger, and R.J. Brummer, Nutrition and inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1999. 230: p. 95-105.
419. Thornton, J.R., P.M. Emmett, and K.W. Heaton, Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985. 290(6484): p. 1786-7.
420. Husain, A. and J.R. Korzenik, Nutritional issues and therapy in inflammatory bowel disease. *Semin Gastrointest Dis*, 1998. 9(1): p. 21-30.
421. Ritchie, J.K., et al., Controlled multicentre therapeutic trial of an unrefined carbohydrate, fibre rich diet in Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987. 295(6597): p. 517-20.
422. Young, E., et al., A population study of food intolerance. *Lancet*, 1994. 343(8906): p. 1127-30.
423. Bischoff, S.C., A. Herrmann, and M.P. Manns, Prevalence of adverse reactions to food in patients with gastrointestinal disease. *Allergy*, 1996. 51(11): p. 811-8.
424. Gjaffer, M.H., P. Cann, and C.D. Holdsworth, Long-term effects of elemental and exclusion diets for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 1991. 5(2): p. 115-25.
425. Pearson, M., et al., Food intolerance and Crohn's disease. *Gut*, 1993. 34(6): p. 783-7.
426. 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.
427. Logan, R.F., et al., Smoking and ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 288(6419): p. 751-3.
428. Calkins, B.M., A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, 1989. 34(12): p. 1841-54.
429. Beaugerie, L., et al., Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(7): p. 2113-6.
430. Somerville, K.W., et al., Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 289(6450): p. 954-6.
431. Franceschi, S., et al., Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol*, 1987. 125(3): p. 445-52.
432. 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.
433. Cottone, M., et al., Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1994. 106(3): p. 643-8.

434. Kane, S.V., M. Flicker, and F. Katz-Nelson, Tobacco use is associated with accelerated clinical recurrence of Crohn's disease after surgically induced remission. *J Clin Gastroenterol*, 2005. 39(1): p. 32-5.
435. Mahid, S.S., et al., Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(4): p. 431-8.
436. van der Heide, F., et al., Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(8): p. 1199-207.
437. Seksik, P., et al., Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(5): p. 734-41.
438. Mokbel, M., et al., [Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998. 22(11): p. 858-62.
439. Boyko, E.J., et al., Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*, 1988. 23(9): p. 1147-52.
440. Samuelsson, S.M., et al., Risk factors for extensive ulcerative colitis and ulcerative proctitis: a population based case-control study. *Gut*, 1991. 32(12): p. 1526-30.
441. Loftus, E.V., Jr., et al., Primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking: a case-control study. *Gastroenterology*, 1996. 110(5): p. 1496-502.
442. Aldhous, M.C., et al., Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2007. 102(3): p. 589-97.
443. Merrett, M.N., et al., Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut*, 1996. 38(3): p. 362-4.
444. Louis, E., et al., Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut*, 2003. 52(4): p. 552-7.
445. Mahid, S.S., et al., The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables. *Dig Dis Sci*, 2007. 52(11): p. 2897-903.
446. Cosnes, J., et al., Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. 13(11): p. 1403-11.
447. Breuer-Katschinski, B.D., N. Hollander, and H. Goebell, Effect of cigarette smoking on the course of Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996. 8(3): p. 225-8.
448. Motley, R.J., et al., Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis. *J Pharm Pharmacol*, 1990. 42(4): p. 288-9.
449. 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.
450. Wang, H., et al., Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 2003. 421(6921): p. 384-8.
451. King, T.E., Jr., D. Savici, and P.A. Campbell, Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis*, 1988. 158(6): p. 1309-16.
452. Geng, Y., et al., Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J Immunol*, 1996. 156(7): p. 2384-90.

453. 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.
454. Hatoum, O.A., et al., Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology*, 2003. 125(1): p. 58-69.
455. Wakefield, A.J., et al., Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 1991. 36(8): p. 1147-50.
456. Pullan, R.D., et al., Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 1994. 330(12): p. 811-5.
457. Aldhous, M.C., et al., Does nicotine influence cytokine profile and subsequent cell cycling/apoptotic responses in inflammatory bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 14(11): p. 1469-82.
458. Ingram, J.R., et al., Nicotine enemas for active Crohn's colitis: an open pilot study. *Gastroenterol Res Pract*, 2008. 2008: p. 237185.
459. Andersson, R.E., et al., Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 2001. 344(11): p. 808-14.
460. Koutroubakis, I.E., I.G. Vlachonikolis, and E.A. Kouroumalis, Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8(4): p. 277-86.
461. de Saussure, P., et al., Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting. *Gastroenterol Clin Biol*, 2007. 31(5): p. 493-7.
462. Selby, W.S., et al., Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course. *Am J Gastroenterol*, 2002. 97(11): p. 2834-8.
463. Uzan, A., et al., [Protective effect of appendectomy on the development of ulcerative colitis. A case-control study]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2001. 25(3): p. 239-42.
464. Frisch, M. and R.J. Biggar, Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 2001. 345(3): p. 222-3; author reply 223-4.
465. 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.
466. Cosnes, J., et al., Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*, 2002. 51(6): p. 803-7.
467. Naganuma, M., et al., Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(4): p. 1123-6.
468. Lakatos, L. and P.L. Lakatos, [Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil*, 2007. 148(5): p. 223-8.
469. Garcia Rodriguez, L.A., et al., Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. 22(4): p. 309-15.
470. Rhodes, J.M., et al., Colonic Crohn's disease and use of oral contraception. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 288(6417): p. 595-6.
471. Lesko, S.M., et al., Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users. *Gastroenterology*, 1985. 89(5): p. 1046-9.

472. Boyko, E.J., et al., Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol*, 1994. 140(3): p. 268-78.
473. Godet, P.G., G.R. May, and L.R. Sutherland, Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1995. 37(5): p. 668-73.
474. Cosnes, J., et al., Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut*, 1999. 45(2): p. 218-22.
475. Fiocchi, C., Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 1998. 115(1): p. 182-205.
476. Shanahan, F., Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. 278(2): p. G191-6.
477. Marteau, P., P. Seksik, and F. Shanahan, Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003. 17(1): p. 47-61.
478. Cong, Y., et al., CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med*, 1998. 187(6): p. 855-64.
479. Shanahan, F., Inflammatory bowel disease: immunodiagnosics, immunotherapeutics, and eotherapeutics. *Gastroenterology*, 2001. 120(3): p. 622-35.
480. Swidsinski, A., et al., Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002. 122(1): p. 44-54.
481. Seksik, P., et al., Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 2003. 52(2): p. 237-42.
482. Huang, G.T., et al., Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1) expression and neutrophil adhesion. *J Clin Invest*, 1996. 98(2): p. 572-83.
483. Jung, H.C., et al., A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*, 1995. 95(1): p. 55-65.
484. Merger, M. and K. Croitoru, Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Semin Immunol*, 1998. 10(1): p. 69-78.
485. Sartor, R.B., Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 1995. 24(3): p. 475-507.
486. 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.
487. Jyonouchi, H., et al., Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010. 21(4 Pt 2): p. e747-55.
488. Baumgart, D.C., et al., Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2009. 157(3): p. 423-36.

489. 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.
490. Vijay-Kumar, M., et al., Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*, 2007. 117(12): p. 3909-21.
491. De Jager, P.L., et al., The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*, 2007. 8(5): p. 387-97.
492. Szebeni, B., et al., Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2008. 151(1): p. 34-41.
493. Cunliffe, R.N., et al., Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2001. 48(2): p. 176-85.
494. Ouellette, A.J. and M.E. Selsted, Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J*, 1996. 10(11): p. 1280-9.
495. O'Neil, D.A., et al., Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*, 1999. 163(12): p. 6718-24.
496. Yamaguchi, N., et al., Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, 2009. 58(4): p. 192-7.
497. Salzman, N.H., M.A. Underwood, and C.L. Bevins, Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*, 2007. 19(2): p. 70-83.
498. Cunliffe, R.N., et al., Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *J Clin Pathol*, 2002. 55(4): p. 298-304.
499. Stange, E.F., et al., [Chronic inflammatory bowel diseases (IBD): novel pathophysiological concepts and their clinical relevance]. *Praxis (Bern 1994)*, 2005. 94(37): p. 1429-32.
500. Wehkamp, J., et al., Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002. 14(7): p. 745-52.
501. Ramasundara, M., et al., Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. 24(2): p. 202-8.
502. Prantera, C., et al., An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol*, 1996. 91(2): p. 328-32.
503. Turunen, U., Farkkila, and V. Valtonen, Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin. *Gastroenterology*, 1999. 117(1): p. 282-3.
504. Colombel, J.F., et al., A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. *Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID)*. *Am J Gastroenterol*, 1999. 94(3): p. 674-8.

505. Turunen, U.M., et al., Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology*, 1998. 115(5): p. 1072-8.
506. Hurst, R.D., et al., Prospective study of the incidence, timing and treatment of pouchitis in 104 consecutive patients after restorative proctocolectomy. *Arch Surg*, 1996. 131(5): p. 497-500; discussion 501-2.
507. Lahat, G., et al., Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(5): p. 557-65.
508. Afdhal, N.H., et al., Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo. *Dig Dis Sci*, 1991. 36(4): p. 449-53.
509. Picciotto, A., et al., Antimycobacterial chemotherapy in inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother*, 1989. 43(2): p. 141-3.
510. Warren, J.B., H.C. Rees, and T.M. Cox, Remission of Crohn's disease with tuberculosis chemotherapy. *N Engl J Med*, 1986. 314(3): p. 182.
511. Schultz, M.G., et al., Remission of Crohn's disease with antimycobacterial chemotherapy. *Lancet*, 1987. 2(8572): p. 1391-2.
512. Shaffer, J.L., et al., Controlled trial of rifampicin and ethambutol in Crohn's disease. *Gut*, 1984. 25(2): p. 203-5.
513. Swift, G.L., et al., Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's disease. *Gut*, 1994. 35(3): p. 363-8.
514. Thomas, G.A., et al., Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut*, 1998. 42(4): p. 497-500.
515. Hulten, K., et al., Antibacterial therapy for Crohn's disease: a review emphasizing therapy directed against mycobacteria. *Dig Dis Sci*, 2000. 45(3): p. 445-56.
516. Graham, M.F., et al., Corticosteroids increase procollagen gene expression, synthesis, and secretion by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*, 1995. 109(5): p. 1454-61.
517. Prantera, C., et al., Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol*, 1994. 89(4): p. 513-8.
518. Borgaonkar, M.R., D.G. MacIntosh, and J.M. Fardy, A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(3): p. 725-9.
519. Gui, G.P., et al., Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 1997. 39(3): p. 393-400.
520. Savidge, R.S., Trimethoprim and sulphamethoxazole in ulcerative colitis. *Postgrad Med J*, 1969. 45: p. Suppl:101-4.
521. Ambrose, N.S., et al., Antibiotic therapy for treatment in relapse of intestinal Crohn's disease. A prospective randomized study. *Dis Colon Rectum*, 1985. 28(2): p. 81-5.
522. Gionchetti, P., et al., Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double-blind, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci*, 1999. 44(6): p. 1220-1.

523. Muniyappa, P., et al., Use and safety of rifaximin in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. 49(4): p. 400-4.
524. Gionchetti, P., et al., Antimicrobials in the management of inflammatory bowel disease. *Digestion*, 2006. 73 Suppl 1: p. 77-85.
525. Gionchetti, P., et al., Management of inflammatory bowel disease: does rifaximin offer any promise? *Chemotherapy*, 2005. 51 Suppl 1: p. 96-102.
526. Bernstein, L.H., et al., Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole. *Gastroenterology*, 1980. 79(3): p. 599.
527. Jakobovits, J. and M.M. Schuster, Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae. *Am J Gastroenterol*, 1984. 79(7): p. 533-40.
528. McKee, R.F. and R.A. Keenan, Perianal Crohn's disease--is it all bad news? *Dis Colon Rectum*, 1996. 39(2): p. 136-42.
529. Brandt, L.J., et al., Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology*, 1982. 83(2): p. 383-7.
530. Schultz, M., et al., IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol*, 1999. 276(6 Pt 1): p. G1461-72.
531. Dianda, L., et al., T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*, 1997. 150(1): p. 91-7.
532. Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 1989. 66(5): p. 365-78.
533. Marteau, P.R., et al., Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr*, 2001. 73(2 Suppl): p. 430S-436S.
534. Fabia, R., et al., The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol*, 1993. 28(2): p. 155-62.
535. Mao, Y., et al., The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology*, 1996. 111(2): p. 334-44.
536. Matsumoto, S., et al., A component of polysaccharide peptidoglycan complex on *Lactobacillus* induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Immunology*, 2009. 128(1 Suppl): p. e170-80.
537. Lin, P.W., et al., *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(8): p. 1205-11.
538. Lee, J.H., et al., *Lactobacillus suntoryeus* inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF-kappaB activation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis*, 2009. 24(2): p. 231-7.
539. Lee, H.S., et al., Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int Immunopharmacol*, 2008. 8(4): p. 574-80.
540. Feighery, L.M., et al., Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and in vitro colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, 2008. 53(9): p. 2495-506.

541. Carroll, I.M., et al., Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 293(4): p. G729-38.
542. Geier, M.S., et al., *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Food Microbiol*, 2007. 114(3): p. 267-74.
543. Kim, N., et al., Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4(+) CD45RB(high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin Immunol*, 2007. 123(1): p. 30-9.
544. Rembacken, B.J., et al., Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*, 1999. 354(9179): p. 635-9.
545. Schreiber, S., et al., Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2001. 120(6): p. 1339-46.
546. McCann, M.L., R.S. Abrams, and R.P. Nelson, Jr., Recolonization therapy with nonadhesive *Escherichia coli* for treatment of inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 730: p. 243-5.
547. Kruis, W., et al., Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997. 11(5): p. 853-8.
548. Henker, J., et al., Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol*, 2008. 46(9): p. 874-5.
549. Imaoka, A., et al., Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(16): p. 2511-6.
550. Miele, E., et al., Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2009. 104(2): p. 437-43.
551. Huynh, H.Q., et al., Probiotic preparation VSL#3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: a pilot study. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(5): p. 760-8.
552. Bibiloni, R., et al., VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2005. 100(7): p. 1539-46.
553. Plein, K. and J. Hotz, Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. *Z Gastroenterol*, 1993. 31(2): p. 129-34.
554. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 2000. 45(7): p. 1462-4.
555. Garcia Vilela, E., et al., Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol*, 2008. 43(7): p. 842-8.
556. Malchow, H.A., Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol*, 1997. 25(4): p. 653-8.

557. Boudeau, J., et al., Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. 18(1): p. 45-56.
558. Llopis, M., et al., *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(2): p. 275-83.
559. Guarner, F., Prebiotics in inflammatory bowel diseases. *Br J Nutr*, 2007. 98 Suppl 1: p. S85-9.
560. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 2007. 117(3): p. 514-21.
561. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 495-549.
562. Neurath, M.F., et al., Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol*, 1997. 27(7): p. 1743-50.
563. Camoglio, L., et al., Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1998. 4(4): p. 285-90.
564. Kallel, L., et al., [Colonic expression of gamma-interferon and interleukin-10 in Crohn's disease and ulcerative colitis]. *Presse Med*, 2005. 34(1): p. 8-12.
565. Fais, S., et al., Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res*, 1994. 14(5): p. 235-8.
566. Fais, S., et al., Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. *Gut*, 1991. 32(4): p. 403-7.
567. Monteleone, G., et al., Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*, 1997. 112(4): p. 1169-78.
568. Parronchi, P., et al., Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*, 1997. 150(3): p. 823-32.
569. Berrebi, D., et al., Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*, 1998. 152(3): p. 667-72.
570. Parrello, T., et al., Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 7234-9.
571. Fuss, I.J., et al., Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*, 1996. 157(3): p. 1261-70.
572. Kadivar, K., et al., Intestinal interleukin-13 in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(5): p. 593-8.
573. Vainer, B., et al., Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine*, 2000. 12(10): p. 1531-6.

574. 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.
575. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, 2008. 28(4): p. 454-67.
576. McGovern, D. and F. Powrie, The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*, 2007. 56(10): p. 1333-6.
577. Elson, C.O., et al., Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*, 2007. 132(7): p. 2359-70.
578. Fujino, S., et al., Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2003. 52(1): p. 65-70.
579. Izcue, A. and F. Powrie, Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology*, 2008. 123(1): p. 6-10.
580. Simpson, S.J., et al., Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol*, 1995. 25(9): p. 2618-25.
581. Nancey, S., et al., CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology*, 2006. 131(2): p. 485-96.
582. Brimnes, J., et al., Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 2005. 174(9): p. 5814-22.
583. Bisping, G., et al., Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, 2001. 123(1): p. 15-22.
584. Fort, M.M., M.W. Leach, and D.M. Rennick, A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol*, 1998. 161(7): p. 3256-61.
585. Saubermann, L.J., et al., Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*, 2000. 119(1): p. 119-28.
586. Ikeda, Y., et al., Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001. 13(7): p. 841-50.
587. Krajina, T., et al., Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol*, 2003. 33(4): p. 1073-83.
588. Verstege, M.I., et al., Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. *J Histochem Cytochem*, 2008. 56(3): p. 233-41.
589. Leon, F., et al., Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol*, 2006. 579: p. 117-32.
590. Hart, A.L., et al., Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2005. 129(1): p. 50-65.
591. Mizoguchi, E., et al., Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol*, 2000. 12(5): p. 597-605.

592. Mishima, Y., et al., Alterations of peripheral blood CD5+ B cells in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2009. 44(2): p. 172-9.
593. Duchmann, R., et al., Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 1995. 102(3): p. 448-55.
594. Mow, W.S., et al., Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2004. 126(2): p. 414-24.
595. Katz, J.A., J. Itoh, and C. Focchi, Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 1999. 15(4): p. 291-7.
596. Mitsuyama, K., et al., Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*, 1995. 36(1): p. 45-9.
597. Mitsuyama, K., et al., IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*, 1994. 96(3): p. 432-6.
598. Shigematsu, S., Therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Kurume Med J*, 1998. 45(2): p. 175-9.
599. Shirachi, A., Therapeutic implications of interleukin-10 in inflammatory bowel disease. *Kurume Med J*, 1998. 45(1): p. 63-7.
600. Tateishi, H., et al., Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion*, 1997. 58(3): p. 271-81.
601. Harada, K., et al., Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in rat experimental colitis. *Digestion*, 1994. 55(3): p. 179-84.
602. Tomoyose, M., et al., Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol*, 1998. 33(4): p. 435-40.
603. Bettelli, E., et al., Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, 2008. 453(7198): p. 1051-7.
604. 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.
605. 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.
606. 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.
607. Kirsner, J.B., Inflammatory bowel disease. Considerations of etiology and pathogenesis. *Acta Gastroenterol Belg*, 1978. 41(9-10): p. 549-73.
608. 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.
609. Grisham, M.B., Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 1994. 344(8926): p. 859-61.
610. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 1996. 271(5 Pt 1): p. C1424-37.

611. Grisham, M.B., D. Jourdain, and D.A. Wink, Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*, 1999. 276(2 Pt 1): p. G315-21.
612. Goke, M. and D.K. Podolsky, Regulation of the mucosal epithelial barrier. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1996. 10(3): p. 393-405.
613. Wilson, A.J. and P.R. Gibson, Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. *Clin Sci (Lond)*, 1997. 93(2): p. 97-108.
614. Olaison, G., R. Sjö Dahl, and C. Tagesson, Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease. A possible pathogenic factor. *Scand J Gastroenterol*, 1990. 25(4): p. 321-8.
615. Sartor, R.B., Postoperative recurrence of Crohn's disease: the enemy is within the fecal stream. *Gastroenterology*, 1998. 114(2): p. 398-400.
616. Mayer, L., et al., Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1991. 100(1): p. 3-12.
617. Kern, F., Jr., et al., The motility of the distal colon in nonspecific ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1951. 19(3): p. 492-503.
618. Collins, S.M., Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 280(3): p. G315-8.
619. Tomita, R. and K. Tanjoh, Role of nitric oxide in the colon of patients with ulcerative colitis. *World J Surg*, 1998. 22(1): p. 88-91; discussion 92.
620. McCafferty, D.M., J.L. Wallace, and K.A. Sharkey, Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat. *Am J Physiol*, 1997. 272(2 Pt 1): p. G272-80.
621. 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.
622. Gabay, C. and I. Kushner, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 1999. 340(6): p. 448-54.
623. Kotler, D.P., Cachexia. *Ann Intern Med*, 2000. 133(8): p. 622-34.
624. Dinarello, C.A., Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis*, 1999. 179 Suppl 2: p. S294-304.
625. 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.
626. 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.
627. Dyer, N.H., et al., Anaemia in Crohn's disease. *Q J Med*, 1972. 41(164): p. 419-36.
628. 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.
629. 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.

630. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*, 1992. 210(3): p. 649-63.
631. Gumaste, V., et al., Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*, 1989. 34(9): p. 1457-61.
632. Bell, D.W., et al., Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia. *South Med J*, 1981. 74(3): p. 359-61.
633. 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.
634. 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.
635. Loftus, E.V., Jr., et al., Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(9): p. 2308-12.
636. Connell, W.R., et al., Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 1994. 343(8908): p. 1249-52.
637. Caspi, O., et al., The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not? *Leuk Lymphoma*, 1995. 17(3-4): p. 255-62.
638. 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.
639. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2004. 126(6): p. 1634-48.
640. Rutter, M., et al., Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2004. 126(2): p. 451-9.
641. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol*, 2005. 26(6): p. 318-25.
642. Eberhart, C.E., et al., Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994. 107(4): p. 1183-8.
643. Sinicrope, F.A. and S. Gill, Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. 23(1-2): p. 63-75.
644. Szlosarek, P.W. and F.R. Balkwill, Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*, 2003. 4(9): p. 565-73.
645. Burstein, E. and E.R. Fearon, Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 464-7.
646. Grilli, M., J.J. Chiu, and M.J. Lenardo, NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol*, 1993. 143: p. 1-62.
647. Li, Q. and I.M. Verma, NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(10): p. 725-34.
648. Siebenlist, U., K. Brown, and E. Claudio, Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(6): p. 435-45.
649. Dejardin, E., The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*, 2006. 72(9): p. 1161-79.

650. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 1994. 10: p. 405-55.
651. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 1988. 242(4878): p. 540-6.
652. Cheng, Q., et al., NK-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter. *J Biol Chem*, 1994. 269(18): p. 13551-7.
653. Huxford, T., S. Malek, and G. Ghosh, Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1999. 64: p. 533-40.
654. Greten, F.R. and M. Karin, The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*, 2004. 206(2): p. 193-9.
655. Maniatis, T., Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex. *Science*, 1997. 278(5339): p. 818-9.
656. Mercurio, F., et al., IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, 1997. 278(5339): p. 860-6.
657. Woronicz, J.D., et al., IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science*, 1997. 278(5339): p. 866-9.
658. Zandi, E., et al., The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, 1997. 91(2): p. 243-52.
659. Karin, M. and F.R. Greten, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(10): p. 749-59.
660. Muller, J.M., H.W. Ziegler-Heitbrock, and P.A. Baeuerle, Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology*, 1993. 187(3-5): p. 233-56.
661. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 141-79.
662. Hayden, M.S. and S. Ghosh, Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 2004. 18(18): p. 2195-224.
663. Moynagh, P.N., The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 20): p. 4589-92.
664. Lenardo, M.J. and D. Baltimore, NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 1989. 58(2): p. 227-9.
665. Baeuerle, P.A., The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1072(1): p. 63-80.
666. Neurath, M.F., et al., Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*, 1996. 2(9): p. 998-1004.
667. Conner, E.M., et al., Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. 282(3): p. 1615-22.
668. Herfarth, H., et al., Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol*, 2000. 120(1): p. 59-65.

669. Jobin, C., et al., Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut*, 1998. 42(6): p. 779-87.
670. Rogler, G., et al., Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 1998. 115(2): p. 357-69.
671. Wang, L., et al., IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol*, 2003. 171(6): p. 3194-201.
672. Nenci, A., et al., Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 2007. 446(7135): p. 557-61.
673. Zaph, C., et al., Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*, 2007. 446(7135): p. 552-6.
674. Lewis, A.J. and A.M. Manning, New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. 3(4): p. 489-94.
675. Bianchi, M., et al., Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanyldiazotane. *J Exp Med*, 1996. 183(3): p. 927-36.
676. Tracey, K.J., Suppression of TNF and other proinflammatory cytokines by the tetravalent guanyldiazotane CNI-1493. *Prog Clin Biol Res*, 1998. 397: p. 335-43.
677. Mitsuyama, K., et al., Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med*, 2006. 17(3): p. 449-55.
678. Waetzig, G.H., et al., p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 2002. 168(10): p. 5342-51.
679. Assi, K., et al., The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology*, 2006. 118(1): p. 112-21.
680. Wirtz, S., et al., Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF-plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol*, 1999. 162(4): p. 1884-8.
681. Takeda, K., et al., Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 1999. 10(1): p. 39-49.
682. Tontonoz, P., et al., mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 1994. 8(10): p. 1224-34.
683. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 1994. 79(7): p. 1147-56.
684. Su, C.G., et al., A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, 1999. 104(4): p. 383-9.
685. Liang, H.L. and Q. Ouyang, A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(1): p. 114-9.
686. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, Ulcerative colitis practice guidelines in adults. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*, 1997. 92(2): p. 204-11.

687. Sutherland, L.R., G.R. May, and E.A. Shaffer, Sulfasalazine revisited: a meta-analysis of 5-aminosalicylic acid in the treatment of ulcerative colitis. *Ann Intern Med*, 1993. 118(7): p. 540-9.
688. Sutherland, L.R., D.E. Roth, and P.L. Beck, Alternatives to Sulfasalazine: A Meta-analysis of 5-ASA in the Treatment of Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 1997. 3(2): p. 65-78.
689. Marshall, J.K. and E.J. Irvine, Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 1997. 40(6): p. 775-81.
690. Marshall, J.K. and E.J. Irvine, Putting rectal 5-aminosalicylic acid in its place: the role in distal ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(7): p. 1628-36.
691. Cohen, R.D., et al., A meta-analysis and overview of the literature on treatment options for left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(5): p. 1263-76.
692. Azad Khan, A.K., J. Piri, and S.C. Truelove, An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet*, 1977. 2(8044): p. 892-5.
693. van Hees, P.A., J.H. Bakker, and J.H. van Tongeren, Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Gut*, 1980. 21(7): p. 632-5.
694. Sutherland, L., et al., Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(4): p. CD000544.
695. Wahl, C., et al., Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*, 1998. 101(5): p. 1163-74.
696. Weber, C.K., et al., Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of I kappa B kinases alpha and beta. *Gastroenterology*, 2000. 119(5): p. 1209-18.
697. Martinez-Augustin, O., et al., Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with the modulation of NF-kappaB but not PPAR-gamma signaling. *Pharmacogenet Genomics*, 2009. 19(5): p. 363-72.
698. Egan, L.J., et al., Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem*, 1999. 274(37): p. 26448-53.
699. Tromm, A., T. Griga, and B. May, Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties. *Hepatogastroenterology*, 1999. 46(30): p. 3124-35.
700. Small, R.E. and C.C. Schraa, Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical applications of mesalamine for the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacotherapy*, 1994. 14(4): p. 385-98.
701. Reinacher-Schick, A., et al., Mesalazine changes apoptosis and proliferation in normal mucosa of patients with sporadic polyps of the large bowel. *Endoscopy*, 2000. 32(3): p. 245-54.
702. Bus, P.J., et al., Mesalazine-induced apoptosis of colorectal cancer: on the verge of a new chemopreventive era? *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. 13(11): p. 1397-402.
703. Liptay, S., et al., Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol*, 1999. 128(7): p. 1361-9.

704. Shanahan, F., et al., Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor. *Immunopharmacology*, 1990. 20(3): p. 217-24.
705. Crotty, B., et al., Inhibition of binding of interferon-gamma to its receptor by salicylates used in inflammatory bowel disease. *Gut*, 1992. 33(10): p. 1353-7.
706. Lauritsen, K., et al., Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1986. 91(4): p. 837-44.
707. Dallegri, F., et al., Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. *Gut*, 1990. 31(2): p. 184-6.
708. Sandoval, M., et al., Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine. *Gastroenterology*, 1997. 113(5): p. 1480-8.
709. Burrell, G.C., et al., Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 1997. 113(5): p. 1474-9.
710. MacDermott, R.P., Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol*, 2000. 95(12): p. 3343-5.
711. Loftus, E.V., Jr., S.V. Kane, and D. Bjorkman, Systematic review: short-term adverse effects of 5-aminosalicylic acid agents in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. 19(2): p. 179-89.
712. Ransford, R.A. and M.J. Langman, Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. *Gut*, 2002. 51(4): p. 536-9.
713. Van Staa, T.P., et al., 5-aminosalicylic acids and the risk of renal disease: a large British epidemiologic study. *Gastroenterology*, 2004. 126(7): p. 1733-9.
714. Bergman, R. and M. Parkes, Systematic review: the use of mesalazine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. 23(7): p. 841-55.
715. van Staa, T.P., et al., 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut*, 2005. 54(11): p. 1573-8.
716. Rasmussen, S.N., et al., 5-Aminosalicylic acid in the treatment of Crohn's disease. A 16-week double-blind, placebo-controlled, multicentre study with Pentasa. *Scand J Gastroenterol*, 1987. 22(7): p. 877-83.
717. Mahida, Y.R. and D.P. Jewell, Slow-release 5-amino-salicylic acid (Pentasa) for the treatment of active Crohn's disease. *Digestion*, 1990. 45(2): p. 88-92.
718. Camma, C., et al., Mesalamine in the maintenance treatment of Crohn's disease: a meta-analysis adjusted for confounding variables. *Gastroenterology*, 1997. 113(5): p. 1465-73.
719. Castiglione, F., et al., Antibiotic treatment of small bowel bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. 18(11-12): p. 1107-12.
720. Fazio, V.W., et al., Ileal pouch-anal anastomoses complications and function in 1005 patients. *Ann Surg*, 1995. 222(2): p. 120-7.

721. Madden, M.V., A.S. McIntyre, and R.J. Nicholls, Double-blind crossover trial of metronidazole versus placebo in chronic unremitting pouchitis. *Dig Dis Sci*, 1994. 39(6): p. 1193-6.
722. Benchimol, E.I., et al., Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(2): p. CD006792.
723. Singleton, J.W., et al., National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs. *Gastroenterology*, 1979. 77(4 Pt 2): p. 870-82.
724. Bjarnason, I., et al., Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1997. 40(2): p. 228-33.
725. Abitbol, V., et al., Metabolic bone assessment in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1995. 108(2): p. 417-22.
726. Truelove, S.C., G. Watkinson, and G. Draper, Comparison of corticosteroid and sulphasalazine therapy in ulcerative colitis. *Br Med J*, 1962. 2(5321): p. 1708-11.
727. Baron, J.H., et al., Out-patient treatment of ulcerative colitis. Comparison between three doses of oral prednisone. *Br Med J*, 1962. 2(5302): p. 441-3.
728. Lennard-Jones, J.E., et al., An assessment of prednisone, salazopyrin, and topical hydrocortisone hemisuccinate used as out-patient treatment for ulcerative colitis. *Gut*, 1960. 1: p. 217-22.
729. Lofberg, R., et al., Oral budesonide versus prednisolone in patients with active extensive and left-sided ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1996. 110(6): p. 1713-8.
730. Summers, R.W., et al., National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology*, 1979. 77(4 Pt 2): p. 847-69.
731. Malchow, H., et al., European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology*, 1984. 86(2): p. 249-66.
732. Modigliani, R., et al., Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. *Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives*. *Gastroenterology*, 1990. 98(4): p. 811-8.
733. Tiede, I., et al., CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*, 2003. 111(8): p. 1133-45.
734. McGovern, D.P., et al., Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology*, 2002. 122(3): p. 838-9.
735. Bowen, D.G. and W.S. Selby, Use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease previously intolerant of azathioprine. *Dig Dis Sci*, 2000. 45(9): p. 1810-3.
736. Lennard, L., The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992. 43(4): p. 329-39.
737. Morgan, S.L., et al., Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*, 1994. 121(11): p. 833-41.
738. Gorlick, R., et al., Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med*, 1996. 335(14): p. 1041-8.

739. McDonald, J.W., et al., Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(2): p. CD000297.
740. Ogata, H., et al., A randomised dose finding study of oral tacrolimus (FK506) therapy in refractory ulcerative colitis. *Gut*, 2006. 55(9): p. 1255-62.
741. Schreiber, S., et al., Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. *Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. Gastroenterology*, 2000. 119(6): p. 1461-72.
742. Fedorak, R.N., et al., Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology*, 2000. 119(6): p. 1473-82.
743. Headstrom, P.D., S.J. Rulyak, and S.D. Lee, Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 14(2): p. 217-23.
744. in *Nutrition Support for Adults: Oral Nutrition Support, Enteral Tube Feeding and Parenteral Nutrition*. 2006: London.
745. Langholz, E., et al., Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1992. 103(5): p. 1444-51.
746. Jess, T., et al., Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(4): p. 481-9.
747. Hoie, O., et al., Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology*, 2007. 132(2): p. 507-15.
748. Bojic, D., et al., Long-term outcome after admission for acute severe ulcerative colitis in Oxford: the 1992-1993 cohort. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(6): p. 823-8.
749. Moskovitz, D.N., et al., Incidence of colectomy during long-term follow-up after cyclosporine-induced remission of severe ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. 4(6): p. 760-5.
750. Fernandez-Banares, F., et al., Azathioprine is useful in maintaining long-term remission induced by intravenous cyclosporine in steroid-refractory severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 1996. 91(12): p. 2498-9.
751. Mahid, S.S., et al., Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*, 2006. 81(11): p. 1462-71.
752. Cosnes, J., et al., Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1996. 110(2): p. 424-31.
753. Duffy, L.C., et al., Cigarette smoking and risk of clinical relapse in patients with Crohn's disease. *Am J Prev Med*, 1990. 6(3): p. 161-6.
754. Reese, G.E., et al., The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int J Colorectal Dis*, 2008. 23(12): p. 1213-21.
755. Sutherland, L.R., et al., Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1990. 98(5 Pt 1): p. 1123-8.

756. Johnson, G.J., J. Cosnes, and J.C. Mansfield, Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. 21(8): p. 921-31.
757. Kefalakes, H., et al., Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *Eur J Clin Pharmacol*, 2009. 65(10): p. 963-70.
758. Takeuchi, K., et al., Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. 4(2): p. 196-202.
759. Richards, C.D., et al., Adenovirus vectors for cytokine gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 762: p. 282-92; discussion 292-3.
760. Wilson, J.M., Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med*, 1996. 334(18): p. 1185-7.
761. Chao, H., et al., Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines. *Gene Ther*, 1999. 6(10): p. 1695-704.
762. During, M.J., et al., Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med*, 1998. 4(10): p. 1131-5.
763. Abe, A., et al., In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein. *J Virol*, 1998. 72(8): p. 6356-61.
764. MacPherson, B.R. and C.J. Pfeiffer, Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*, 1978. 17(2): p. 135-50.
765. Rachmilewitz, D., F. Karmeli, and E. Okon, Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology*, 1995. 109(1): p. 98-106.
766. Satoh, H., et al., New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Jpn J Pharmacol*, 1997. 73(4): p. 299-309.
767. Barada, K.A., et al., Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat. *Life Sci*, 2006. 79(21): p. 2032-42.
768. 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.
769. Tanaka, T., et al., A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 2003. 94(11): p. 965-73.
770. Dieleman, L.A., et al., Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*, 1994. 107(6): p. 1643-52.
771. Rath, H.C., et al., Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun*, 2001. 69(4): p. 2277-85.
772. Dieleman, L.A., et al., Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 1998. 114(3): p. 385-91.

773. Cooper, H.S., et al., Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 1993. 69(2): p. 238-49.
774. Cooper, H.S., et al., Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*, 2000. 21(4): p. 757-68.
775. Neurath, M.F., et al., Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*, 1995. 182(5): p. 1281-90.
776. Fichtner-Feigl, S., et al., Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*, 2005. 115(11): p. 3057-71.
777. Elson, C.O., et al., Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol*, 1996. 157(5): p. 2174-85.
778. Neurath, M.F., et al., Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med*, 1996. 183(6): p. 2605-16.
779. Elson, C.O., Y. Cong, and J. Sundberg, The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis. *Int Rev Immunol*, 2000. 19(1): p. 63-75.
780. Strober, W., K. Nakamura, and A. Kitani, The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 2001. 107(6): p. 667-70.
781. Pizarro, T.T., et al., SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. 17(12): p. 2566-84.
782. Kuhn, R., et al., Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993. 75(2): p. 263-74.
783. Sadlack, B., et al., Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 1993. 75(2): p. 253-61.
784. Mombaerts, P., et al., Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*, 1993. 75(2): p. 274-82.
785. Kontoyiannis, D., et al., Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med*, 2002. 196(12): p. 1563-74.
786. Hammer, R.E., et al., Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*, 1990. 63(5): p. 1099-112.
787. Watanabe, M., et al., Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med*, 1998. 187(3): p. 389-402.
788. Panwala, C.M., J.C. Jones, and J.L. Viney, A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol*, 1998. 161(10): p. 5733-44.
789. Rudolph, U., et al., Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat Genet*, 1995. 10(2): p. 143-50.
790. Hermiston, M.L. and J.I. Gordon, Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*, 1995. 270(5239): p. 1203-7.

791. Morrissey, P.J., et al., CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1993. 178(1): p. 237-44.
792. Powrie, F., et al., Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol*, 1993. 5(11): p. 1461-71.
793. Powrie, F., et al., Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, 1994. 1(7): p. 553-62.
794. Mudter, J., et al., A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology*, 2002. 70(3): p. 170-6.
795. Brandtzaeg, P., Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*, 2009. 70(6): p. 505-15.
796. Asquith, M. and F. Powrie, An innately dangerous balancing act: intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer. *J Exp Med*, 2010. 207(8): p. 1573-7.
797. Manichanh, C., et al., The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. 9(10): p. 599-608.
798. Scupham, A.J., et al., Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol*, 2006. 72(1): p. 793-801.
799. Furuse, K., et al., Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. *J Gen Virol*, 1983. 64 (Pt 9): p. 2039-43.
800. Eckburg, P.B., et al., Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005. 308(5728): p. 1635-8.
801. Louis, P., et al., Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol*, 2007. 102(5): p. 1197-208.
802. Zoetendal, E.G., E.E. Vaughan, and W.M. de Vos, A microbial world within us. *Mol Microbiol*, 2006. 59(6): p. 1639-50.
803. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1998. 64(10): p. 3854-9.
804. Clemente, J.C., et al., The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 2012. 148(6): p. 1258-70.
805. Round, J.L., et al., The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 2011. 332(6032): p. 974-7.
806. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(5): p. 313-23.
807. Arnold, I.C., et al., *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2011. 121(8): p. 3088-93.
808. Ley, R.E., et al., Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): p. 11070-5.
809. Pflughoeft, K.J. and J. Versalovic, Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol*, 2012. 7: p. 99-122.

810. Turnbaugh, P.J., et al., The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 2009. 1(6): p. 6ra14.
811. Brown, L.M., *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, 2000. 22(2): p. 283-97.
812. Spor, A., O. Koren, and R. Ley, Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9(4): p. 279-90.
813. Perry, S., et al., Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. *Emerg Infect Dis*, 2006. 12(11): p. 1701-8.
814. Dicksved, J., et al., Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J*, 2008. 2(7): p. 716-27.
815. Mowat, A.M., Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(4): p. 331-41.
816. Herbrand, H., et al., Dynamics and function of solitary intestinal lymphoid tissue. *Crit Rev Immunol*, 2008. 28(1): p. 1-13.
817. Sansonetti, P.J., Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008. 24(4): p. 435-9.
818. Hooper, L.V., Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol*, 2009. 7(5): p. 367-74.
819. Ley, R.E., et al., Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 2008. 6(10): p. 776-88.
820. Chow, J., et al., Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*, 2010. 107: p. 243-74.
821. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 2006. 7(7): p. 688-93.
822. Sanchez de Medina, F., et al., Host-microbe interactions: the difficult yet peaceful coexistence of the microbiota and the intestinal mucosa. *Br J Nutr*, 2013. 109 Suppl 2: p. S12-20.
823. Ishii, K.J., et al., Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*, 2008. 3(6): p. 352-63.
824. O'Neill, L.A., K.A. Fitzgerald, and A.G. Bowie, The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*, 2003. 24(6): p. 286-90.
825. Miggin, S.M. and L.A. O'Neill, New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol*, 2006. 80(2): p. 220-6.
826. Fitzgerald, K.A., et al., IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 2003. 4(5): p. 491-6.
827. McWhirter, S.M., et al., IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 233-8.
828. Inohara, et al., NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 2005. 74: p. 355-83.
829. Girardin, S.E., et al., Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 2003. 300(5625): p. 1584-7.
830. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun*, 2004. 72(3): p. 1487-95.

831. Lala, S., et al., Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*, 2003. 125(1): p. 47-57.
832. Vaishnava, S., et al., The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 2011. 334(6053): p. 255-8.
833. Ismail, A.S., et al., Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(21): p. 8743-8.
834. Rehman, A., et al., Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*, 2011. 60(10): p. 1354-62.
835. Biswas, A., T. Petnicki-Ocwieja, and K.S. Kobayashi, Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*, 2012. 90(1): p. 15-24.
836. Purchiaroni, F., et al., The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013. 17(3): p. 323-33.
837. Garside, P., O. Millington, and K.M. Smith, The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1029: p. 9-15.
838. Suzuki, R., et al., Localization of intestinal intraepithelial T lymphocytes involves regulation of alphaEbeta7 expression by transforming growth factor-beta. *Int Immunol*, 2002. 14(4): p. 339-45.
839. Macdonald, T.T. and G. Monteleone, Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 2005. 307(5717): p. 1920-5.
840. Tamboli, C.P., et al., Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2004. 53(1): p. 1-4.
841. Frank, D.N., et al., Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol*, 2011. 19(9): p. 427-34.
842. Walker, A.W. and T.D. Lawley, Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res*, 2013. 69(1): p. 75-86.
843. Ramakrishna, B.S. and V.I. Mathan, Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids. *Gut*, 1993. 34(9): p. 1215-8.
844. Sokol, H., et al., Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(8): p. 1183-9.
845. Lupp, C., et al., Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(3): p. 204.
846. Stecher, B., et al., *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 2007. 5(10): p. 2177-89.
847. Garrett, W.S., et al., Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*, 2010. 8(3): p. 292-300.
848. Patwa, L.G., et al., Chronic intestinal inflammation induces stress-response genes in commensal *Escherichia coli*. *Gastroenterology*, 2011. 141(5): p. 1842-51 e1-10.
849. Carvalho, F.A., et al., Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe*, 2012. 12(2): p. 139-52.

850. Raffatellu, M., et al., Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(5): p. 476-86.
851. Winter, S.E., et al., Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 2010. 467(7314): p. 426-9.
852. Stelter, C., et al., Salmonella-induced mucosal lectin RegIII β kills competing gut microbiota. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e20749.
853. Thiennimitr, P., et al., Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(42): p. 17480-5.
854. Liu, J.Z., et al., Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. *Cell Host Microbe*, 2012. 11(3): p. 227-39.
855. Artis, D., Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(6): p. 411-20.
856. Willing, B.P., S.L. Russell, and B.B. Finlay, Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9(4): p. 233-43.
857. Smith, E.A. and G.T. Macfarlane, Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol*, 1996. 81(3): p. 288-302.
858. Hopkins, M.J. and G.T. Macfarlane, Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. *Appl Environ Microbiol*, 2003. 69(4): p. 1920-7.
859. Corr, S.C., C. Hill, and C.G. Gahan, Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res*, 2009. 56: p. 1-15.
860. Reid, G., et al., Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9(1): p. 27-38.
861. Jawhara, S. and S. Mordon, In vivo imaging of bioluminescent *Escherichia coli* in a cutaneous wound infection model for evaluation of an antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. 48(9): p. 3436-41.
862. Jawhara, S. and S. Mordon, Monitoring of bactericidal action of laser by in vivo imaging of bioluminescent *E. coli* in a cutaneous wound infection. *Lasers Med Sci*, 2006. 21(3): p. 153-9.
863. Siragusa, G.R., et al., Real-time monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to beef carcass surface tissues with a bioluminescent reporter. *Appl Environ Microbiol*, 1999. 65(4): p. 1738-45.
864. Burns-Guydish, S.M., et al., Monitoring age-related susceptibility of young mice to oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection using an in vivo murine model. *Pediatr Res*, 2005. 58(1): p. 153-8.
865. Contag, C.H., et al., Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol*, 1995. 18(4): p. 593-603.
866. Maoz, A., et al., Sensitive in situ monitoring of a recombinant bioluminescent *Yersinia enterocolitica* reporter mutant in real time on Camembert cheese. *Appl Environ Microbiol*, 2002. 68(11): p. 5737-40.

867. Rajashekara, G., et al., Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (virB4), GR024 (galE), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infect Immun*, 2006. 74(5): p. 2925-36.
868. Kadurugamuwa, J.L., et al., Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infect Immun*, 2003. 71(2): p. 882-90.
869. Wiles, S., et al., Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell Microbiol*, 2004. 6(10): p. 963-72.
870. Riedel, C.U., et al., Construction of p16Slux, a novel vector for improved bioluminescent labeling of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2007. 73(21): p. 7092-5.
871. Barthold, S.W., et al., Transmissible murine colonic hyperplasia. *Vet Pathol*, 1978. 15(2): p. 223-36.
872. Wales, A.D., M.J. Woodward, and G.R. Pearson, Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol*, 2005. 132(1): p. 1-26.
873. Deng, W., et al., Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun*, 2001. 69(10): p. 6323-35.
874. Schauer, D.B. and S. Falkow, Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun*, 1993. 61(6): p. 2486-92.
875. Schauer, D.B., et al., Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(8): p. 2064-8.
876. MacDonald, T.T., et al., Host defences to *Citrobacter rodentium*. *Int J Med Microbiol*, 2003. 293(1): p. 87-93.
877. Vallance, B.A., et al., Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, 2003. 71(6): p. 3443-53.
878. Luperchio, S.A. and D.B. Schauer, Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect*, 2001. 3(4): p. 333-40.
879. Higgins, L.M., et al., *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 1999. 67(6): p. 3031-9.
880. Zheng, Y., et al., Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*, 2008. 14(3): p. 282-9.
881. Ishigame, H., et al., Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 2009. 30(1): p. 108-19.
882. Simmons, C.P., et al., Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol*, 2002. 168(4): p. 1804-12.
883. Bry, L., M. Brigl, and M.B. Brenner, CD4+ T-cell effector functions and costimulatory requirements essential for surviving mucosal infection with *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, 2006. 74(1): p. 673-81.

884. Simmons, C.P., et al., Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, 2003. 71(9): p. 5077-86.
885. Burlakova, E.B., S.A. Krashakov, and N.G. Khrapova, The role of tocopherols in biomembrane lipid peroxidation. *Membr Cell Biol*, 1998. 12(2): p. 173-211.
886. Galan, J.E. and H. Wolf-Watz, Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 2006. 444(7119): p. 567-73.
887. Galan, J.E., Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(6): p. 571-9.
888. Eckmann, L., et al., Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. *J Biol Chem*, 2000. 275(19): p. 14084-94.
889. Guiney, D.G., The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. 289: p. 131-50.
890. Bruno, V.M., et al., *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog*, 2009. 5(8): p. e1000538.
891. Huang, F.C., Upregulation of *Salmonella*-induced IL-6 production in Caco-2 cells by PJ-34, PARP-1 inhibitor: involvement of PI3K, p38 MAPK, ERK, JNK, and NF-kappaB. *Mediators Inflamm*, 2009. 2009: p. 103890.
892. Martins, F.S., et al., Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes Infect*, 2013. 15(4): p. 270-9.
893. Hobbie, S., et al., Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 1997. 159(11): p. 5550-9.
894. Sartor, R.B., Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2008. 134(2): p. 577-94.
895. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(43): p. 16731-6.
896. Pruteanu, M., et al., Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. 17(5): p. 1189-200.
897. Clayton, E.M., et al., The vexed relationship between *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: an assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission. *Am J Gastroenterol*, 2009. 104(5): p. 1162-9.
898. Knight, P., B.J. Campbell, and J.M. Rhodes, Host-bacteria interaction in inflammatory bowel disease. *Br Med Bull*, 2008. 88(1): p. 95-113.
899. Sewell, G.W., D.J. Marks, and A.W. Segal, The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model. *Curr Opin Immunol*, 2009. 21(5): p. 506-13.
900. Peterson, D.E., et al., Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 2011. 22 Suppl 6: p. vi78-84.

901. Naidu, M.U., et al., Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. *Neoplasia*, 2004. 6(5): p. 423-31.
902. Sonis, S.T., The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(4): p. 277-84.
903. Logan, R.M., et al., Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009. 63(2): p. 239-51.
904. Vera-Llonch, M., et al., Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer*, 2006. 106(2): p. 329-36.
905. Elting, L.S., et al., Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. 68(4): p. 1110-20.
906. Vera-Llonch, M., et al., Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. *Support Care Cancer*, 2007. 15(5): p. 491-6.
907. Elting, L.S., et al., The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer*, 2003. 98(7): p. 1531-9.
908. Avritscher, E.B., C.D. Cooksley, and L.S. Elting, Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Semin Oncol Nurs*, 2004. 20(1): p. 3-10.
909. Treister, N. and S. Sonis, Mucositis: biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007. 15(2): p. 123-9.
910. Sonis, S.T., et al., Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*, 2004. 100(9 Suppl): p. 1995-2025.
911. Sonis, S.T., et al., Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*, 2000. 36(4): p. 373-81.
912. Dorr, W., et al., Proliferation equivalent of 'accelerated repopulation' in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Biol*, 1994. 66(2): p. 157-67.
913. Lalla, R.V., S.T. Sonis, and D.E. Peterson, Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am*, 2008. 52(1): p. 61-77, viii.
914. Cheng, K.K., Oral mucositis, dysfunction, and distress in patients undergoing cancer therapy. *J Clin Nurs*, 2007. 16(11): p. 2114-21.
915. Raber-Durlacher, J.E., et al., Oral complications and management considerations in patients treated with high-dose chemotherapy. *Support Cancer Ther*, 2004. 1(4): p. 219-29.
916. Cheng, K.K., et al., Evaluation of an oral care protocol intervention in the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in paediatric cancer patients. *Eur J Cancer*, 2001. 37(16): p. 2056-63.
917. Levy-Polack, M.P., P. Sebelli, and N.L. Polack, Incidence of oral complications and application of a preventive protocol in children with acute leukemia. *Spec Care Dentist*, 1998. 18(5): p. 189-93.
918. Borowski, B., et al., Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomised controlled trial comparing two protocols of dental care. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1994. 30B(2): p. 93-7.

919. Aframian, D.J., R.V. Lalla, and D.E. Peterson, Management of dental patients taking common hemostasis-altering medications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007. 103 Suppl: p. S45 e1-11.
920. Gibson, R.J., et al., Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*, 2013. 21(1): p. 313-26.
921. Delia, P., et al., Prevention of radiation-induced diarrhea with the use of VSL#3, a new high-potency probiotic preparation. *Am J Gastroenterol*, 2002. 97(8): p. 2150-2.
922. Osterlund, P., et al., Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *Br J Cancer*, 2007. 97(8): p. 1028-34.
923. Urbancsek, H., et al., Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of *Antibiophilus* in patients with radiation-induced diarrhoea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001. 13(4): p. 391-6.
924. Koukourakis, M.I., et al., Hypofractionated accelerated radiochemotherapy with cytoprotection (Chemo-HypoARC) for inoperable non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res*, 2007. 27(5B): p. 3625-31.
925. Martenson, J.A., Jr., et al., Olsalazine is contraindicated during pelvic radiation therapy: results of a double-blind, randomized clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1996. 35(2): p. 299-303.
926. Shukla, P., et al., Circadian variation in radiation-induced intestinal mucositis in patients with cervical carcinoma. *Cancer*, 2010. 116(8): p. 2031-5.
927. Safra, T., et al., Improved quality of life with hyperbaric oxygen therapy in patients with persistent pelvic radiation-induced toxicity. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008. 20(4): p. 284-7.
928. Sidik, S., et al., Does hyperbaric oxygen administration decrease side effect and improve quality of life after pelvic radiation? *Acta Med Indones*, 2007. 39(4): p. 169-73.
929. Dorr, W., K. Heider, and K. Spekl, Reduction of oral mucositis by palifermin (rHuKGF): dose-effect of rHuKGF. *Int J Radiat Biol*, 2005. 81(8): p. 557-65.
930. Fehrmann, A. and W. Dorr, Effect of EGFR-inhibition on the radiation response of oral mucosa: experimental studies in mouse tongue epithelium. *Int J Radiat Biol*, 2005. 81(6): p. 437-43.
931. Gehrisch, A. and W. Dorr, Effects of systemic or topical administration of sodium selenite on early radiation effects in mouse oral mucosa. *Strahlenther Onkol*, 2007. 183(1): p. 36-42.
932. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(5): p. 330-8.
933. Gradishar, W.J. and E.E. Vokes, 5-Fluorouracil cardiotoxicity: a critical review. *Ann Oncol*, 1990. 1(6): p. 409-14.
934. Cakir, Y. and S.W. Ballinger, Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*, 2005. 7(5-6): p. 726-40.
935. Duncan, M. and G. Grant, Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. 18(9): p. 853-74.
936. Anilkumar, T.V., et al., The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts. *Br J Cancer*, 1992. 65(4): p. 552-8.

937. Inomata, A., I. Horii, and K. Suzuki, 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? *Toxicol Lett*, 2002. 133(2-3): p. 231-40.
938. Keefe, D.M., et al., Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*, 2000. 47(5): p. 632-7.
939. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, 2006. 72(11): p. 1493-505.
940. Leitao, R.F., et al., Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. 59(5): p. 603-12.
941. Symonds, R.P., Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. *Br J Cancer*, 1998. 77(10): p. 1689-95.
942. Yeoh, A.S., et al., Nuclear factor kappaB (NFkappaB) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005. 63(5): p. 1295-303.
943. Logan, R.M., et al., Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol Ther*, 2008. 7(7): p. 1139-45.
944. Logan, R.M., et al., Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008. 62(1): p. 33-41.
945. Stringer, A.M., et al., Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. *Int J Exp Pathol*, 2009. 90(5): p. 489-99.
946. Stringer, A.M., et al., Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. 234(4): p. 430-41.
947. Stringer, A.M., et al., Irinotecan-induced mucositis is associated with changes in intestinal mucins. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009. 64(1): p. 123-32.
948. Wirtz, S., et al., Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, 2007. 2(3): p. 541-6.
949. Stucchi, A.F., et al., NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. 279(6): p. G1298-306.
950. Daddaoua, A., et al., Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*, 2005. 135(5): p. 1164-70.
951. Daddaoua, A., et al., Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*, 2006. 136(3): p. 672-6.
952. Daddaoua, A., et al., Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*, 2007. 137(5): p. 1222-8.
953. Martinez-Moya, P., et al., Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats. *Pharmacol Res*, 2012. 66(2): p. 144-53.

954. Martínez-Moya, P., et al., Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 2013. 15(2): p. 372-80.
955. Wirtz, S., et al., Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. *Gastroenterology*, 2011. 141(5): p. 1875-86.
956. Gutierrez, A., et al., Cytokine association with bacterial DNA in serum of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(4): p. 508-14.
957. Smith, P.K., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
958. 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.
959. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock, A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*, 1946. 164: p. 321-9.
960. Maroux, S., D. Louvard, and J. Baratti, The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochim Biophys Acta*, 1973. 321(1): p. 282-95.
961. Dahlqvist, A., Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem*, 1968. 22(1): p. 99-107.
962. Romero-Calvo, I., et al., Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 2010. 401(2): p. 318-20.
963. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
964. Waymire, K.G., et al., Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet*, 1995. 11(1): p. 45-51.
965. Fedde, K.N., et al., Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, 1999. 14(12): p. 2015-26.
966. Narisawa, S., C. Wennberg, and J.L. Millan, Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol*, 2001. 193(1): p. 125-33.
967. Wennberg, C., et al., Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*, 2000. 15(10): p. 1879-88.
968. Lynes, M., et al., Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. 301(6): p. R1738-47.
969. Kaliannan, K., et al., Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(17): p. 7003-8.
970. Moss, A.K., et al., Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. 304(6): p. G597-604.
971. Chen, K.T., et al., Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. 299(2): p. G467-75.

972. Chen, K.T., et al., A role for intestinal alkaline phosphatase in the maintenance of local gut immunity. *Dig Dis Sci*, 2011. 56(4): p. 1020-7.
973. Malo, M.S., et al., Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*, 2010. 59(11): p. 1476-84.
974. Wirtz, S. and M.F. Neurath, Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. 59(11): p. 1073-83.
975. Diana Borenshtein, M.E.M.a.D.B.S., Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice.
976. Martinez-Augustin, O., et al., Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colonic inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis. *BMC Genomics*, 2008. 9: p. 490.
977. Ramasamy, S., et al., Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. 17(2): p. 532-42.
978. Ebrahimi, F., et al., Local peritoneal irrigation with intestinal alkaline phosphatase is protective against peritonitis in mice. *J Gastrointest Surg*, 2011. 15(5): p. 860-9.
979. Lukas, M., et al., Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. 16(7): p. 1180-6.
980. Martins, M.J., M.R. Negrao, and C. Hipolito-Reis, Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem*, 2001. 34(6): p. 463-8.
981. Henthorn, P.S., et al., Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(20): p. 9924-8.
982. Ali, N.N., J. Rowe, and N.M. Teich, Constitutive expression of non-bone/liver/kidney alkaline phosphatase in human osteosarcoma cell lines. *J Bone Miner Res*, 1996. 11(4): p. 512-20.
983. Mulivor, R.A., V.L. Hannig, and H. Harris, Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(8): p. 3909-12.
984. Zurutuza, L., et al., Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet*, 1999. 8(6): p. 1039-46.
985. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev. Dyn.*, 1997. 208: p. 432-446.
986. Young, G.P., et al., Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum. *Am J Physiol*, 1981. 241(6): p. G461-8.
987. Lindberg, F.P., et al., Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*, 1996. 274(5288): p. 795-8.
988. PetitClerc, C. and G.E. Plante, Renal transport of phosphate: role of alkaline phosphatase. *Can J Physiol Pharmacol*, 1981. 59(4): p. 311-23.
989. Hirano, K., et al., Role of alkaline phosphatase in phosphate uptake into brush border membrane vesicles from human intestinal mucosa. *J Biochem*, 1985. 97(5): p. 1461-6.

990. Gibson, P., et al., Colonic epithelium is diffusely abnormal in ulcerative colitis and colorectal cancer. *Gut*, 1995. 36(6): p. 857-63.
991. Lopez-Posadas, R., et al., Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. 17(2): p. 543-56.
992. Poelstra, K., et al., Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol*, 1997. 151(4): p. 1163-9.
993. Gonzalez, R., et al., Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *Br J Pharmacol*, 2004. 141(6): p. 951-60.
994. Requena, P., et al., Bovine glycomacropptide ameliorates experimental rat ileitis by mechanisms involving downregulation of interleukin 17. *Br J Pharmacol*, 2008. 154(4): p. 825-32.
995. Martinez-Augustin, O., et al., Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. 15(1): p. 114-27.
996. Lopez-Posadas, R., et al., Bovine glycomacropptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J Nutr*, 2010. 140(11): p. 2014-9.
997. Wirtz, S. and M.F. Neurath, Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*, 2000. 15(3): p. 144-60.
998. Elson, C.O., et al., Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, 2005. 206: p. 260-76.
999. Anderson, C.A., et al., Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology*, 2009. 136(2): p. 523-9 e3.
1000. Barrett, J.C., et al., Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 2008. 40(8): p. 955-62.
1001. Cho, J.H., The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(6): p. 458-66.
1002. Gaya, D.R., et al., New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*, 2006. 367(9518): p. 1271-84.
1003. Honda, K. and K. Takeda, Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol*, 2009. 2(3): p. 187-96.
1004. Rakoff-Nahoum, S., et al., Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 2004. 118(2): p. 229-41.
1005. Nell, S., S. Suerbaum, and C. Josenhans, The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol*, 2010. 8(8): p. 564-77.

ANEXO

ABREVIATURAS

5-ASA: Ácido 5-aminosalicílico

5-FU: 5-Fluorouracilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGL: ácidos grasos libres

APC: Células presentadoras de antígeno

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AP: Fosfatasa alcalina

BAP: Fosfatasa alcalina ósea

CD: Células dendríticas

CEI: Células epiteliales intestinales

CI: Colitis indeterminada

CRF: Factor liberador de corticotropina

CU: Colitis ulcerosa

DSS: Sulfato de dextrano sódico

EAP: Fosfatasa alcalina embrionaria

EC: Enfermedad de Crohn

ECAP: Fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica

GCAP: Fosfatasa alcalina de células germinales

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IAP: Fosfatasa alcalina intestinal

IL: Interleuquina

KAP: Fosfatasa alcalina renal

LPS: Lipopolisacárido

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B

NK: *Natural killer*

NLR: Receptor *NOD-like*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMP: Patrón molecular asociado a bacterias

P_i: Fosfato inorgánico

PLAP: Fosfatasa alcalina placentaria

PLP: Piridoxal-5-fosfato

PP_i: Pirofosfato

SCID: Inmunodeficiencia severa combinada

TLR: Receptor *toll-like*

TNAP: Fosfatasa alcalina no específica de tejido

TNBS: Ácido trinitrobencenosulfónico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de fosfatasa alcalina en las diferentes especies (pág. 7).

Tabla 2. Clasificación de Viena de la enfermedad de Crohn (pág. 22).

Tabla 3. Modelos transgénicos de enfermedad inflamatoria intestinal (pág. 51).

Tabla 4. Cambios en la microbiota intestinal asociados a enfermedades (pág 54).

Tabla 5. Patrones de expresión de los TLRs y sus activadores (pág 56).

Tabla 6. Cálculo del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en el modelo de colitis inducida por DSS (pág. 76).

Tabla 7. Cálculo del índice de daño macroscópico (IDM) (pág 80).

Tabla 8. Cálculo del índice de inflamación colónica (pág. 82).

Tabla 9. Índice endoscópico de la actividad de la colitis (pág. 83).

Tabla 10. Tratamientos usados en los experimentos celulares *in vitro* (pág. 85).

Tabla 11. Listado de anticuerpos utilizados (pág. 92).

Tabla 12. Listado de cebadores utilizados (pág. 93).

Tabla 13. Actividad AP en diferentes modelos de inflamación colónica (pág. 97).

Tabla 14. Consumo de agua y comida tras la administración de TNBS en ratas (pág 111).

Tabla 15. Parámetros del daño macroscópico colónico tras la administración de TNBS en ratas (pág. 111).

Tabla 16. Poblaciones celulares sanguíneas en ratones control WT y TNAP (pág. 119).
/ **Table 16.** *Blood cell populatiosn from from control WT and heterozygous TNAP mice (page 119).*

Tabla 17. Poblaciones celulares sanguíneas en ratones con colitis crónica inducida por DSS (pág 134).

Tabla 18. Poblaciones celulares sanguíneas en ratones con mucositis gastrointestinal inducida por 5-fluorouracilo (pág 141).

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Organización genómica del gen ALPL (pág. 6).
- Figura 2.** Vista frontal de la estructura tridimensional de la PLAP (pág. 11).
- Figura 3.** Roles principales de la IAP (pág 18).
- Figura 4.** Factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la EII (pág. 23).
- Figura 5.** Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal (pág. 35).
- Figura 6.** Vía clásica de transducción de señal regulada por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) (pág. 39).
- Figura 7.** Cascada de señalización de las MAPK (pág. 40).
- Figura 8.** Representación esquemática de la vía de señalización JAK-STAT (pág. 41).
- Figura 9.** Vías de señalización a través de los TLRs y NLRs (pág. 58).
- Figura 10.** Disbiosis (pág. 61).
- Figura 11.** Fisiopatología de la mucositis (pág. 68).
- Figura 12.** Esquema de modelo de colitis inducida por TNBS al 2% en ratones (pág. 75).
- Figura 13.** Esquema de modelo de colitis aguda inducida por la administración de DSS al 1% en ratones (pág. 75).
- Figura 14.** Esquema de modelo de colitis crónica inducida por la administración de DSS al 1% en ratones (pág. 77).
- Figura 15.** Esquema de modelo de mucositis inducida por la administración de 5-fluorouracilo empleado en ratones (pág 79).
- Figura 16.** Sensibilidad al levamisol y a la homoarginina determinada en colon de animales control (Control) y con colitis inducida por TNBS (TNBS) (pág. 97).
- Figura 17.** Expresión de la TNAP en colon de animales control (Control) y con colitis inducida por TNBS (TNBS) determinada por Western blot (pág. 98).
- Figura 18.** Efecto de los estímulos oxidativos sobre la actividad AP en varias líneas celulares de epitelio intestinal (pág. 102).

Figura 19. Estudio de las actividades enzimáticas: AP, leucina aminopeptidasa y maltasa; y efecto del uso de antioxidantes sobre la actividad AP (pág. 103).

Figura 20. Efecto de estímulos adicionales sobre la actividad AP (pág. 104).

Figura 21. Expresión de la AP en las células IEC18 (pág. 105).

Figura 22. Efecto de la tunicamicina en la inducción de la actividad AP en células IEC18 (pág. 106).

Figura 23. Estudio del estado de la vía de las MAPKs en las células IEC18 tratadas con tButOOH (pág. 107).

Figura 24. Efecto de varios moduladores de transducción de señales en la actividad AP en las células IEC18 (pág. 108).

Figura 25. Efecto de la actinomicina D y la cicloheximida en la inducción de la actividad AP en células IEC18 (pág. 109).

Figura 26. Evolución del peso corporal (% peso inicial) desde la inducción de la colitis por TNBS el día 0 hasta el día 6 (pág. 110).

Figura 27. Expresión colónica de iNOS y COX-2 medida mediante Western blot el día 6 tras la inducción de la colitis por TNBS (pág. 112).

Figura 28. Marcadores de inflamación colónicos (marcadores neutrofílicos calgranulina A y lipocalina 2, IL-1 β y la TNAP) determinados por qRT-PCR (pág. 113).

Figura 29. Translocación bacteriana en hígado (pág. 113).

Figura 30. Actividad AP colónica y su sensibilidad a levamisol (pág. 114).

Figura 31. Actividad AP en heces y su sensibilidad a levamisol (pág. 115).

Figura 32. Marcadores inflamatorios en las ratas con colitis inducida por DSS (pág. 115).

Figura 33. Actividad AP en heces y sensibilidad al levamisol 1mM del grupo control (Control) y de dos grupos con colitis, inducida por TNBS (TNBS) y por DSS (DSS) durante la colitis. Blots representativos de la expresión de IAP y TNAP (B4-78) en heces en los grupos: Control, TNBS y DSS (pág. 116).

Figura 34. Marcadores inflamatorios en el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria (pág. 117).

Figura 35. Detección de la TNAP y la IAP mediante Western blot en heces de ratones con colitis inducida por transferencia linfocitaria (pág. 117).

Figura 36. Actividad fosfatasa alcalina determinada en varios órganos de ratones control (WT) y heterocigotos para la expresión de la TNAP (TNAP) (pág 118). / **Figure 36.** AP activity in some organs from control WT and heterozygous TNAP mice (page 118).

Figura 37. Sensibilidad a levamisol 0,1mM determinada en varios órganos de ratones control (WT) y heterocigotos para la expresión de la TNAP (TNAP) (pág. 119). / **Figure 37.** Sensitivity to levamisole 0.1mM in some organs from control WT and heterozygous TNAP mice (page 119).

Figura 38. Imágenes representativas de tinciones con hematoxilina-eosina de colon, duodeno, yeyuno, íleon y ciego de ratones WT y TNAP (pág. 120).

Figura 39. Poblaciones celulares sanguíneas determinadas por citometría de flujo. Células T CD4, T CD8, T totales, T reguladoras (Fox P3), neutrófilos y macrófagos en ratones WT y TNAP (pág. 121). / **Figure 39.** Blood cell populations measured by flow cytometry. CD4, CD8, total and regulatory T cells, neutrophils and macrophages from control WT and heterozygous TNAP mice (page 121).

Figura 40. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por esplenocitos cultivados estimulados con Con A y con LPS de ratones WT y TNAP (pág 121). / **Figure 40.** Cytokine production of IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 and IL-10 by cultured splenocytes stimulated with Con A or LPS from control WT and heterozygous TNAP mice (page 121).

Figura 41. Incremento (vs. WT) en el peso, longitud y relación peso-longitud del colon de ratones WT y TNAP (pág. 122). / **Figure 41.** Fold change (vs. WT) in weight, length and weight/length relation in colon from control WT and heterozygous TNAP mice (page 122).

Figura 42. Índice IHC para cuantificar la presencia de IAP en colon de ratones WT y TNAP (pág. 122). / **Figure 42.** IHC index for the quantification of IAP expression in colon from control WT and heterozygous TNAP mice (page 122).

Figura 43. Imágenes representativas de IHC colónicas con anti-IAP y anti-TNAP de ratones WT y TNAP (pág. 123). / **Figure 43.** Representative images of IHC IAP and TNAP colon staining from control WT and heterozygous TNAP mice (page 123).

Figura 44. Detección de IAP y TNAP en colon mediante Western Blot de ratones WT y TNAP (pág. 123). / **Figure 44.** IAP and TNAP detected by Western blot from control WT and heterozygous TNAP mice (page 123).

Figura 45. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por las CGLM estimulados con Con A de ratones WT y TNAP (pág. 124). / **Figure 45.** Cytokine production of IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 and IL-10 by cultured MLNC stimulated with Con A from control WT and heterozygous TNAP mice (page 124).

Figura 46. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 e IL-6 por los explantes colónicos cultivados sin estimular de ratones WT y TNAP (pág. 124).

Figura 47. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 e IL-6 por los explantes colónicos cultivados estimulados con Con A y con LPS de ratones WT y TNAP (pág. 125).

Figura 48. Curva de mortalidad de ratones WT y TNAP tras la administración de DSS al 2% (P/V) en el agua de bebida durante 7 días. Índice de la actividad de la enfermedad (DAI). (pág. 126). / **Figure 48.** WT and TNAP mice mortality curve after 2% DSS (W/V) administration in normal water for 7 days. Disease activity index (DAI) (page 126).

Figura 49. Evolución del peso corporal con respecto al día 0 tras la administración de DSS al 1% (P/V). Índice de la actividad de la enfermedad (DAI). (pág. 127). / **Figure 49.** Body weight gain from day 0, 1% DSS (W/V) administration in normal water for 7 days. Disease activity index (DAI) (page 127).

Figura 50. Incremento (vs. WT) en el peso, longitud y relación peso-longitud del colon del experimento de colitis aguda inducida por DSS. Incremento (vs. WT) de la longitud de las criptas, la submucosa y la capa muscular colónicas del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 128).

Figura 51. Imágenes representativas de tinciones colónicas con hematoxilina-eosina del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 128). / **Figure 51.** Colon hematoxin-eosin staining in the acute DSS colitis model (page 128).

Figura 52. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 129). / **Figure 52.** Colonic AP activity and sensitivity to levamisole 0.1mM in the acute DSS colitis model (page 129).

Figura 53. Actividad MPO colónica del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 129). / **Figure 53.** Colonic MPO activity in the acute DSS colitis model (page 129).

Figura 54. Población linfocitaria en las CGLM del experimento de colitis aguda inducida por DSS. Linfocitos T CD4, CD8 y totales en las CGLM determinados por citometría de flujo (pág. 130). / **Figure 54.** Lymphocyte populations in MNLC in the acute DSS colitis mode. CD4, CD8 and total T cells in MNLC measured by flow cytometry (page 130).

Figura 55. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-10 y TNF- α por las CGLM estimulados con Con A del experimento de colitis aguda inducida por DSS (pág. 130). / **Figure 55.** Cytokine production of IFN- γ , IL-17, IL-10 and TNF- α by MNLC stimulated with Con A in the acute DSS colitis model (page 130).

Figura 56. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , e IL-10 por los explantes colónicos cultivados sin estimular y estimulados con LPS del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 131).

Figura 57. Índice IHC para cuantificar la presencia de IAP colónica en el experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 132).

Figura 58. Imágenes representativas de IHC colónicas con anti-IAP y anti-TNAP del experimento de colitis aguda inducida por DSS. (pág. 132).

Figura 59. Supervivencia de los ratones tras la administración durante tres ciclos de DSS al 1% (P/V). Evolución del peso corporal desde el inicio de la administración de DSS (pág. 133).

Figura 60. Incremento (vs. WT) del peso, la longitud y la relación peso-longitud del colon del experimento de colitis crónica inducida por DSS. (pág. 134).

Figura 61. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM del experimento de colitis crónica inducida por DSS (pág. 134). / **Figure 61.** *Colonic AP activity and sensitivity to levamisole 0.1mM in the chronic DSS colitis model (page 134).*

Figura 62. Actividad MPO colónica del experimento de colitis crónica inducida por DSS. (pág. 135). / **Figure 62.** *Colonic MPO activity in the chronic DSS colitis model (page 134).*

Figura 63. Poblaciones celulares sanguíneas del experimento de colitis crónica inducida por DSS. Linfocitos T reguladores, CD4, CD8, totales y macrófagos determinados mediante citometría de flujo (pág. 136).

Figura 64. Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados con Con A del experimento de colitis crónica inducida por DSS. Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados LPS del experimento de colitis crónica inducida por DSS. (pág. 137). / **Figure 64.** *Cytokine production of TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ and IL-10 by splenocytes stimulated with Con A in the chronic DSS colitis mode. Cytokine production of TNF- α , IL-6 and IL-10 by splenocytes stimulated with LPS in the chronic DSS colitis model (page 137).*

Figura 65. Producción de las citoquinas IL-17, IL-10, TNF- α e IL-6 por las CGLM estimulados con Con A del experimento de colitis crónica inducida por DSS (pág. 137). / **Figure 65.** *Cytokine production of IL-17, IL-10, TNF- α and IL-6 by MNLC stimulated with Con A in the chronic DSS colitis mode (page 137).*

Figura 66. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por los explantes colónicos cultivados sin estimular y estimulados con LPS del experimento de colitis crónica inducida por DSS (pág. 138).

Figura 67. Evolución de pesos en los animales desde la presensibilización (día 0) hasta la administración del TNBS (día 7) y el desarrollo de la colitis hasta el día 11 (pág. 139). / **Figure 67.** *Body weight gain from day 0 (presensitization), day 7 (TNBS administration) until day 11 in TNBS colitis model (page 139).*

Figura 68. Incremento (vs. WT) del peso, la longitud y la relación peso-longitud del colon del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 140).

Figura 69. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 0,1mM del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 140). / **Figure 69.** *Colonic AP activity and sensitivity to levamisole 0.1mM in the acute TNBS colitis model (page 140).*

Figura 70. Actividad MPO colónica del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 140). / **Figure 70.** *Colonic MPO activity in the acute TNBS colitis model (page 140).*

Figura 71. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados con Con A del experimento de colitis aguda inducida por TNBS. Producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por los esplenocitos cultivados estimulados con LPS del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 142).

Figura 72. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-6, IFN- γ , e IL-10 por las CGLM estimulados con Con A del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 142). / **Figure 72.** *Cytokine production of IL-17, TNF- α , IL-6 and IL-10 by MNLC stimulated with Con A in the chronic DSS colitis mode (page 142).*

Figura 73. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 e IL-6 por los explantes colónicos cultivados sin estimular del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág 143).

Figura 74. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 e IL-6 por los explantes colónicos cultivados estimulados con LPS del experimento de colitis aguda inducida por TNBS (pág. 143).

Figura 75. Evolución del peso corporal de los animales desde la transferencia celular adoptiva (día 0) Índice de inflamación endoscópico el día 34 (pág. 144). / **Figure 75.** *Body weight gain from day 0 (cell transfer). Inflammatory endoscopic index in day 34 (page 144).*

Figura 76. Imagen tomada con endoscopio el día 33 tras la transferencia celular adoptiva (pág. 145). / **Figure 76.** *Endoscopic pictures in day 33 after cell transfer (page 145).*

Figura 77. Actividad AP colónica del experimento de colitis inducida por transferencia celular adoptiva (pág. 145). / **Figure 77.** *Colonic AP activity and sensitivity to levamisole 0.1mM in the transfer colitis model (page 145).*

Figura 78. Actividad MPO colónica del experimento de colitis inducida por transferencia celular adoptiva (pág. 145). / **Figure 78.** Colonic MPO activity in the transfer colitis model (page 145).

Figura 79. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por las CGLM estimulados con CD3/CD28 del experimento de colitis inducida por transferencia celular adoptiva (pág. 146). / **Figure 79.** Cytokine production of IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 and IL-10 by MNLc stimulated with CD3/CD28 in the transfer colitis mode (page 146).

Figura 80. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, IL-10, TNF- α e IL-6 por los explantes colónicos cultivados del experimento de colitis inducida por transferencia celular adoptiva (pág. 146). / **Figure 80.** Cytokine production of IFN- γ , IL-17, IL-10, TNF- α and IL-6 by cultured colon explants non stimulated in the transfer colitis mode (page 146).

Figura 81. Determinación de la carga bacteriana tras la infección con *C. rodentium* (pág. 147). / **Figure 81.** Bacterial load after oral infection with *C. rodentium* (page 147).

Figura 82. Actividad AP colónica y sensibilidad a levamisol 10mM tras la infección con *C. rodentium* (pág. 148). / **Figure 82.** Colonic AP activity and sensitivity to levamisole 10mM after oral infection with *C. rodentium* (page 148).

Figura 83. Actividades MPO colónica tras la infección con *C. rodentium* (pág. 148). / **Figure 83.** Colonic MPO activity after oral infection with *C. rodentium* (page 148).

Figura 84. Índice de inflamación colónica determinado en las tinciones de hematoxilina-eosina tras la infección con *C. rodentium* y longitud de las criptas (pág. 149). / **Figure 84.** Colonic inflammatory index in hematoxylin-eosin staining after oral infection with *C. rodentium* (page 149).

Figura 85. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 por las CGLM estimuladas con CD3/CD28 tras la infección con *C. rodentium* (pág. 150).

Figura 86. Producción de las citoquinas IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-10 e IL-6 por los explantes colónicos cultivados tras la infección con *C. rodentium* (pág. 150).

Figura 87. Incremento de la expresión de angiotensina 4, fosfolipasa A2, la lectina Reg3 β y las interleuquinas IL-22, IL-17 e IL-1 β en colon determinada por qRT-PCR tras la infección con *C. rodentium* (pág. 151). / **Figure 87.** Angiotensin 4, phospholipase A2, Reg3 β , IL-22, IL-17 and IL-1 β colon expression measured by qRT-PCR after oral infection with *C. rodentium* (page 151).

Figura 88. Carga bacteriana determinada por el sistema IVIS[®], cuatro días después de la infección con *S. Typhimurium* (pág. 151). / **Figure 88.** Bacterial load measured by IVIS[®] system four days after the onfection with *S. Typhimurium* (page 151).

Figura 89. Evolución del peso corporal tras la inducción de la mucositis con 5-fluorouracilo (pág. 152). / **Figure 89.** *Body weight gain after mucositis induction by the administration of 5-fluorouracil (page 152).*

Figura 90. Actividades AP intestinales en el modelo de mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU (pág. 153). / **Figure 90.** *Intestinal AP activities in the gastrointestinal mucositis induced by 5-FU (page 153).*

Figura 91. Expresión de S100A8 en íleon determinado por RT-PCR en el modelo de mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU (pág. 153).

Figura 92. Poblaciones celulares sanguíneas en el modelo de mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU (pág. 153). / **Figure 92.** *Blood cell populations in the gastrointestinal mucositis induced by 5-FU (page 153).*

Figura 93. Producción de las citoquinas IL-17, TNF- α , IL-10 e IFN- γ por las CGLM estimuladas con Con A en el modelo de mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU (pág. 154). / **Figure 93.** *Cytokine production of IL-17, TNF- α , IL-10 and IFN- γ by MNLC stimulated with Con A in the gastrointestinal mucositis induced by 5-FU (page 153).*

Figura 94. Producción de IL-6 en explantes colónicos sin estimular y estimulados con LPS en el modelo de mucositis gastrointestinal inducida por 5-FU (pág. 155).

DIFUSIÓN CIENTÍFICA DE LOS RESULTADOS

COMUNICACIONES ORALES Y EN FORMA DE POSTER:

1. AUTORES: Martínez-Plata E, Daddaoua A, Requena P, Martínez-Moya P, Capitán-Cañadas F, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O.

TÍTULO: Non absorbable glucides (AActive Hexose Correlated Compound, inulin and fructooligosaccharides) induce cytokine production in monocytes by a mechanism involving the stimulation of the MAPK and the NF- κ B signal transduction pathways.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Oral.

CONGRESO: European Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ESPEN).

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Viena (Austria).

AÑO: 2009.

2. AUTORES: Romero-Calvo I; López-Posadas, R; González, R; Ballester, I; Martínez-Moya, P; Suárez, M. D; Zarzuelo, A; Martínez-Augustin, O; Sánchez de Medina, F.

TÍTULO: Tissue nonspecific alkaline phosphatase is induced in enterocytes in response to inflammatio/oxidative stress and may have a protective role in intestinal inflammation.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: III Jornadas científicas del CIBERehd.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona.

AÑO: 2009.

3. AUTORES: Sánchez de Medina F, Martínez Plata E, Romero I, Ortega M, González R, Daddaoua A, Martínez-Moya P, Zarzuelo A, Suárez MD, Martínez-Augustin O.

TÍTULO: Non Absorbable Glucides (Active Hexose Correlated Compound, Inulin and Fructooligosaccharides) exert immunomodulatory effects and induce differentiation in several intestinal cell types that are independent on their prebiotic actions.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Oral.

CONGRESO: 3rd Immunonutrition Workshop.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Gerona.

AÑO: 2009.

4. AUTORES: Martínez-Moya, P; Ortega, M; López-Posadas, R; González, R; Zarzuelo, A; Suárez, MD; Martínez-Augustin, O; Sánchez de Medina F.

TÍTULO: La administración de fosfatasa alcalina exógena por vía oral e intrarrectal mejora la inflamación colónica y reduce la translocación bacteriana.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba.

AÑO: 2010.

5. AUTORES: Martínez-Moya, P; Romero-Calvo I, Requena P, Zarzuelo A, Suárez MD, Marín JJ, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F.

TÍTULO: El ácido ursodesoxicólico posee actividad antiinflamatoria en modelos de colitis en rata.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba.

AÑO: 2010.

6. AUTORES: Martínez-Moya, P; Capitán-Cañadas, F ; Ortega, M ; Romero-Calvo , I, Martínez-Plata, E ; González, M ;Puerta, E; Zarzuelo A, Suárez MD, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F.

TÍTULO: Validación de un método para la medida de mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en la misma muestra de intestino.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba.

AÑO: 2010.

7. AUTORES: Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Requena P, Zarzuelo A, Suárez MD, Martínez-Augustin O, Marín JJG, Sánchez de Medina F.

TÍTULO: Ursodeoxycholic acid has antiinflammatory effects in a model of colitis in the rat.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: Falk Symposium 175. XXI International Bile Acid Meeting.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Friburgo, Alemania.

AÑO: 2010.

8. AUTORES: Martínez-Moya P, Hernández-Chirlique C, Aranda CJ, Zarzuelo A, Suárez MD, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O.

TÍTULO: Tissue nonspecific alkaline phosphatase heterozygous mice are protected against DSS experimental colitis due to an increase of T cell response.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Póster.

CONGRESO: Falk Symposium 188. Inflammatory Bowel Diseases: Microbiota versus the Barrier.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Stuttgart, Alemania.

AÑO: 2013.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

1. TÍTULO: Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots.
AUTORES: I. Romero-Calvo, B. Ocón Moreno, P. Martínez-Moya, A. Zarzuelo, M.D. Suárez, O. Martínez-Augustin, F. Sánchez de Medina
CLAVE: Q2 VOLUMEN: 401 PÁGINA, INICIAL: 318 FINAL: 320
FECHA: 2010
REF. REVISTA: Analytical Biochemistry (2,996, 27/72, Biochemical research methods, 2011).
2. TÍTULO: Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation.
AUTORES: R. López-Posadas, R. González, I. Ballester, P. Martínez-Moya, I. Romero, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustin, F. Sánchez de Medina.
CLAVE: Q1 VOLUMEN: 17 PÁGINA, INICIAL: 543 FINAL: 556
FECHA: 2011
REF. REVISTA: Inflammatory Bowel Diseases (4,855, 12/74, Gastroenterology. 2011).
3. TÍTULO: Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats.
AUTORES: P. Martínez-Moya, M. Ortega-González, R. González, A. Anzola, B. Ocón, C. Hernández-Chirlaque, R. López-Posadas, M.D. Suárez, A. Zarzuelo, O. Martínez-Augustin, F. Sánchez de Medina.
CLAVE: Q1 VOLUMEN: 66 PÁGINA, INICIAL: 144 FINAL: 153
FECHA: 2012
REF. REVISTA: Pharmacological Research (4,436, 34/261, Pharmacology, 2011).
4. TÍTULO: Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis.
AUTORES: Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Requena P, Hernández-Chirlaque C, Aranda CJ, González R, Zarzuelo A, Suárez MD, Martínez-Augustin O, Marín JJ, de Medina FS.
CLAVE: Q2 VOLUMEN: 15 PÁGINA, INICIAL: 372 FINAL: 380
FECHA: 2013
REF. REVISTA: International Immunopharmacology (2,376, 118/261, Pharmacology, 2011).



Notes & Tips

Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots

Isabel Romero-Calvo, Borja Ocón, Patricia Martínez-Moya, María Dolores Suárez, Antonio Zarzuelo, Olga Martínez-Augustin, Fermín Sánchez de Medina*

Departments of Biochemistry and Molecular Biology II and Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2009

Received in revised form 12 February 2010

Accepted 26 February 2010

Available online 3 March 2010

ABSTRACT

It is becoming standard practice to measure a housekeeping gene, typically actin, in Western blots, as it is the rule in RNA blots. We have applied reversible Ponceau staining to check equal loading of gels and measured actin in parallel under different conditions. Our results show that densitometric analysis is comparable with both techniques. Therefore, routine quantitation of Ponceau staining before antibody probing is validated as an alternative to actin blotting.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Gels and blots are one of the fundamental tools of molecular biology. Their foremost utility is to assess the characteristics of nucleic acids and proteins in electrophoretic movement, indicating changes in size, glycosylation, dimerization, and so on. However, they are also frequently used to measure quantitative changes in gene expression among samples in spite of the known limitations of this approach, including a small dynamic range and a certain unpredictability. In particular, the quantitative use of Northern blots has been classically hampered by the characteristic liability of RNA because degradation can easily pass for downregulation in the blot. Hence, parallel measurement of a housekeeping gene, such as actin, 18S, or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),¹ has become commonplace. This procedure is known as “loading control,” but this is probably a misnomer given that its primary objective is to rule out degradation, not faulty gel loading, as a confounding factor; because pipetting is required in virtually every experiment, this line of reasoning would lead to the use of loading controls for each one of them.

At any rate, the loading control practice is increasingly extending to Western blots, and it is required by many journals even though the need for this step is debatable. Ponceau S staining of proteins has long been applied to quality control of membrane transfer in Western blotting. Ponceau S staining is fast, inexpensive, and nontoxic; above all, binding is fully reversible in a few minutes. Here we propose the use of Ponceau S staining as an alternative means to actin immunoblotting to assess equal loading in Western blots.

To do this, we obtained samples from different organs derived from two female Wistar rats of approximately 200 g weight. The

animals were sacrificed by cervical dislocation, and colon, liver, and kidney samples were extracted, homogenized in RIPA buffer with freshly added protease inhibitors (phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, leupeptin, pepstatin A, and 1,10-phenanthroline), cleared by centrifugation, and heated at 95 °C for 4 min in denaturing Laemmli buffer. The composition of the RIPA buffer was as follows: 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% sodium deoxycholate, and 1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline. The composition of the Laemmli buffer (5×) was as follows: 312 nM SDS, 50% (v/v) glycerol, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 22.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) trisodium salt, 220 mM Tris, and traces of bromophenol blue (pH 6.8). Protein content was measured by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin as standard [1]. Then we ran a series of Western blots with varying loading conditions and assessed gel loading either by Ponceau S staining (right after transfer) or by actin immunoblotting using the JLA-20 monoclonal antibody. The JLA-20 antibody against actin developed by Lin [2] was obtained from the Development Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of Biological Sciences at the University of Iowa. The secondary peroxidase-conjugated antibody was obtained from Sigma (Barcelona, Spain). We used Bio-Rad electrophoresis and transfer units and Schering-Plough nitrocellulose membranes with 90-min transfer time and 100-V constant voltage settings. After transfer, the nitrocellulose membranes were rinsed briefly in distilled water and incubated in Ponceau S solution (0.5 [w/v] in 1% [v/v] acetic acid) for 2 min [3], followed by a brief rinse in distilled water so that the lanes and bands were clearly visible. The membranes were then inserted in between transparency sheets and scanned at 300 dpi to a TIFF file using a standard scanner (Epson Perfection 3490 Photo). After that, the membranes were rinsed once more in distilled water for 2–3 min until the staining was completely eliminated, and we proceeded with the blocking

* Corresponding author. Fax: +34 958 248964.

E-mail address: fsanchez@ugr.es (F. Sánchez de Medina).

¹ Abbreviations used: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; SDS, sodium dodecyl sulfate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

and antibody incubation steps as usual. Antibody-bound peroxidase was detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA), documented in Kodak film, and quantitated with Scion Image software. Because Ponceau S is a nonspecific protein dye, all proteins in the membrane are colored. We selected a section of the blot that covered a wide range of molecular weights in each case, typically approximately 90% or more of the lane length.

We initially tested the capacity of reversible Ponceau S staining to assess equal gel loading and, accordingly, ran a series of gels featuring the different tissue samples at equal levels of protein loading, namely at 140, 80, 40, and 10 μg of protein per lane, thereby covering the entire range of “small” gels. Fig. 1 shows a typical Ponceau stain and actin signal. Clearly, the results are very similar with both methods. As expected, there are no differences depending on the organ considered (not shown). However, the slopes do differ depending on the organ, so that correlation for each individual type of sample is typically around 0.9 (r^2), whereas linearity is impaired in the graph showing the combined data.

As alluded to earlier, Western blots may be used for quantitative purposes, although this approach has well-acknowledged limitations, particularly in terms of the dynamic range, that is, the difference between the threshold signal that is detectable and the saturation point beyond which the signal is not further increased or is increased only marginally even though the protein detected may be present in much higher amounts. Thus, we set out to verify whether the dynamic range is different for Ponceau S and actin immunoblotting. The analysis of the densitometric quantitation of the Ponceau S and actin signals is shown in Fig. 2. The results are reasonably linear up to 140 μg of protein loaded in both cases, indicating that there is no limitation of dynamic

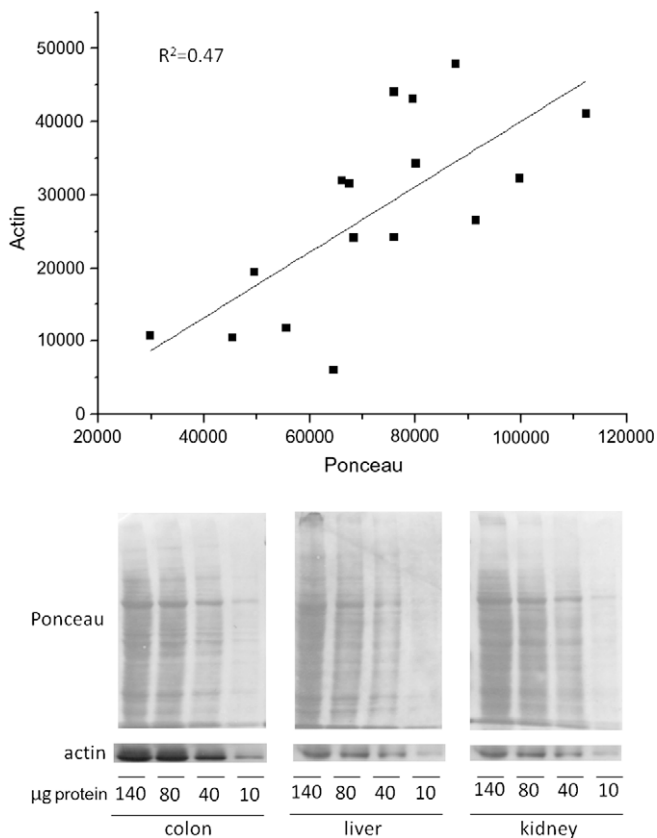


Fig. 1. Correlation between Ponceau S and actin densitometric signal. Rat colon, kidney, and liver samples were analyzed by Western blot, including reversible Ponceau S staining prior to incubation with primary antibody.

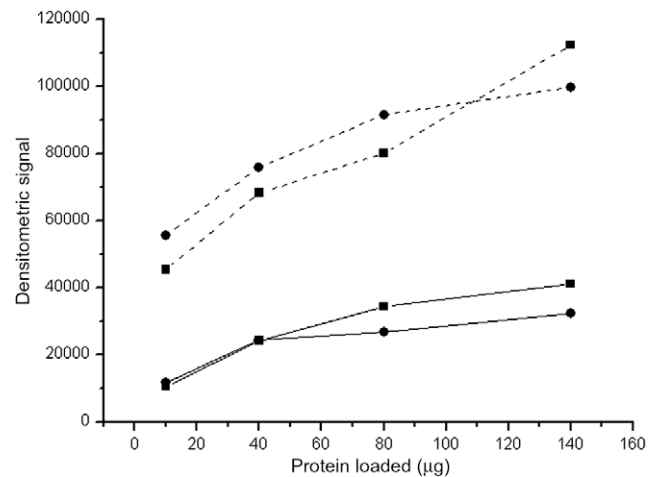


Fig. 2. Dynamic range of actin and Ponceau S densitometric signal. Rat kidney (circles) and liver (squares) samples in different quantities (10–140 μg) were analyzed by Western blot, including reversible Ponceau S staining prior to incubation with primary antibody. Both actin (solid lines) and Ponceau S (broken lines) densitometric signals are shown.

range imposed by the use of Ponceau S compared with actin. Actually, the linearity was enhanced with Ponceau S in this particular experiment, as indicated by the higher difference between the maximal and minimal densitometric values. It should be noted, however, that Western blotting has well-known limitations for quantitative purposes either way.

Our data provide validation for the use of reversible Ponceau S staining to assess equal gel loading, or quality control, in Western blots. Certainly, there are limitations to our validation. In principle, it applies only to the conditions used (i.e., rat colon, kidney, and liver). We have also studied mouse organs, as well as HT29, T84, and Caco-2 human cells, with similar results. Moreover, our method can be extended to any other type of sample with minimal effort. For instance, it seems to work equally well for bone and jejunum rat samples (although this was not tested extensively). The same applies to technical conditions in our study such as the use of nitrocellulose membranes, blocking buffer, and antibodies.

Ponceau staining has an additional advantage in that it does not rely on a single protein for normalization or loading control. This circumvents the possibility that the “housekeeping” proteins used for this purpose may actually vary in some conditions or that they are saturated at the levels of loading necessary for detection of low-expression products [4,5].

In conclusion, we have shown that reversible Ponceau S staining can be used advantageously over actin detection for quality or equal loading control in Western blotting. It is equally useful for this purpose, has similar or improved dynamic range, is extremely inexpensive, and takes no longer than 10 min.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01432 and AGL2008-04332). I.R.-C. and P.M.-M. are funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

References

- [1] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

- [2] J.J. Lin, Monoclonal antibodies against myofibrillar components of rat skeletal muscle decorate the intermediate filaments of cultured cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2335–2339.
- [3] K. Nakamura, T. Tanaka, A. Kuwahara, K. Takeo, Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure, *Anal. Biochem.* 148 (1985) 311–319.
- [4] G.M. Aldridge, D.M. Podrebarac, W.T. Greenough, I.J. Weiler, The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting, *J. Neurosci. Methods* 172 (2008) 250–254.
- [5] A. Dittmer, J. Dittmer, β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis, *Electrophoresis* 27 (2006) 2844–2845.

Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Is Activated in Enterocytes by Oxidative Stress Via Changes in Glycosylation

Rocío López-Posadas, PhD,* Raquel González, PhD,* Isabel Ballester, PhD,[†]
 Patricia Martínez-Moya, BSc,[‡] Isabel Romero-Calvo, BSc,* María Dolores Suárez, PhD,[‡]
 Antonio Zarzuelo, PhD,* Olga Martínez-Augustin, PhD,[‡] and Fermín Sánchez de Medina, PhD*

Background: Intestinal inflammation produces an induction of alkaline phosphatase (AP) activity that is attributable in part to augmented expression, accompanied by a change in isoform, in epithelial cells.

Methods: This study focuses on induction of AP in intestinal epithelial cells in vitro.

Results: Treatment with the oxidants H₂O₂, monochloramine, or tButOOH increases AP activity in vitro in Caco-2, HT29, and IEC18 cells. We selected IEC18 cells for further testing. Basal AP activity in IEC18 cells is of the tissue-nonspecific (bone-liver-kidney) type, as indicated by Northern and Western blot analysis. Oxidative stress augments AP activity and the sensitivity of the enzyme to levamisole, homoarginine, and heat in IEC18 cells. Increased immunoreactivity to tissue-nonspecific AP antibodies suggests an isoform shift from liver to either kidney or bone type. This effect occurs without changes at the mRNA level and is sensitive to tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation, and neuraminidase digestion. Saponin and deoxycholate produce similar effects to oxidants. Butyrate but not proinflammatory cytokines or LPS can induce a similar effect but without toxicity. The AP increase is not prevented by modulators of the MAPK, NF- κ B, calcium, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathways, and is actually enhanced by actinomycin D via higher cell stress.

Conclusions: Oxidative stress causes a distinct increase in enterocyte AP activity together with cell toxicity via changes in the glycosylation of the enzyme that correspond to a shift in isotype within the tissue-nonspecific paradigm. We speculate that this may have physiological implication for gut defense.

(*Inflamm Bowel Dis* 2011;17:543–556)

Key Words: alkaline phosphatase, oxidative stress, inflammatory bowel disease, glycosylation

Mammalian alkaline phosphatases (AP, orthophosphoric monoester phosphohydrolase-alkaline optimum, EC 3.1.3.1) are a family of enzymes that cleave phosphate moieties at alkaline pH. At least four gene loci have been described in humans: the tissue-nonspecific or bone/liver/kidney, plus the intestinal, the placental, and the germ cell (or placental-like) isoforms, which are expressed predominantly in these tissues and thus are “tissue specific.” All isoforms are glycoproteins that differ in their glucidic residues as well as in their linkage to the protein.^{1,2} The tissue-nonspecific gene gives rise in turn to the bone, kidney, and liver isoforms, which differ at the mRNA level, so that the first exon (exon 1A) of the bone isoform is different from that of the other two isoforms (exon 1B).^{3,4} However, the three isoforms are identical at the amino acid level because the first exon is untranslated. In addition, there are differences in terms of sensitivity to chemical inhibitors and heat,⁵ which seem to be highly dependent on the sugar moiety.⁶ Thus, the liver enzyme is more resistant to levamisole or homoarginine inhibition than either the kidney or bone isoforms.^{5,7,8} The placental and intestinal enzymes have a 87%–90% similarity at the genomic level^{9,10} and are generally similar in their sensitivity to chemical inhibitors, displaying only minor differences.^{11–15} The placental isoform is reported to be the most resistant to heat as well as to inhibition by levamisole and homoarginine. It should be noted, however, that the rat equivalents of the placental and germ cell isoforms have not been detected to date. In general, AP is attached to the outer leaf of the plasma membrane by means of a specific glycan phosphatidylinositol moiety covalently linked to the carboxy terminus of the polypeptide chain.¹⁶

Received for publication March 29, 2010; Accepted May 5, 2010.

From the *Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja, Granada, Spain; and [†]Massachusetts General Hospital, Gastrointestinal Unit GRJ716, Boston, Massachusetts, USA, [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja, Granada, Spain.

The first three authors contributed equally to this work.

Part of these data were presented at the Digestive Disease Week 2009.

Supported by the Instituto de Investigación Carlos III (PI051651 and PI051625) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01432 and AGL2008-04332). R.L.P., I.B., P.M.M., and I.R.C. are funded by Ministerio de Ciencia e Innovación. RG is funded by CIBERehd. CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Reprints: Fermín Sánchez de Medina, PhD, Department of Pharmacology, School of Pharmacy University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain (e-mail: fsanchez@ugr.es)

Copyright © 2009 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.21381

Published online 19 July 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

AP distribution is ubiquitous among cell types and tissues, but its function has been undetermined for decades. However, in the last few years we have seen a major breakthrough in the elucidation of the role of AP in bone homeostasis. Thus, tissue-nonspecific AP (TNAP) appears to facilitate bone formation chiefly by inactivating PPI, as elegantly shown by Hessle et al.¹⁷ This is consistent with the long known TNAP requirement both in humans and in mutant mice with inactive enzyme.^{18–20} In the intestine AP is localized to the brush border membrane and has been proposed to participate in the intestinal transport of lipids and nucleotides.^{21,22} Intestinal type AP (IAP) is localized to lipid droplets in the villi.²³ Its role appears to be complex, however, since fat absorption is favored in the gut of IAP knockout mice.²⁴ Interestingly, LPS has been shown to be a substrate for AP, and AP has been advocated as a treatment for endotoxic shock.^{25,26} Furthermore, a protective role was suggested by the deleterious effect of the AP inhibitor levamisole in rats infected intraperitoneally with *E. coli*. It has recently been shown also that intestinal AP acts as a defensive factor in the gut by inactivating LPS and preventing bacterial translocation,²⁷ although IAP is localized in the proximal segments of the small intestine, where the bacterial load is minimal. In fact, oral administration of IAP is beneficial in experimental colitis.²⁸ AP may also have physiological functions unrelated to its enzymatic activity.²⁹

The small intestine of the adult mouse is thought to express exclusively the intestinal AP type, although the TNAP isoform is transiently expressed in the fetal stage.^{30,31} On the other hand, the large bowel does express TNAP, which is secreted by the colonocytes in surfactant-like particles.³² This isoform seems to be important in the maintenance and/or function of some intestinal structures,³³ but its specific physiological role in the intestine is unknown. Of note, treatment with specific antibodies directed against the surfactant-like particles seems to be beneficial in experimental colitis.³⁴

We have reported that colonic AP activity is significantly increased in a rat model of chronic diarrhea induced by a lactose-enriched diet.³⁵ We also found that colonic AP activity is augmented in several models of induced inflammation.^{36–38} Because epithelial cells are major contributors to this shift in AP activity, we set out to characterize the nature of this event and the mechanisms involved using *in vitro* models.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Reagents

Except where indicated, all reagents were obtained from Sigma (Madrid, Spain). PD98059 was from Tocris (Bristol, UK). H89 (N-(2-[p-bromocinnamylamino]ethyl)-5-

isoquinolinesulfonamide) was from Calbiochem (San Diego, CA). The polyclonal antibody against murine intestinal AP was the generous gift of Dr. Tsukamoto (Aichi Cancer Center Research Institute). The B4-78 antibody against human TNAP developed by Dr. Katzmann³⁹ was obtained from the Development Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences (Iowa City, IA). The B4-50 antibody³⁹ was generously donated directly by Dr. Katzmann. All other antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) and Sigma.

Cell Culture

IEC18 (ECACC 88011801), HT29 (ECACC 91072201), and Caco-2 (ECACC 86010202) cells supplied by the Cell Culture Facility of the University of Granada were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain), 2 mM L-glutamine, 100 mg/L streptomycin, 100,000 U/L penicillin, and 2.5 mg/L amphotericin B, in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Enzymatic Determinations

AP activity was measured spectrophotometrically using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mM) as substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mM MgCl₂ (pH = 10.5).⁴⁰ In some cases the sensitivity to AP inhibitors (levamisole, homoarginine) or heat (56°C, 30 minutes) was tested. Leucine aminopeptidase and maltase activities were measured spectrophotometrically.^{41,42} Total glutathione content was measured spectrophotometrically with the recycling assay described by Akerboom and Sies.⁴³ Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in the supernatants as the sodium pyruvate-dependent disappearance of β -NADH and expressed as U/mL. All other enzymatic activities are expressed as mU/mg protein.⁴⁴

Oxidative Stress

Cells were exposed overnight to monochloramine (0.1–5 mM), H₂O₂ (10 mM), or tert-butyl hydroperoxide (tButOOH, 0.1–5 mM). Monochloramine was obtained fresh every time by reacting ammonium chloride and sodium hypochlorite and following the reaction at 242 nm, as previously described.⁴⁵ The supernatant was collected, cleared at 7000g, and kept at –80°C. The cells were rinsed three times with ice-cold saline solution, scraped into fresh saline, and homogenized by sonication (UP200S, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany). In some experiments cells and supernatants were collected at different time intervals (0, 3, 6, 9, and 24 hours). In other experiments tunicamycin (10 μ g/mL), an inhibitor of N-glycosylation, was added

TABLE 1. Probes Used in the AP Modulation Experiments

Probe	Concentration Used	Role
8-bromo-cAMP	0.5 mM	Cell permeable cAMP analog
Actinomycin D	8 μ M	Transcription inhibitor
Ascorbic acid	50 μ M	Antioxidant
Bisindolylmaleimide I	100 nM	PKC inhibitor
Butyrate	8 mM	Enterocyte differentiation
Cycloheximide	35 μ M	Protein synthesis inhibitor
Forskolin	0.1 μ M	Adenylate cyclase activator
Genistein	3 μ M	Tyrosine kinase inhibitor
Glutathione	5 mM	Antioxidant
H89	1 μ M	PKA inhibitor
IFN- γ	10 ng/ml	Proinflammatory cytokine
IL-1 β	10 ng/ml	Proinflammatory cytokine
Indomethacin	1 μ M	Cyclooxygenase blocker
Ionomycin	1 μ M	Ca ²⁺ ionophore
Isobutylmethylxanthine (IBMX)	0.5 mM	cAMP phosphodiesterase blocker
L-N ⁶ -(1-iminoethyl)lysine	3 μ M	Inducible nitric oxide synthase inhibitor
Mannitol	40 mM	Hyperosmolarity
N-acetyl cysteine (NAC)	200 μ M	Antioxidant
PD98059	10 μ M	ERK inhibitor
PMA	1 μ M	Protein kinase C activator
Prednisolone	20 μ M	Glucocorticoid
Saponin	0.02%	Detergent
SB203580	10 μ M	p38 inhibitor
Sodium deoxycholate	0.8 mM	Detergent
SP600125	10 μ M	JNK inhibitor
TNF- α	10 ng/ml	Proinflammatory cytokine

24 hours prior to the oxidative insult and the samples were collected the next day.

Signal Transduction

In order to verify the signal transduction pathway responsible for the changes in AP expression a number of pharmacological probes were assayed (Table 1). The probes were added to the cells 1 hour before tButOOH, except prednisolone (4 hours), actinomycin D (15 minutes), cycloheximide (15 minutes), and tunicamycin (24 hours). In all cases the vehicle (water, ethanol, or dimethyl sulfoxide) was added to the controls. They were previously shown to have no effect on AP or supernatant lactate dehydrogenase activities at the concentrations used (<0.1%).

Western Blot

The samples were homogenized in ice-cold buffer consisting of 0.1% sodium dodecylsulfate, 0.1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) with freshly added protease inhibitors (phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, pepstatin A, 1,10-phenanthroline).

The protein content was measured by the bicinchoninic acid assay,⁴⁶ using bovine serum albumin as standard. Samples were boiled for 4 minutes in Laemmli buffer, separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), electroblotted onto nitrocellulose or PVDF membranes, and blocked with 5% (w/v) nonfat dry milk in Tris-buffered saline. After incubation with the proper antibodies the bands were detected by enhanced chemiluminescence (NEN, Zaventem, Belgium).

In one of the experiments the samples (IEC18 homogenates) were digested with neuraminidase for 3 hours at 37°C, subjected to electrophoresis under nondenaturing conditions (omitting 2-mercaptoethanol and the boiling step), electroblotted onto nitrocellulose membranes, and enzymatic activity detected by the NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) chromogenic technique.

Immunocytochemistry

IEC-18 cells were grown on Nunc Lab-Tek II Chamber Slides, treated with tButOOH or vehicle for 6 or 16

hours, washed with PBS and fixed with 1% formaldehyde in phosphate buffer, blocked with PBS/horse serum, and incubated with B4-78 antibody (1:50, with 0.1% saponin) followed by antimouse IgG-FITC. The samples were examined with a Leica DMI 3000B fluoromicroscope. The slides not treated with primary antibody showed a virtually blank field (not shown).

RNA Isolation, Northern Blot, and Quantitative Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis

Total RNA was isolated from cells by the Trizol method (Invitrogen, Barcelona, Spain), checked for integrity by gel electrophoresis, retrotranscribed with iScript cDNA Synthesis kits (BioRad Laboratories, Madrid, Spain), and analyzed by qPCR using a Stratagene (La Jolla, CA) MX800 device. The following primers were used: TNAP sense 5'-TGGCTCTCTCCAAGACGTAC-3' and antisense 5'-CTGGGCGCATCTCATTGTC-3'; 18 S sense 5'-CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3', antisense 5'-CGCCGGTCCAAGAATTCACC-3'. In addition, IAP isoform expression was measured in IEC18 cells by Northern blot. Briefly, equal amounts (30 μ g) of total RNA were resolved using 1% agarose/formaldehyde gels, transferred to a nylon membrane (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) and crosslinked using a UV-Stratalinker (Stratagene). Prehybridization and hybridization with ³²P-labeled probes were carried out in ULTRAhyb solution (Ambion, Austin, TX) at 42°C. The IAP probe was obtained previously.³⁸ The probe recognizes both isoenzymes of the rat IAP.⁴⁷

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences among means were tested for statistical significance by one-way analysis of variance and a posteriori least significance tests on preselected pairs. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Oxidative Stress Causes AP Induction in Cultured Intestinal Epithelial Cells

Since oxidative stress is one of the most important features of the inflammatory reactions, we focused initially on the effects of several oxidative stimuli on AP activity in cultured cell lines. Cell lines were used as an experimental model because primary intestinal epithelial cells show reduced viability *in vitro*. Figure 1A shows that monochloramine, tButOOH, and H₂O₂ all elicited a marked increase in AP activity in three different intestinal epithelial cell lines. In addition, similar effects were obtained with sodium hypochloride and iodoacetamide, a sulfhydryl blocker

(data not shown). The AP activity increase was always associated with cell toxicity, as evidenced by elevated LDH levels in the cell media (see Figs. 3 and 8, for instance) and by occasional cell shedding. We selected the IEC18 cell line for subsequent experiments because it is not of tumor origin and therefore may resemble more closely the normal behavior of enterocytes.

AP Increase Is Associated with Cell Toxicity and Accompanied by Changes in Sensitivity to Chemical Inhibitors and Heat

Because in our former study with *in vivo* experimental models of inflammatory bowel disease (IBD) the increase in enzyme activity was linked to a change in sensitivity to chemical inhibitors such as levamisole, we examined this issue in IEC18 cells. Consistent with our previous results, AP activity in oxidant-exposed cells was much more sensitive to inhibition by levamisole (Fig. 1B). Similar results were obtained with homoarginine and with sensitivity to heat, and also with the other cell lines (data not shown). As shown in Figure 1C, the rat AP isoforms characterized by high inhibition by levamisole include the kidney and bone variants, while those present in testes, liver, and the small intestine are resistant.^{8,48} tButOOH in our hands was the most consistent of all the agents assayed and thus was selected for further experimentation. tButOOH induced AP activity starting at 300 μ M but the sensitivity to levamisole (percent inhibition of basal AP activity) was augmented at lower concentrations (Fig. 1D). The occurrence of oxidative stress in IEC18 cells was confirmed by the reduction in the glutathione content, from 13.3 ± 3.6 nmol/mg protein to usually unmeasurable levels after 24 hours (data not shown). The increase in AP activity could be induced in as little as 10 minutes (but not 5 minutes) of exposure to tButOOH (not shown). AP activity upregulation could be detected starting 3–9 hours after tButOOH exposure and peaked at 12–24 hours (the latest timepoint examined). As shown in Figure 2A, AP followed a completely different kinetics than that of other brush border enzymes, namely, leucine aminopeptidase and maltase, which were first inhibited and then recovered but without surpassing preexposure levels. Thus, the increase of AP activity seems to be enzyme-specific.

Because of the varied nature of the agents used to induce AP activity the underlying mechanism is supposed to be oxidative stress. Thus, we attempted to reverse this effect by the use of antioxidants (Fig. 2B). Neither glutathione, ascorbic acid, nor N-acetylcysteine prevented the increase in AP activity. These treatments tended to reduce the increase in levamisole sensitivity, but without reaching statistical significance in any case (data not shown). Furthermore, none of these treatments counteracted glutathione depletion (data not shown). Similarly, rutin and its active

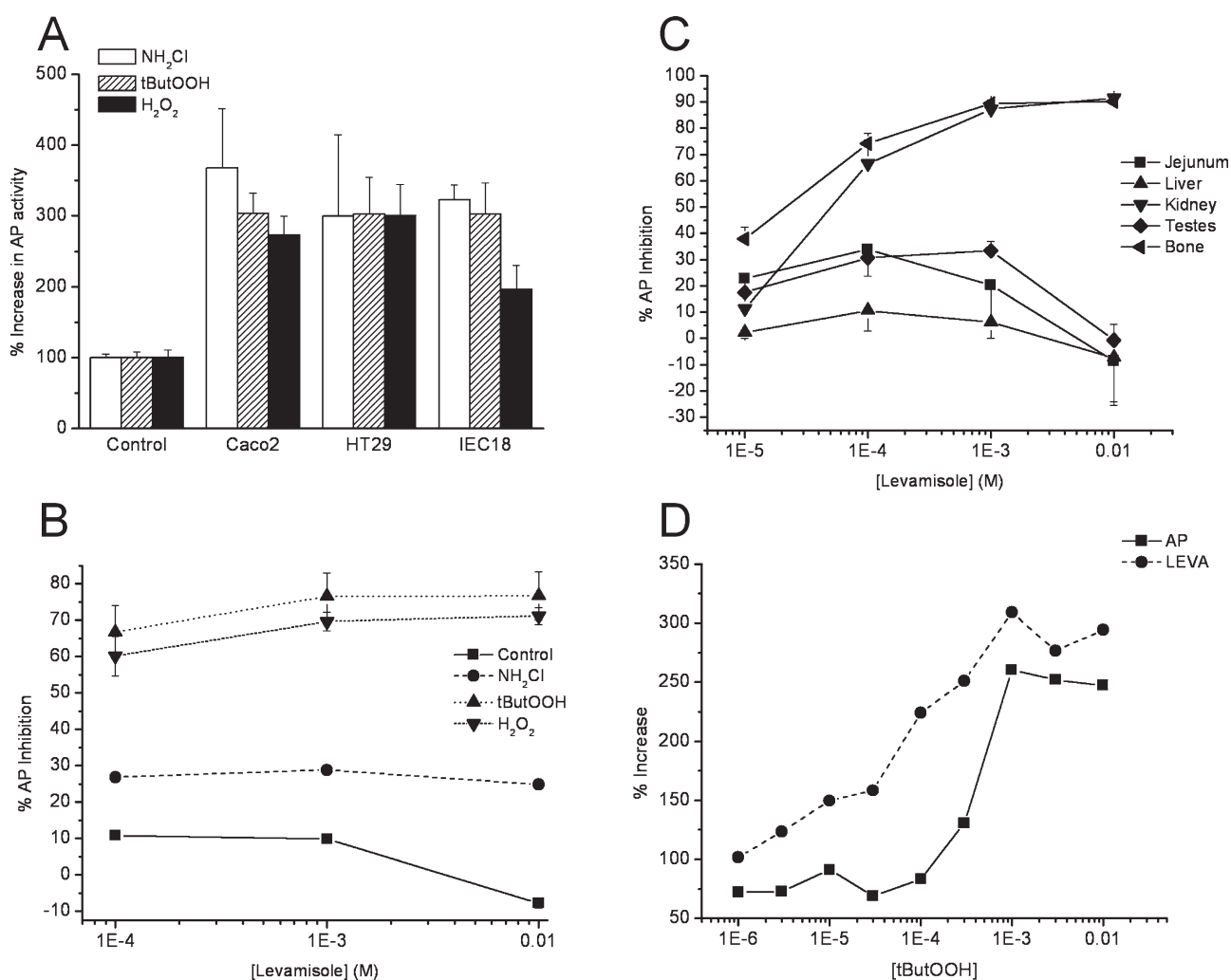


FIGURE 1. Oxidative stimuli increase AP activity in intestinal epithelial cell lines. Confluent monolayers of Caco-2, HT29, and IEC18 cells were treated with 1 mM NH₂Cl, 10 mM H₂O₂, or 1 mM tButOOH. (A) Increase in AP activity compared to the control group. The basal AP activity was (mU/mg prot): 50.7 ± 12.1 (Caco-2), 8.9 ± 1.9 (HT29), 7.3 ± 0.4 (IEC18). (B) Sensitivity of AP activity in IEC18 cells to levamisole under different oxidants. Data shown for (A,B) are representative of three different experiments. (C) Sensitivity of AP in different rat tissues to levamisole. (D) Concentration–response curve of AP induction to tButOOH in IEC18 cells (representative of four experiments). Data are mean ± SEM (n = 5–8). All means in (A,B) are significantly different from the control group (not shown).

moiety, quercetin, were ineffective in preventing the increase in AP (Fig. 3D). Thus, even high concentrations of the antioxidants were insufficient to overcome cell toxicity.

Effect of Other Stimuli on AP Activity

We tested the effects of a number of additional cell stimuli on AP activity (Fig. 3). Butyric acid produced a relatively small but significant increase in enzyme activity (Fig. 3A) which was associated to augmented sensitivity to levamisole (Fig. 3B). The removal of serum from the media tended to decrease AP and sensitivity, but without reaching statistical significance. Hyperosmolarity, LPS, and the proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF and IFN- γ had

no effect on enzyme activity, but both hyperosmolarity and IL-1 β diminished the sensitivity to levamisole. The detergents saponin and sodium deoxycholate were almost as effective as oxidants in eliciting both cell toxicity and augmented AP activity and sensitivity to levamisole, i.e., just like oxidative agents.

Increase in AP Activity in IEC18 Cells Is Related to Changes in Glycosylation of the Tissue-nonspecific Isoform

The isoform of AP expressed by IEC18 cells is unknown. Northern (and Western blot, not shown) analyses ruled out intestinal AP expression in IEC18 cells (Fig. 4A).

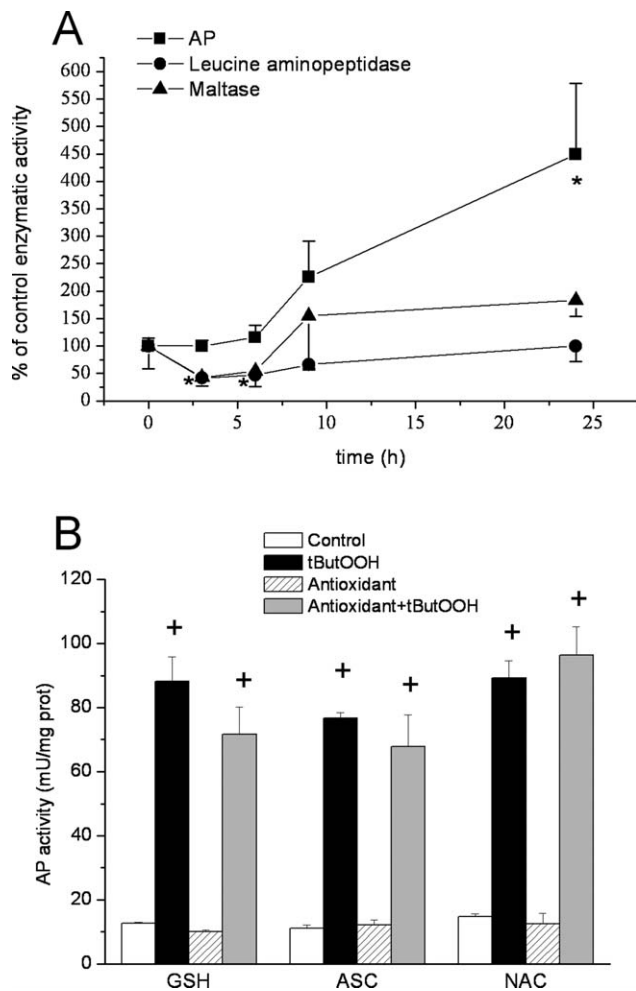


FIGURE 2. AP activity is selectively induced in enterocytes by oxidative stress. (A) Time course of alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase (LAP), and maltase activities in IEC18 cells exposed to 2.5 mM monochloramine ($n = 5$). Data are expressed as percent of enzyme activity without monochloramine. (B) Effect of antioxidant pretreatment on AP induction by tButOOH. $^+P < 0.05$ versus control, $*P < 0.05$ versus tButOOH.

In contrast, Western blots using the TNAP antibody B4-50 showed a clear band of the correct size (≈ 57 kD), which was significantly increased in the tButOOH-treated cells. Very similar results (not shown) were obtained with B4-78 and the TRA-2-39 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Interestingly, the immunoreactivity to B4-50 increased immediately (less than 1 hour) after the oxidative challenge, while the B4-78 signal remained stable for some hours (Fig. 4C). Because TNAP requires normal N-glycosylation for activity,⁴⁹ we subjected normal and oxidative stress-treated IEC18 cells to neuraminidase digestion and examined the pattern of electrophoretic migration of the enzyme (Fig. 4D). This pattern was changed by both monochloramine exposure and neuraminidase, indicating that the

enzyme is sialylated differently in both conditions. Furthermore, when we pretreated IEC18 cells with tunicamycin (an inhibitor of N-glycosylation) for 24 hours before the tButOOH challenge, we found that even though the increase in activity was not prevented (it was actually enhanced, Fig. 5A), the change in the sensitivity to levamisole was totally prevented (Fig. 5B), thus confirming our hypothesis.

Immunocytochemical analysis using the B4-78 antibody showed a weak but significant staining of quiescent IEC18 cells (Fig. 4E), which was dramatically augmented after exposure to 1 mM tButOOH. This induction was already apparent at 5 hours. It should be noted that staining was predominantly cytoplasmic rather than in the membrane in both cases. Despite the above, TNAP mRNA levels did not change after tButOOH addition (Fig. 4F). As shown in Fig. 4G, the other oxidants, H_2O_2 and monochloramine, also failed to affect TNAP mRNA levels after 1 hour.

Activation of the MAP Kinase and NF- κ B Pathways by Oxidative Stress Does Not Lead to AP Activity Induction

We focused next on signal transduction mechanisms leading to induction of AP activity. The MAPK pathways are activated by a number of stimuli causing cell stress, and therefore we examined their status by measuring phosphorylated ERK, p38 (SNPK), and JNK by Western blot (Fig. 6A). As expected, the amount of phosphorylated enzyme was markedly augmented shortly after tButOOH. Thus, we proceeded to perform intervention experiments with the specific inhibitors, PD98059, SB203580, and SP600125, respectively. However, neither had any effect on AP activity in the presence or absence of oxidative stress (Fig. 6B).

Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) and Ca^{2+} Signaling Pathways Are Not Involved in AP Induction

We also performed a pharmacological screening seeking a signaling pathway involved in the increase in AP activity after oxidative stress. As shown in Figure 7A, treatment of IEC18 with different stimulants of the cAMP / protein kinase A (PKA) pathway, including the cAMP analog 8-Br-cAMP, the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutylmethylxanthine (IBMX), and the adenylate cyclase activator forskolin, produced a small albeit significant increase in AP activity (the former did not reach statistical significance). In an attempt to obtain a more substantial effect a "cocktail" of all three agents was applied to IEC18 cells. As a result the AP increase was indeed higher but still far from the magnitude of the surge subsequent to oxidative stress. In line with this minor role, both cAMP-dependent

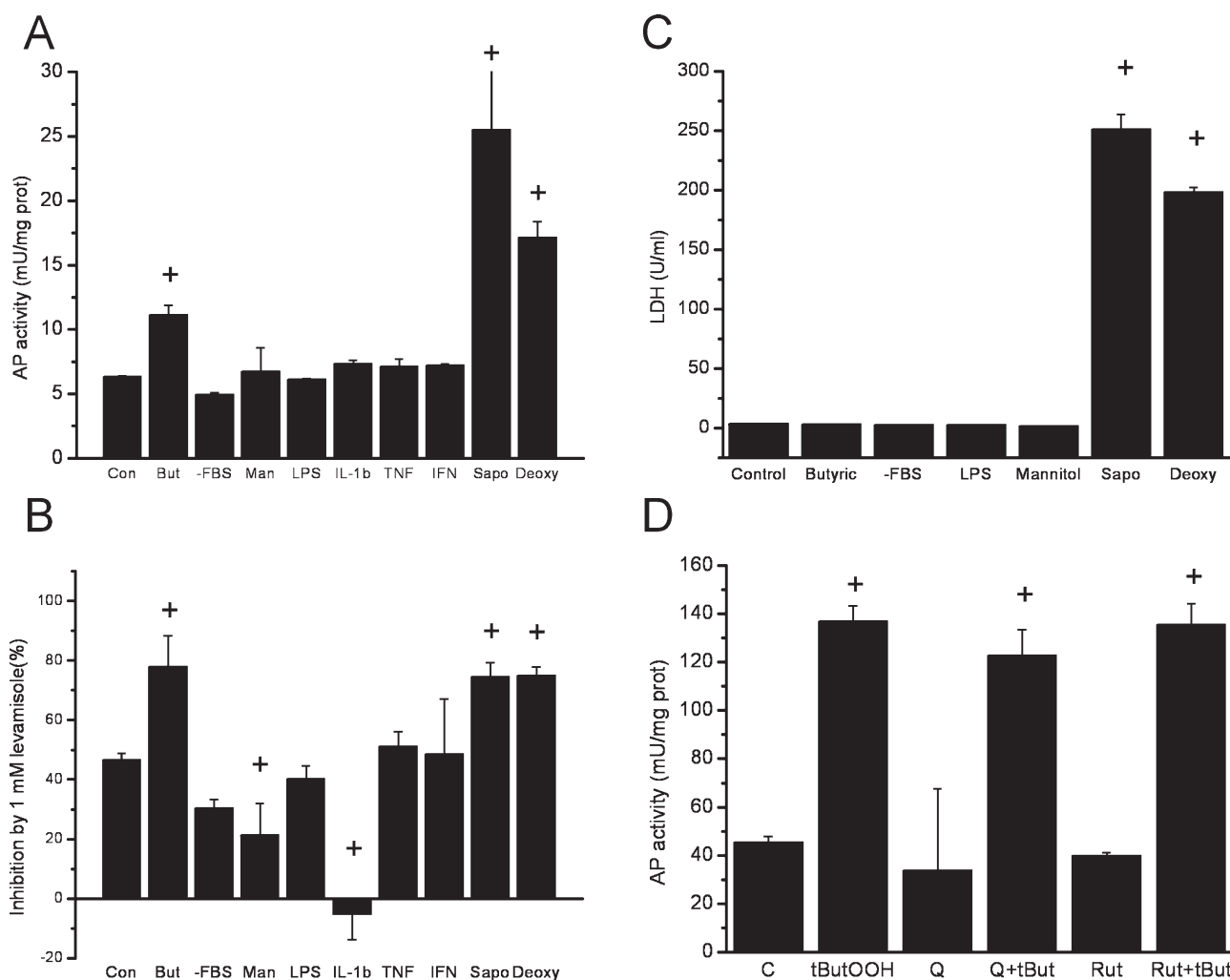


FIGURE 3. Effect of several treatments on AP induction by oxidative stress. IEC18 cells were exposed to different treatments as detailed in Materials and Methods and then oxidative stress was evoked with 1 mM ButOOH. (A) AP activity. (B) AP sensitivity to 1 mM levamisole. (C) LDH activity in the supernatant. (D) Effect of flavonoids on AP activity.

stimuli and the PKA-specific blocker H89 had no effect on oxidative stress-evoked AP induction (Fig. 7B,C). On the other hand, neither the PKC activator PMA nor the Ca²⁺ ionophore ionomycin produced any changes in AP activity in IEC18 (Fig. 7D). Thus, both signaling pathways are irrelevant to the increase in AP produced by oxidative stress. Similarly, we did not observe any changes with prednisolone or with iNOS, protein kinase C, tyrosine kinase, or cyclooxygenase inhibitors (data not shown).

AP Increase Is Not Inhibited by Actinomycin D or Cycloheximide

Finally, we examined whether AP induction depends on gene transcription and translation. A classical pharmacological approach using actinomycin D (ActD) and cyclo-

heximide (CHX), respectively, was followed. ActD (8 μM) tended to increase AP activity and LDH release to the medium, but this was not a significant effect globally. Interestingly, ActD not only failed to prevent the AP increase after tButOOH addition but actually enhanced it dramatically (Fig. 8A). This was accompanied by higher LDH levels, suggesting augmented cell stress/toxicity (Fig. 8B). On the other hand, CHX (35 μM) failed to affect either AP activity or LDH levels on its own. When applied together with tButOOH, cell toxicity was potentiated marginally, but AP activity was not further increased (Fig. 8C,D). Higher concentrations of both agents had similar effects (data not shown). The potentiation of cell toxicity by ActD and even CHX could also be observed with very short exposure to tButOOH (5 minutes), which is insufficient to elicit effects on AP or LDH by itself (not shown).

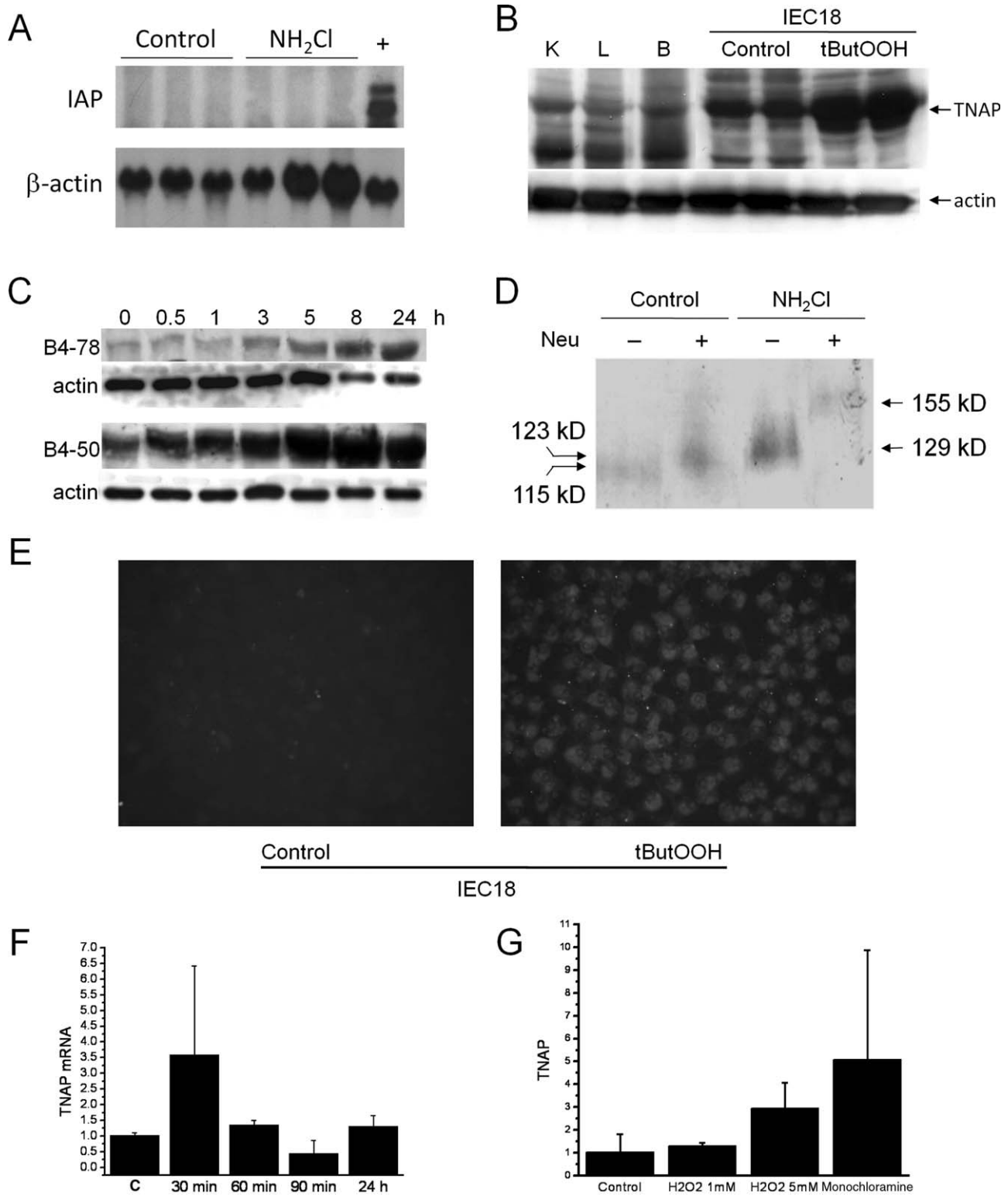


FIGURE 4. Expression of TNAP in IEC18 cells. (A) Northern blot of IAP under quiescent and monochloramine treatment conditions (+: rat ileum, positive control). (B) Western blot showing increased expression of TNAP, detected as a 57-kDa band aligned with that of a rat kidney (K), liver (L), and bone (B) homogenates. (C) Time course of TNAP increase evoked by oxidative stress. (D) Response of the AP of IEC18 cells to neuraminidase, showing differences in electrophoretic mobility of the digested enzymes (run as active dimers under nondenaturing conditions; representative of two blots, n = 5). (E) Immunocytochemical analysis of TNAP expression in IEC18 cells under oxidative stress (B4-78 antibody, 5 hours after tButOOH). (F) qRT-PCR analysis of TNAP expression in IEC18 cells under oxidative stress induced by tButOOH. (G) qRT-PCR analysis of TNAP expression in IEC18 cells under oxidative stress induced by H₂O₂ and monochloramine.

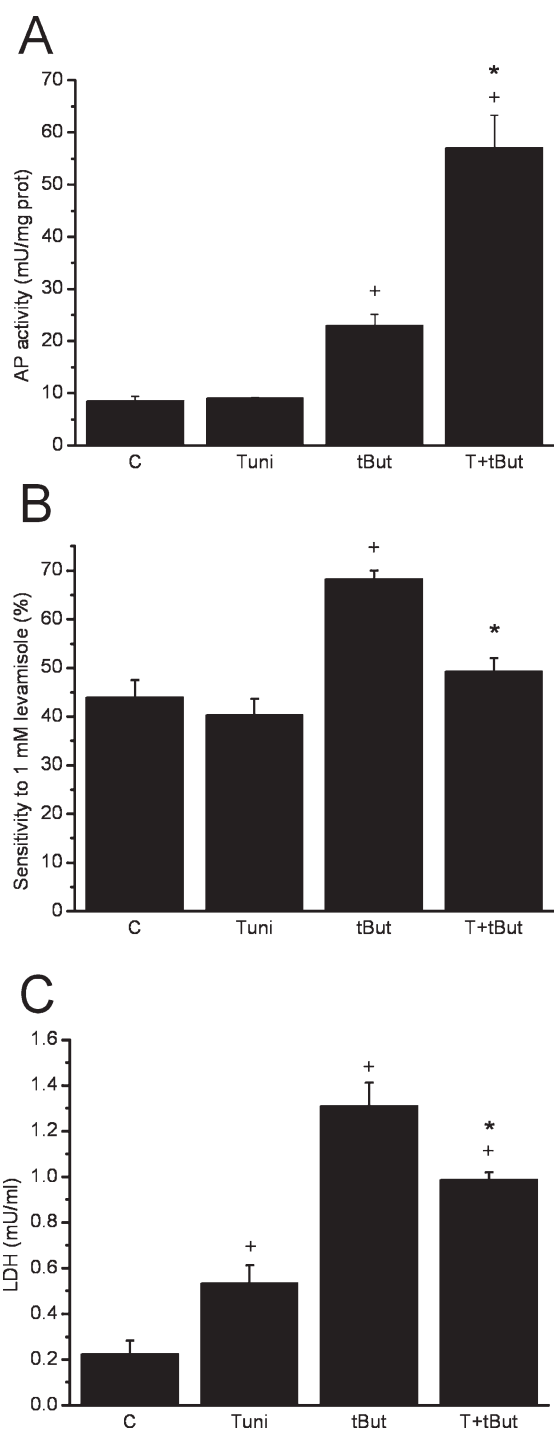


FIGURE 5. Effect of tunicamycin on AP activity induction in IEC18 cells. Tunicamycin pretreatment (24 hours) enhanced the effect of tButOOH on AP activity (A), but prevented the increase in the sensitivity to the inhibitor levamisole (B) and reduced LDH leakage (C). Data are mean \pm SEM (n = 4–5). C, control group; Tuni, tunicamycin group; tBut, tButOOH group; T+tBut, cotreatment group. ⁺P < 0.05 versus control *P < 0.05 versus tunicamycin group. Similar results were obtained using monochloramine.

DISCUSSION

The present study stems from previous data from our group showing a marked upregulation of AP activity in the inflamed intestine. Both infiltrating leukocytes and intestinal epithelial cells appear to contribute to this phenomenon *in vivo*.^{38,50} However, the increase due to infiltration of leukocytes is thought to be simply the result of cell accumulation, without intracellular changes in AP expression. Conversely, primary enterocytes show evidence of a change in isoform. The investigation of the molecular mechanisms leading to AP upregulation in the enterocyte, the next step in our study, is obviously facilitated to a great extent with the use of an *in vitro* model, since primary enterocytes show very limited viability *in vitro*. This approach is hampered, however, by the complex nature of the inflammatory response, which is difficult to reproduce in simple models and also complicates the identification of

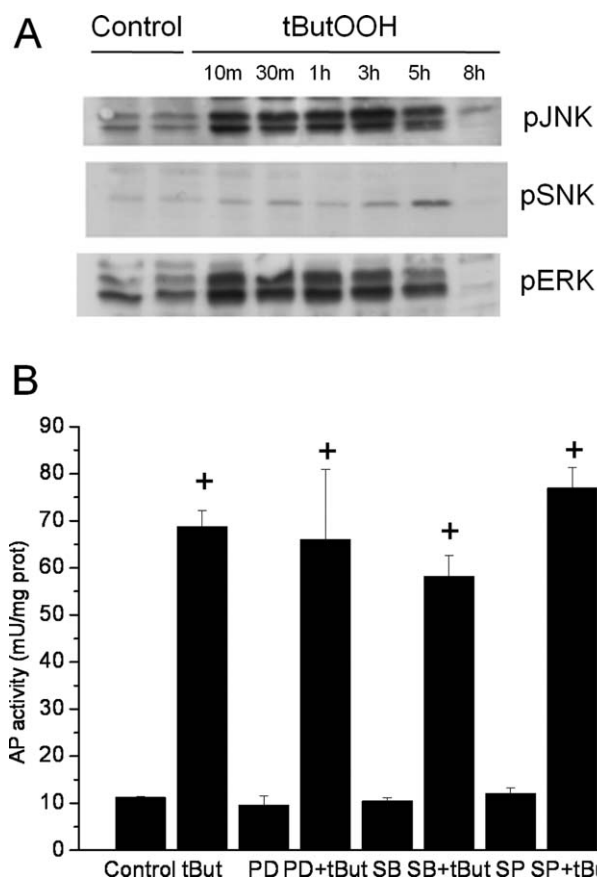


FIGURE 6. The increase of AP activity is insensitive to MAPK inhibitors. (A) Western blot showing increased phosphorylation of ERK, p38, and JNK after 1 mM tButOOH exposure. (B) Pretreatment of IEC18 cells with inhibitors for ERK (PD98059), JNK (SP600125), or p38 (SB203580) failed to affect AP induction by oxidative stress. ⁺P < 0.05 versus control.

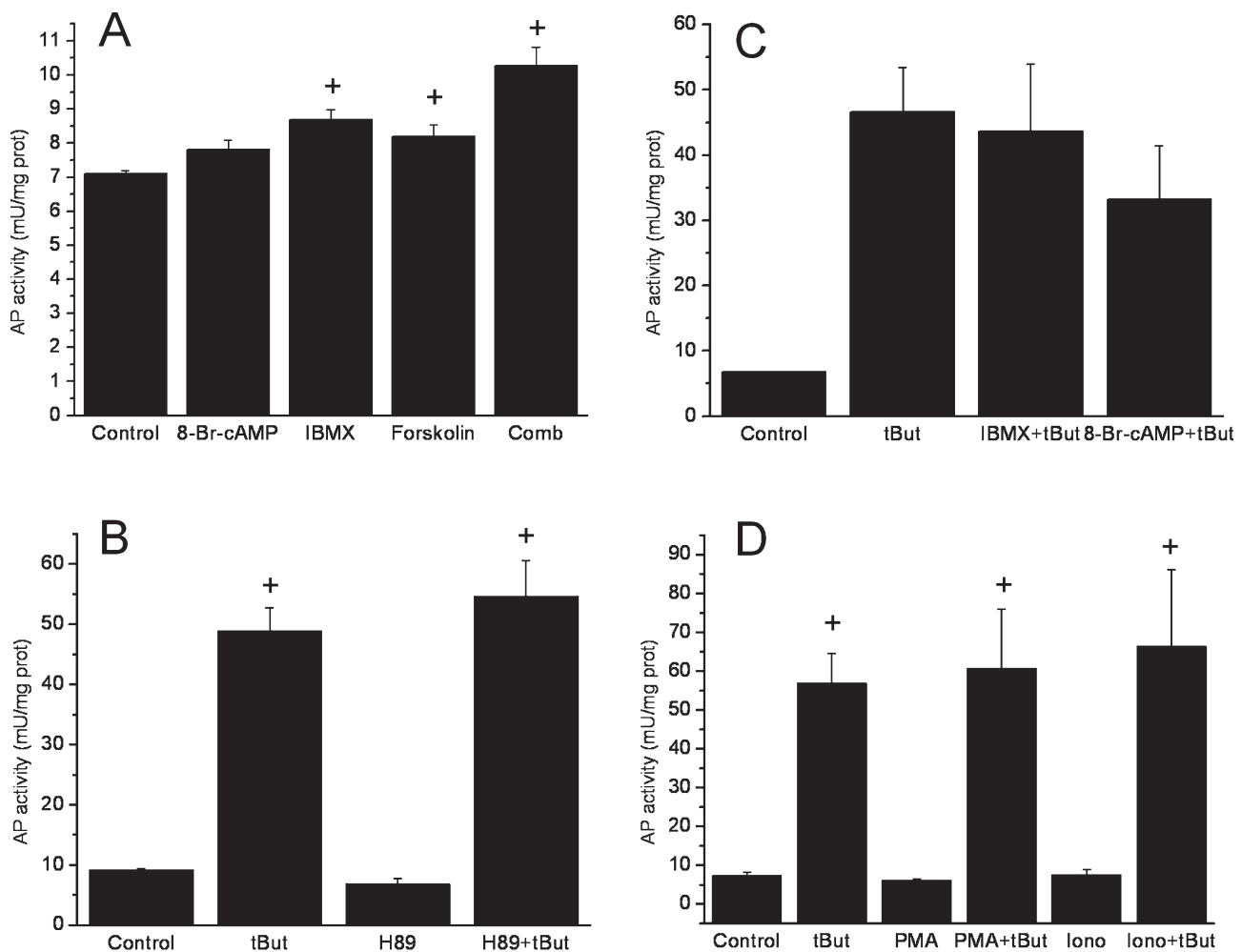


FIGURE 7. Effect of several modulators of signal transduction on AP activity in IEC18 cells. (A) Effect of agents that activate the cAMP pathway (comb: combination of the three individual probes). (B) Effect of the PKA inhibitor, H89, on tButOOH evoked AP induction. (C) Effect of IBMX and 8-Br-cAMP on tButOOH evoked AP induction. (D) Effect of ionomycin (Iono) and PMA on tButOOH evoked AP induction. $^+P < 0.05$ versus control.

the exact factors involved in the AP increase. One of the most prominent features of intestinal inflammation is a marked oxidative stress. We had previously observed that AP was lowered by treatment of experimental colitis with antioxidant drugs such as the flavonoids quercitrin and rutin,^{37,51} which also counteracted the depletion of intestinal glutathione. In contrast, diosmectite, which does not affect AP, has little impact on colonic glutathione levels.⁵² Hence, we hypothesized that oxidative stress might be the causative factor of the AP increase. Our data clearly support this hypothesis since AP is increased in several cell lines of intestinal epithelial phenotype with different oxidative stimuli, including monochloramine, which is produced in high amounts in inflammatory foci as a byproduct of the reaction of myeloperoxidase derived hypochlorous acid with amines,⁴⁵ and tButOOH, which was used here to evoke lipid peroxidation. The observed increase in AP in

vitro shares many of the characteristics of the AP surge in the inflamed intestine and in primary enterocytes. Thus, AP induction is associated with augmented sensitivity to levamisole (as well as to homoarginine and heat) and increased tissue-nonspecific AP immunoreactivity. Similar also to normal colon,^{28,53} IAP is not expressed by IEC18 cells, which were selected for most of the experiments after this first screening. Taken together, our results strongly suggest that these cells express the liver isoform at the basal state and that either the kidney or the bone isoform is induced by oxidative stress, thus validating the cell model.

We then used our cell model to study the mechanism of AP induction. The time evolution of AP expression and activity is consistent with de novo transcription and/or translation. Remarkably, however, the net effect of ActD was not inhibition but strong potentiation of AP activity induction. There are two possible interpretations: one, there

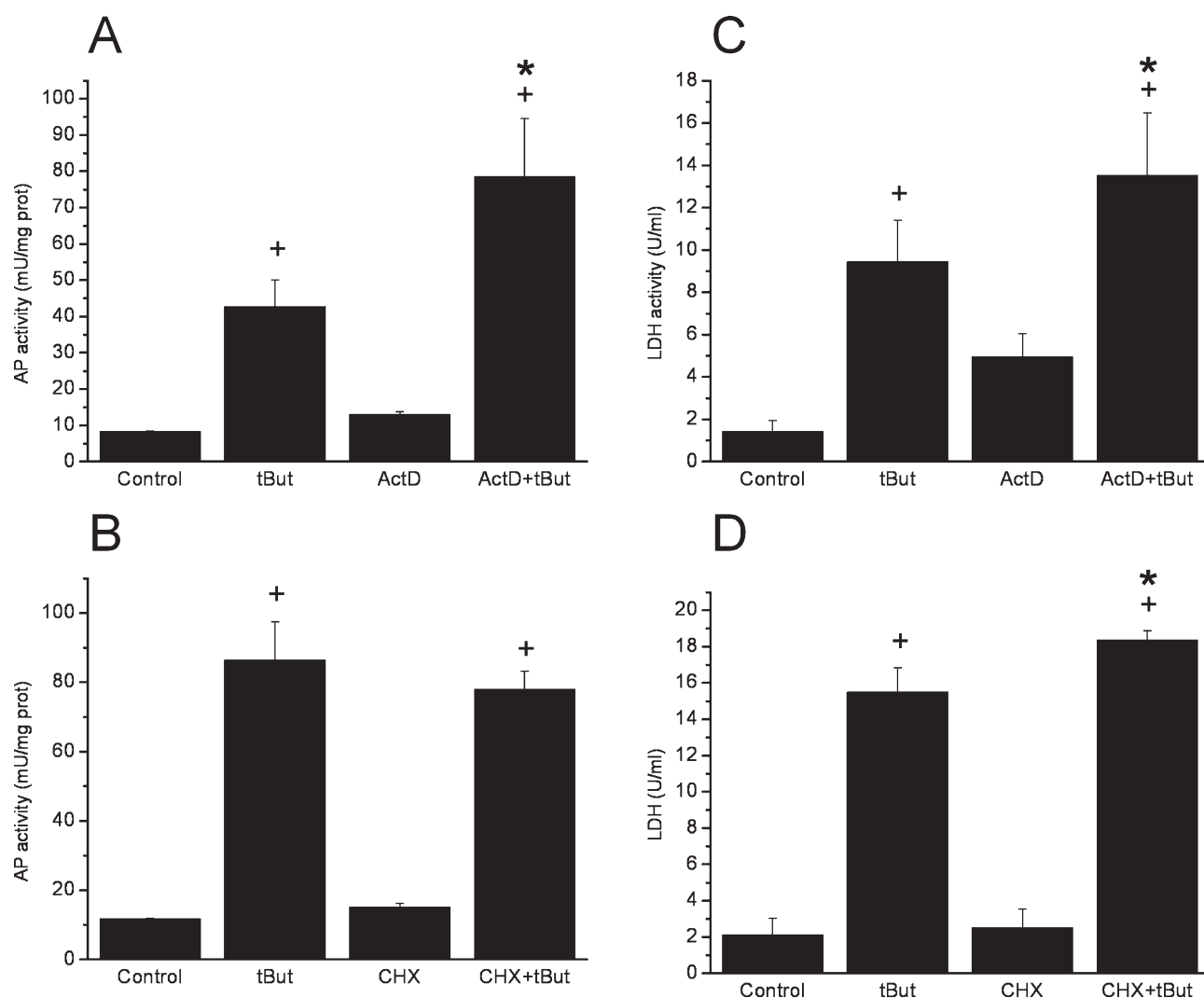


FIGURE 8. Effect of actinomycin D and cycloheximide on AP induction in IEC18 cells. IEC18 cells were treated with 8 μ M actinomycin D (A,B) or 35 μ M cycloheximide (C,D) and then with 1 mM ButOOH. AP activity (A,C) and LDH activity in the supernatant (B,D) are shown. $^+P < 0.05$ versus control, $^*P < 0.05$ versus tButOOH.

is a gene whose expression is involved in AP downregulation and which is blocked by ActD, so that the final result depends on the balance of directly repressed (to a degree) AP expression and indirect stimulation (by removing the obstructing gene). Two, ActD produces cell stress which in itself induces AP, which would therefore “escape” the blockade of transcription. These two possibilities are not mutually exclusive. However, the lack of inhibition of the RNA polymerase inhibitor CHX and the lack of changes observed in TNAP mRNA levels argues in principle against an involvement of either transcription or translation. There are precedents to these observations. Thus, ActD and CHX have been shown to augment AP activity in a hepatoma cell line accompanied by increased sensitivity to heat and homocysteine despite virtually total abrogation of [14 C]leucine

uptake.⁵⁴ In line with this, we have observed that very short (5-minute) exposures of IEC18 cells to tButOOH do not result in either cell toxicity or AP increase, but when ActD or CHX are added a marked effect is observed in both cases. Because the three TNAP isoforms differ only at the glycosylation level and the other AP forms do not require N-glycosylation for activity,⁴⁹ AP appears to be modified posttranscriptionally via changes in the glycosylation pattern. The molecular and chemical/heat sensitivity data are fully consistent with a change from liver to either bone or kidney isoform. The exact mechanism remains to be defined.

It should be noted that although the antibody-based analyses suggest an increase in protein expression, this might not be the case, because the antibodies used recognize all three TNAP isoforms. The two monoclonal

antibodies we used were developed by Dr. Jerry A. Katzmann. B4-50 was found originally to differ in sensitivity towards bone and liver TNAP (the kidney type was not tested), so that B4-50 binds preferentially the latter, while B4-78 is nonselective.⁵⁵ It is intriguing to see therefore how the B4-50 signal precedes that of the B4-78 antibody, suggesting that the change in isotype develops over this time frame. Because the liver TNAP isoform appears to have a much lower enzymatic activity than the bone and kidney types, a simple change in glycosylation pattern may suffice to explain our data. This cannot be ascertained without specific antibodies.

Another argument against the involvement of transcriptional mechanisms is the lack of substantial effects of modulators of the cAMP/PKA pathway, which we expected to be involved because cAMP has been reported to activate TNAP transcription in mouse cells.^{56,57} This effect is achieved via the interaction with the so-called second promoter, located upstream from exon 1B, i.e., the untranslated exon common to the liver and kidney isoforms.⁵⁸ The transcript driven by this promoter has been described to be expressed at high levels only in the heart but can be switched on by cAMP analogs in mouse fibroblasts. The PKA pathway can also augment AP in LLC-PK1 cells. However, our data are not consistent with any relevant involvement of this pathway.

It is interesting to speculate about the possible role, if any, of the AP increase. The function of AP in the intestine has been obscure for years, but recently the group of Richard Hodin has published evidence that the intestinal AP isoform is important for the maintenance of barrier function and LPS inactivation.²⁷ Considering these data and the fact that TNAP can also inactivate LPS,^{25,26} it is feasible that TNAP induction serves a protective purpose in conditions of oxidative stress. Also, recently exogenously added IAP has been used successfully to dampen experimental colitis.²⁸ Interestingly, IAP expression was found to be inhibited in both ulcerative colitis and Crohn's disease in the same study. This is quite consistent with a longitudinal genomic study performed by our group in the trinitrobenzenesulfonic acid colitis model, in which only Akp2 (TNAP) was upregulated, while Alpi and Alpi2 (IAP) were unaffected, at the mRNA level.⁵⁹ Of course, IAP expression is very low or undetectable in the colon in normal conditions, as stated above. Thus, it is conceivable that TNAP may play the IAP protective role in inflammatory conditions. Furthermore, because butyrate increases TNAP, it may be involved in the physiological regulation of this line of defense. Although this increase in AP has been classically considered the result of epithelial differentiation, it is clearly due to TNAP rather than IAP in IEC18 cells according to our data, and the same has been observed in the related IEC6 cells.⁶⁰

Of note, our immunocytochemical analysis shows that TNAP does not localize to the membrane but to the cytoplasm, both in quiescent and stress conditions. Although the reason is unknown, there are precedents to this finding.^{61,62} Interestingly, TNAP expression appeared to be cytoplasmatic also in epithelial cells in colitic rats in our previous study.³⁸ Although cytoplasmatic localization probably precludes direct shedding of the enzyme, cell death would arguably pour TNAP into the intestinal lumen, thus contributing to intestinal defense. We have recently shown that fecal matter is enriched in TNAP in two different preclinical models of IBD: rat trinitrobenzene sulfonic acid and mouse lymphocyte transfer colitis (submitted). Thus, it is possible that this mechanism contributes to mucosal defense under inflammatory conditions.

Lastly, we had previously shown that the AP inhibitor levamisole and the B4-78 monoclonal antibody have a modest therapeutic effect in the trinitrobenzenesulfonic acid model of colitis. However, levamisole has well-known immunomodulatory properties, and the B4-78 antibody does not block enzyme activity (unpubl. data) and may target leukocytes rather than enterocytes in vivo. Thus, these data may be perfectly consistent with a protective role of intestinal AP.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Tsukamoto and Dr. Katzmann for the different AP antibodies, and Dr. Mercedes González for invaluable technical help.

REFERENCES

1. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1994; 31:197-293.
2. Koyama I, Miura M, Matsuzaki H, et al. Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatases: differences between normal and tumour-associated isozymes. *J Chromatogr.* 1987;413:65-78.
3. Matsuura S, Kishi F, Kajii T. Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168:993-1000.
4. Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7182-7186.
5. Martins MJ, Negrão MR, Hipólito-Reis C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem.* 2001; 34:463-468.
6. Moss DW, Whitaker KB. Modification of alkaline phosphatases by treatment with glycosidases. *Enzyme.* 1985;34:212-216.
7. Tojyo Y. A comparison of the alkaline phosphatases of rat dental pulp, bone, kidney, liver and intestine. *Arch Oral Biol.* 1983;28: 103-107.
8. Wada H, Niwa N, Hayakawa T, et al. Changes of serum alkaline phosphatase isoenzymes in fasted rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1996;42:435-447.
9. Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, et al. Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem.* 1988;263:12011-12019.

10. Berger J, Garattini E, Hua JC, et al. Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:695–698.
11. Mulivor RA, Hannig VL, Harris H. Developmental change in human intestinal alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:3909–3912.
12. Mulivor RA, Plotkin LI, Harris H. Differential inhibition of the products of the human alkaline phosphatase loci. *Ann Hum Genet*. 1978;42:1–13.
13. Ali NN, Rowe J, Teich NM. Constitutive expression of non-bone/liver/kidney alkaline phosphatase in human osteosarcoma cell lines. *J Bone Miner Res*. 1996;11:512–520.
14. Kato M, Brijlall D, Adler SA, et al. Effect of hyperosmolality on alkaline phosphatase and stress-response protein 27 of MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;23:241–249.
15. Mulivor RA, Boccelli D, Harris H. Quantitative analysis of alkaline phosphatases in serum and amniotic fluid: comparison of biochemical and immunologic assays. *J Lab Clin Med*. 1985;105:342–348.
16. Moss DW. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clin Chim Acta*. 1997;257:133–140.
17. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9445–9449.
18. Narisawa S, Frohlander N, Millan JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn*. 1997;208:432–446.
19. Zurutuza L, Muller F, Gibrat JF, et al. Correlations of genotype and phenotype in hypophosphatasia. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1039–1046.
20. Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, et al. Different missense mutations at the tissue non-specific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:9924–9928.
21. Young GP, Friedman S, Yedlin S, et al. Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum. *Am J Physiol*. 1981;241:G461–G468.
22. Eliakim R, Karmeli F, Cohen P, et al. Sulphydryl blocker-induced rat colitis is ameliorated by intravenous injection of antibody to colonic surfactant-like particle. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5:16–23.
23. Mahmood A, Shao JS, Alpers DH. Rat enterocytes secrete SLPs containing alkaline phosphatase and cubilin in response to corn oil feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285:G433–G441.
24. Nakano T, Inoue I, Koyama I, et al. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene *Akp3* impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G1439–G1449.
25. Bodrogi L, Brands R, Raaben W, et al. High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res*. 2006;15:627–636.
26. Poelstra K, Bakker WW, Klof PA, et al. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol*. 1997;151:1163–1169.
27. Goldberg RF, Austen WG Jr, Zhang X, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3551–3556.
28. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krieken A, et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut*. 2009;58:379–387.
29. Hui MZ, Tenenbaum HC, McCulloch CA. Collagen phagocytosis and apoptosis are induced by high level alkaline phosphatase expression in rat fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1997;172:323–333.
30. Komoda T, Koyama I, Nagata A, et al. Ontogenic and phylogenetic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development. *Gastroenterology*. 1986;91:277–286.
31. Hoshi K, Amizuka N, Oda K, et al. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol*. 1997;107:183–191.
32. Eliakim R, Goetz GS, Rubio S, et al. Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *Am J Physiol*. 1997;272:G425–G434.
33. Shao JS, Engle M, Xie Q, et al. Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach. *Microsc Res Tech*. 2000;51:121–128.
34. Eliakim R, Karmeli F, Cohen P, et al. Sulphydryl blocker-induced rat colitis is ameliorated by intravenous injection of antibody to colonic surfactant-like particle. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5:16–23.
35. Galvez J, Sanchez de Medina F, Jimenez J, et al. Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. *Planta Med*. 1995;61:302–306.
36. Galvez J, Cruz T, Crespo E, et al. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med*. 1997;63:409–414.
37. Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, et al. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278:771–779.
38. Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:2317–2326.
39. Lawson GM, Katzmann JA, Kimlinger TK, et al. Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzyme on human alkaline phosphatase. *Clin Chem*. 1985;31:381–385.
40. Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem*. 1946;164:321–329.
41. Maroux S, Louvard D, Baratti J. The aminopeptidase from hog intestinal brush-border. *Biochim Biophys Acta*. 1977;321:282–295.
42. Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem*. 1968;22:99–107.
43. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981;77:373–382.
44. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76–85.
45. Musch MW, Sugi K, Straus D, et al. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*. 1999;117:115–122.
46. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76–85.
47. Yeh K, Yeh M, Holt PR, et al. Development and hormonal modulation of postnatal expression of the intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes. *Biochem J*. 1994;301:893–899.
48. Cohen-Tanugi A, Bolle M, Boy-Lefevre ML, et al. Phenotypic characterization of the 3/A/1D-1M osteogenic cell line derived from in vivo transplantation of 3/A/1D-1 chondroprogenitor murine teratocarcinoma cells. *Differentiation*. 1996;60:327–337.
49. Nosjean O, Koyama I, Goseki M, et al. Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochem J*. 1997;321:297–303.
50. Renes IB, Verburg M, van Nispen DJPM, et al. Distinct epithelial responses in experimental colitis: implications for ion uptake and mucosal protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283:G169–G179.
51. Galvez J, Cruz T, Crespo E, et al. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Med*. 1997;63:409–414.
52. Gonzalez R, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, et al. Anti-inflammatory effect of diosmetite in hapten-induced colitis in the rat. *Br J Pharmacol*. 2004;141:951–960.
53. Eliakim R, Goetz GS, Rubio S, et al. Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *Am J Physiol*. 1997;272:G425–G434.
54. Sorimachi K, Yasumura Y. Regulation of alkaline phosphatase activity in rat hepatoma cells. Effects of serum proteins, cycloheximide, actinomycin D, chloroquine, dinitrophenol and potassium cyanide. *Biochim Biophys Acta*. 1986;885:272–281.
55. Lawson GM, Katzmann JA, Kimlinger TK, et al. Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzyme oh human alkaline phosphatase. *Clin Chem*. 1985;31:381–385.

56. Studer M, Terao M, Gianni M, et al. Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179:1352–1360.
57. Brown NA, Stofko RE, Uhler MD. Induction of alkaline phosphatase in mouse L cells by overexpression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1990;265:13181–13189.
58. Toh Y, Yamamoto M, Endo H, et al. Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene. A single gene with two promoters. *Eur J Biochem*. 1989;182:231–237.
59. Martinez-Augustin O, Merlos M, Zarzuelo A, et al. Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colonic inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis. *BMC Genomics*. 2008;9:490.
60. Fukushima K, Sasaki I, Takahashi K, et al. Lipopolysaccharide exhibits synergistic enhancement of butyrate-induced and retinoic acid-mediated alkaline phosphatase activity on small intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Digestion*. 1998;59:683–688.
61. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta*. 2005;354:101–109.
62. Fukushima K, Sasaki I, Hasegawa H, et al. Sodium butyrate-induced liver-type alkaline phosphatase activity in a small intestinal epithelial cell line, IEC6. *Dig Dis Sci*. 1998;43:1116–1123.



Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats

P. Martínez-Moya^b, M. Ortega-González^b, R. González^a, A. Anzola^a, B. Ocón^a, C. Hernández-Chirlaque^b, R. López-Posadas^a, M.D. Suárez^b, A. Zarzuelo^a, O. Martínez-Augustin^b, F. Sánchez de Medina^{a,*}

^a Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2012

Received in revised form 26 April 2012

Accepted 27 April 2012

Keywords:

Alkaline phosphatase

Bacterial translocation

Inflammatory bowel disease

ABSTRACT

Alkaline phosphatase (AP) inactivates bacterial lipopolysaccharide and may therefore be protective. The small intestine and colon express intestinal (IAP) and tissue nonspecific enzyme (TNAP), respectively. The aim of this study was to assess the therapeutic potential of exogenous AP and its complementarity with endogenous enzyme protection in the intestine, as evidenced recently. IAP was given to rats by the oral or intrarectal route (700 U/kg day). Oral budesonide (1 mg/kg day) was used as a reference treatment. Treatment with intrarectal AP resulted in a 54.5% and 38.0% lower colonic weight and damage score, respectively, and an almost complete normalization of the expression of S100A8, LCN2 and IL-1 β ($p < 0.05$). Oral AP was less efficacious, while budesonide had a more pronounced effect on most parameters. Both oral and intrarectal AP counteracted bacterial translocation effectively (78 and 100%, respectively, $p < 0.05$ for the latter), while budesonide failed to exert a positive effect. AP activity was increased in the feces of TNBS colitic animals, associated with augmented sensitivity to the inhibitor levamisole, suggesting enhanced luminal release of this enzyme. This was also observed in the mouse lymphocyte transfer model of chronic colitis. In a separate time course study, TNAP was shown to increase 2–3 days after colitis induction, while dextran sulfate sodium was a much weaker inducer of this isoform. We conclude that exogenous AP exerts beneficial effects on experimental colitis, which includes protection against bacterial translocation. AP of the tissue-nonspecific isoform is shed in higher amounts to the intestinal lumen in experimental colitis, possibly aiding in intestinal protection.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), composed of ulcerative colitis and Crohn's disease, is a chronic and relapsing condition of the intestine that has a relatively high (and increasing) prevalence in developed countries. IBD is essentially incurable, except for ulcerative colitis patients undergoing total colectomy, since this disease is strictly organ-specific. However, IBD can be successfully managed in most cases, the emphasis being on drug therapy. The downside is that the drugs used in IBD pharmacotherapy (aminosalicylates, corticoids, anti-TNF biologicals and immunosuppressors) have important and prominent side effects,

on one hand, and that there are refractory cases, on the other. Therefore there is room for improvement in this field [1].

The drugs mentioned above are certainly not specific for IBD, and they treat gut inflammation as such. This approach probably limits their usefulness, but it is unavoidable since the exact cause of IBD is not currently known. The current view is that the IBD patients develop a T-lymphocyte driven, sustained inflammatory response elicited by luminal antigens, due to a combination of genetic and environmental factors [2].

Whatever the cause, intestinal inflammation has been shown previously to be associated with a marked increase in AP activity in animal models [3,4] and also in humans [5,6]. This increase appears to arise in part from the influx of neutrophils bearing AP [7] and in part from a change in AP expression at the epithelial level [8]. In fact, IEC18 cells and other cell lines of intestinal epithelial phenotype express higher amounts of AP under oxidative stress. This increase is coupled to a change in AP isoform. At least 4 AP isoforms have been described in humans: the tissue nonspecific or

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, School of Pharmacy University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 241747; fax: +34 958 248964.

E-mail address: fsanchez@ugr.es (F. Sánchez de Medina).

bone/liver/kidney (TNAP), plus the intestinal (IAP), the placental, and the germ cell (or placental-like) isoforms, which are expressed predominantly in these tissues and thus are 'tissue specific' [9–11]. It should be noted that the rat equivalents of the placental and germ cell isoforms have not been detected to date. The change of isoform detected in intestinal epithelial cells (IEC) is believed to be from liver TNAP in basal conditions to kidney or bone TNAP under oxidative stress or inflammation [8]. IAP is the isoform expressed by the small intestine, although TNAP is transiently expressed in the fetal stage [12,13]. TNAP is expressed by the large bowel [14]. This isoform seems to be important in the maintenance and/or function of some intestinal structures [15].

Apart from the above, AP has had no known function in the intestine until recently, although it has been traditionally assigned a diffuse role in the intestinal transport of lipids and nucleotides [16,17]. In fact, IAP knockout mice exhibit increased fat absorption [18] but no other major alteration. Conversely, TNAP deletion leads to early postnatal death, although for reasons unrelated to the gut. After LPS was identified as a substrate for AP [19,20], IAP knockout mice were shown to have increased bacterial translocation subsequent to ischemia–reperfusion episodes [21]. A protective role has been also suggested by the deleterious effect of the AP inhibitor levamisole in rats infected intraperitoneally with *E. coli* [20]. More recently, oral administration of IAP ameliorated experimental colitis in rats [22]. The present study was carried out with the aim of testing the therapeutic potential of exogenous AP in experimental colitis, and therefore shares some features with the latter. Our study conveys further evidence that AP is protective in intestinal inflammation, and it additionally shows: (1) the fact that intrarectal administration has added benefit over the oral route; (2) the realization that bacterial translocation is prevented by exogenous AP; and (3) the finding that fecal matter from colitic animals is enriched in tissue nonspecific AP, while IAP levels remain fairly constant.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Except where indicated, all reagents were obtained from Sigma (Madrid, Spain). The polyclonal antibody against murine intestinal AP was the generous gift of Dr. Tsukamoto of the Aichi Cancer Center Research Institute. The B4-78 antibody against human tissue nonspecific AP developed by Dr Katzmann [23] was obtained from the Development Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. The antibody against bacterial glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was obtained from Epitope Biotech Inc. (Burnaby, Canada). All other antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) and Sigma. Bovine intestinal AP was supplied by MP Biomedicals (Solon, OH). Budesonide was purchased from Molekula Ltd. (Gillingham, UK).

2.2. Animals

Female Wistar rats (175–225 g), C57BL/6J and SCID mice (on a C57BL/6J background), supplied by Harlan and Charles River (Barcelona, Spain), were housed in makrolon cages and maintained in air conditioned animal quarters with a 12 h light–dark cycle and free access to autoclaved tap water and a standard chow diet (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain). SCID mice were protected with Mini-Isolator™ filters (Tecniplast, Buguggiate, Italy). This study was carried out in accordance with the Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific

Purposes of the European Union (86/609/EEC) and was approved by the Ethical Committee of the University of Granada.

2.3. Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) model of rat colitis

Colitis was induced as described previously [24]. Briefly, rats were fasted overnight and anesthetized with halothane. Under these conditions, rats were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. Rats were kept in a head-down position for an additional 30 s and returned to their cage.

2.4. Dextran sulfate sodium (DSS) model of rat colitis

Rat colitis was induced by addition of DSS 5% (v/v), obtained from ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA), to drinking water for 7 days. The status of the animals was monitored by general examination and specifically by means of the disease activity index (DAI), a combined score for general appearance, weight loss, diarrhea and hematochezia (Table 1), which are 4 main signs of pathology in this model [25].

2.5. Lymphocyte transfer colitis

Chronic colitis was induced by the transfer of a naïve lymphocyte population from female wild type C57BL/6J donor mice to immunodeficient (SCID) female mice on the same genetic background. Mononuclear cells were obtained from the spleen of donor mice by mechanical dissection and magnetic sorting using a protocol with magnetic microbeads (CD4+ CD62L+ T cell isolation kit for mouse, Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany). Once purified, cells were resuspended in PBS, which was used as vehicle for intraperitoneal injection into immunodeficient recipient mice. Control animals were injected with PBS alone, while colitic animals were injected with 100 μ l of PBS containing 10⁶ CD4+CD62L+ cells per mouse. An additional control group received unfractionated splenocytes. Body weight and wasting disease (general status and diarrhea) were checked weekly and animals were sacrificed by cervical dislocation 16 weeks after cell transfer, when there were signs of significant disease.

2.6. Experimental design

2.6.1. Effect of exogenous AP on TNBS colitis

Rats were randomly assigned to one of 5 different groups, namely control (C, $n=4$), TNBS ($n=6$), AP-or ($n=5$), AP-ir ($n=5$) and budesonide ($n=5$). All groups received the TNBS challenge, except the control, which was administered a saline enema. In addition, rats from the AP-or and AP-ir groups were administered 700 U/kg day of bovine intestinal AP by the oral or intrarectal route, respectively. AP was delivered in 1% methylcellulose with 0.2 mM MgCl₂. The budesonide group received 1 mg/kg day of the corticoid by the oral route in 1% methylcellulose. Oral treatments were delivered by means of a gastroesophageal catheter in conscious rats, while intrarectal administration required brief halothane anesthesia. Half of the rats in the TNBS group received the vehicle orally and the other half intrarectally, in order to serve as separate disease control if necessary. The results were statistically comparable and therefore TNBS is presented as a single group. Oral treatments started 1 h before colitis induction, while intrarectal AP was first administered 3 h after. This protocol ensures that therapy is given as a posttreatment (considering intestinal transit time). Afterward treatments were given daily until animals were sacrificed (cervical dislocation) at day 6. Food and water intake and body weight were determined daily.

Table 1
DAI score in the rat DSS colitis model.

Animal	Score	Feces	Score	Bleeding	Score	Body weight loss (%)	Score
Normal	0	Normal	0	No bleeding	0	No	0
Somewhat lethargic and/or some hair loss	1	Loose stools	1	Black feces in cage or blood spots	1	1–5%	1
Clearly lethargic, huddling behavior	2	Soft stools	2	Rear end visible bleeding	2	5–10%	2
Lethargic, marked hair loss	3	Diarrhea	3	Frank bleeding	3	10–15%	3
Extremely lethargic	4					>15%	4

The DAI is calculated as the sum of the 4 parts.

2.6.2. Longitudinal variation of AP expression in TNBS and DSS colitis

Colitis was induced by TNBS or DSS in rats ($n = 3–4$) as described, without any further treatment, and sacrificed after 7 days. A control, noncolitic group was included for reference. These experiments were performed in order to obtain a longitudinal assessment of fecal AP levels (see below). General colonic inflammatory status was assessed in order to confirm colitis induction.

2.6.3. Fecal AP expression in mice lymphocyte transfer colitis

Colitis was induced in SCID mice as described above without any additional treatment. This experiment was carried out to confirm that TNAP fecal levels are increased also in a colitis model not induced by methods that include epithelial damage. General colonic inflammatory status was assessed in order to confirm colitis induction.

2.7. Assessment of colonic damage

In the intervention experiment described in Section 2.6.1. animal status was evaluated as follows. A fecal sample was obtained immediately after euthanasia and snap frozen in liquid nitrogen. Under aseptic conditions a piece of liver was sampled and the entire colon was removed and placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper. Each specimen was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The large intestine was longitudinally opened and scored for visible damage on a 0–25 scale as previously described, and additionally documented with a digital camera [26]. The score was assigned as follows: adhesions (0–3), obstruction (0–2), hyperemia (0–3), fibrosis (rigidity and deformation, 0–5), necrosis (0–5), other features (proximal dilatation, fragility, scarring, 0–4). Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, MD) was used to quantify the percentage of colonic area affected by inflammation/necrosis. A sample for RNA isolation was obtained from the distal colon, taking care to avoid any areas of necrosis. The colon was subsequently divided longitudinally into several pieces for biochemical determinations. The fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used.

AP activity was measured spectrophotometrically, using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mM) as substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mM MgCl_2 (pH = 10.5) [27]. The sensitivity to the AP inhibitor levamisole was assessed routinely and expressed as % inhibition of control enzyme activity. Protein was measured by the BCA assay [28]. In some experiments colonic myeloperoxidase (MPO) activity was measured spectrophotometrically as described [3]. Briefly, samples were homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in PBS (pH = 6.0), subjected to 3 freeze-thaw cycles and one step of ultrasonic homogenization, and cleared by centrifugation. Peroxidase activity was measured in the supernatant using *o*-dianisidine dihydrochloride (533 μM) as chromogen. The results are expressed as MPO units ($\mu\text{mol min}^{-1}$) per gram of wet tissue.

In the longitudinal studies colonic status was assessed by general parameters, colonic MPO and AP activities, and in the case of

DSS colitis additionally by the DAI. In the mice lymphocyte transfer colitis model the parameters used were colonic MPO and AP activities and intestinal iNOS expression.

2.8. Analysis of gene expression by reverse transcriptase-PCR analysis

Total RNA was obtained by the Trizol method (Invitrogen, Barcelona, Spain) and 1 μg retrotranscribed (iScript, BioRad, Alcobendas, Spain) and specific RNA sequences amplified with a Stratagene MX3005P real time PCR device using the following primers: AAT GAC CTG TTC TTT GAG GCT G/CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT (IL-1 β), TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG/CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA (tumor necrosis factor, TNF), CTG CTT GGC AGT GCT TGA GAA/CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT (Foxp3), AGT CAG CCA GAC CCA CAT G/TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT (IL-10), TGG ACT CTG AGC CGC AAT GAG G/GAC GCA TGG CGG ACA ACA GAG G (IL-17), GCA CAC TAG CCT GGA GTG CA/AGA TGT CCG AGT CCA GCA GG (IL-23 p19), GCT CTG GTC TTC TGG AGT TCC G/TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC (IL-6), ACT GGC GAG CCT TAG TTT G/CGT GGC TTC TAG TGC TGA CG (TGF- β), and CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G/CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC (18S). The cycle threshold values were normalized to that of the reference transcript, 18S RNA, and a fold change compared to the control group was calculated.

2.9. Western blot

The colonic and/or fecal levels of cyclooxygenase 2 (COX-2), iNOS, TNAP and IAP were determined by immunoblotting. Colonic samples were homogenized in lysis buffer (0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Triton X-100 in PBS) with protease and phosphatase inhibitors (1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 18 mg l $^{-1}$ aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate). The supernatants obtained after centrifugation (7000 \times g, 10 min at 4°C) were boiled for 4 min in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE (10%), electroblotted to PVDF membranes, and probed with the corresponding antibodies overnight at 4°C . The bands were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer) and quantified with NIH software (Scion Image). After the transference of the samples to PVDF membranes, equal loading was checked routinely by reversible Ponceau staining, and in the case of tissue samples actin was additionally used as control, while bacterial GAPDH was used in the fecal samples. The composition of the Laemmli buffer (5 \times) was: 312 mM SDS, 50% (v/v) glycerol, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, 22.5 mM EDTA trisodium salt, 220 mM Tris, and traces of bromophenol blue (pH = 6.8).

2.10. Analysis of AP in feces

Fecal samples were processed for Western blot analysis, and also for AP measurement, as above. In some cases animals were placed alone in a cage and the daily fecal output processed every day until sacrificed. An approximate 1:10 weight to volume ratio was used in both cases. Fecal extracts were probed with IAP and TNAP (B4-78) antibodies. Ponceau red reversible staining of membranes

was used to ensure equal loading [29], since the samples contained majoritarily bacterial proteins, and GAPDH was measured in the blots a posteriori.

2.11. Bacterial translocation

Liver samples were processed to obtain rat and bacterial DNA with the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Madrid, Spain). DNA was quantitated with a Nanodrop (Fisher Scientific, Madrid, Spain) and subjected to qPCR with a Stratagene MX3005P real time PCR device using the following primers: AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG/ACC GCG ACT GCT GCT GGC AC. The 16S primers are not genus or species specific and therefore amplify ribosomal 16S encoding DNA of all bacteria. This technique has been previously validated [30].

2.12. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences among means were tested for statistical significance by one way analysis of variance and a posteriori least significance tests on preselected pairs. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of exogenous AP treatment on TNBS colitis

TNBS treated rats developed an intense colonic inflammatory response, characterized by severe anorexia and polydipsia and loss of body weight (Table 2). The large intestine of animals in the TNBS group exhibited an increase in weight and a reduction in length, resulting in marked tissue thickening (Table 2). Epithelial necrosis was apparent 6 days after colitis induction, affecting more than a third of the total area, and there were also signs of moderate obstruction and fibrosis, giving rise to a substantial increase in the colonic damage score (Table 2). Biochemical analysis additionally showed augmented expression of iNOS, COX2 (Fig. 1), IL-1 β , S100A8 and lipocalin 2 (LCN2, neutrophil markers) (Fig. 2). Foxp3, TGF- β , IL-4, TNF and IFN- γ were not significantly affected (not shown). Of note, the mRNA levels of TNAP were increased by colitis (Fig. 2D).

Treatment of colitic rats with exogenous AP resulted in significant therapeutic benefit, which as a rule was more pronounced in the animals receiving intrarectal therapy. Thus the AP-ir group presented a reduction in colonic weight to length ratio (due to an effect on weight alone, since intestinal length was actually shortened) and overall damage score compared to the TNBS group (Table 2). The decrease in score was due to a lower degree of obstruction and deformation (not shown). Necrosis extension and area affected were not significantly reduced by AP. The expression of S100A8 mRNA, a marker of neutrophil infiltration, was almost normalized. Similarly, there was a marked reduction of IL-1 β and LCN2 (another neutrophil marker) colonic expression in this group (Fig. 2). On the other hand, there was no effect on either iNOS or COX2 (Fig. 1). TNAP expression was normalized by exogenous intrarectal AP treatment (Fig. 2D).

Compared with the AP-ir group, orally administered AP failed to reach some of the positive endpoints. In particular, this group presented no significant change in the colonic weight or length or in body weight gain, and the effect on colonic damage score and TNAP expression (Table 2 and Fig. 2D) was less marked than in the AP-ir group. However, the impact on colonic IL-1 β , LCN2 and S100A8 was similar.

Budesonide was used as a reference therapeutic drug. This was the only treatment that managed to decrease necrotic lesions, and it had a more pronounced effect also on bowel wall thickening

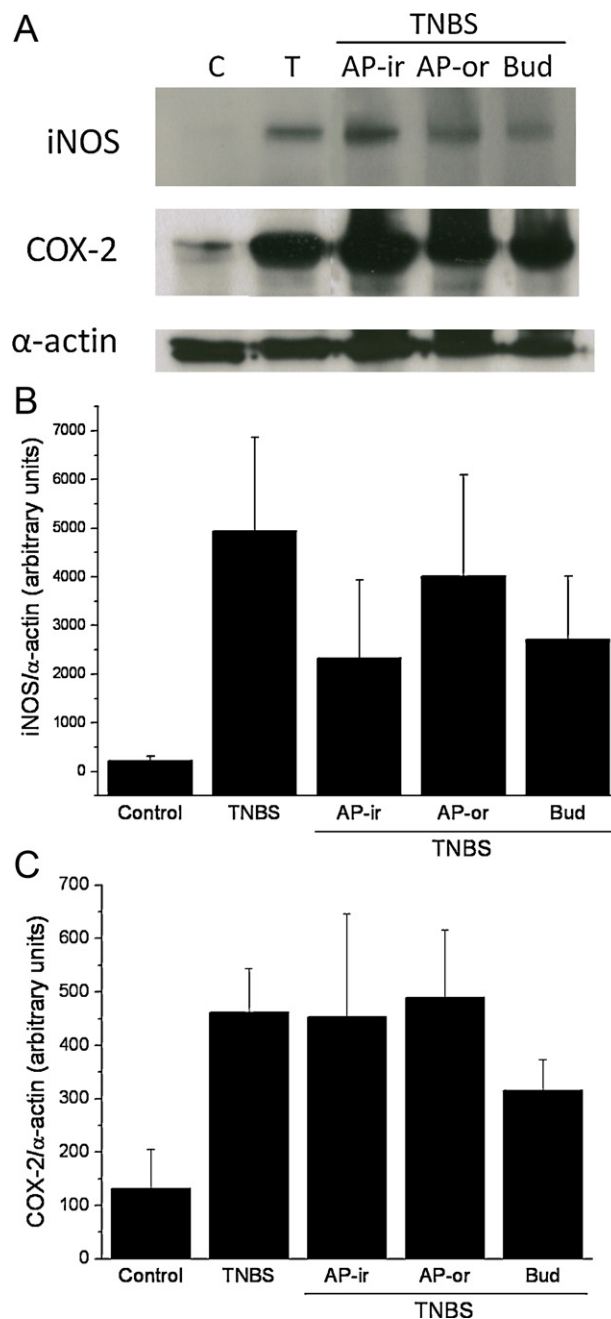


Fig. 1. Colonic expression of iNOS and COX-2. Protein expression level of iNOS and COX-2 was assessed by Western blot and quantified by Image-J software. (A) Representative blots. (B and C) Densitometric analysis of iNOS and COX-2 expression, respectively. TNBS colitis was associated with a marked upregulation of both proteins, but with no significant effect of treatments ($n = 4-6$).

and damage score, the latter owing not only to a lower degree of obstruction and deformation, but also of adhesions and necrosis. Budesonide had no effect on food intake or body weight gain. In other respects the corticoid was comparable to AP.

3.2. Effect of exogenous AP treatment on bacterial translocation

Bacterial translocation was assessed in this study by way of qPCR analysis of an invariant region of the 16S ribosome in the rat liver. The results, shown in Fig. 3, show a significant enrichment of 16S DNA in the hepatic samples of the TNBS group of about 3-fold. Interestingly, exogenous AP reduced this parameter to basal levels

Table 2
Macroscopic parameters in TNBS colitis.

	Control	TNBS	AP-ir	AP-or	Budesonide
Body weight gain (%)	9.2 ± 0.3	-8.1 ± 3.2*	-7.5 ± 2.4*	-5.3 ± 2.4*	-5.5 ± 1.2*
Food intake (g/rat day)	19.1 ± 1.1	4.3 ± 0.8*	5.8 ± 1.2*	5.2 ± 1.1*	8.3 ± 1.6*
Colon length (cm)	16.7 ± 0.7	14.6 ± 0.5*	13.3 ± 0.4* [†]	15.7 ± 0.5	15.3 ± 0.3
Weight/length (mg/cm)	74.4 ± 9.7	221.5 ± 19.0*	160.8 ± 24.7* [†]	195.9 ± 32.2*	109.0 ± 9.9*
Colonic damage extension (cm)	0 ± 0	3.5 ± 0.4*	3.1 ± 0.4*	3.1 ± 1.0*	2.2 ± 0.7*
Necrosis area (%)	0 ± 0	40.2 ± 5.5*	32.7 ± 8.6*	26.8 ± 7.2*	16.6 ± 6.6*
Score	0 ± 0	13.0 ± 0.8*	8.1 ± 1.4* [†]	9.3 ± 1.1* [†]	5.4 ± 1.4* [†]

Data are mean ± SEM (n = 4–6). Food and water intake are group data.

[†] p < 0.05 vs. control.

* p < 0.05 vs. TNBS.

(p < 0.05 for AP-ir only). Budesonide, on the other hand, failed completely to affect bacterial translocation.

3.3. Role of AP in the TNBS inflamed rat colon

Colonic AP activity was increased 4.5-fold in the rats in which colitis was induced by TNBS administration (Fig. 4A). This rise in activity was associated with an augmented sensitivity to inhibition by levamisole (Fig. 4B). Because AP isoforms differ in their sensitivity toward this compound, it can be used to aid in identification purposes. AP treatment had no effect on colonic AP activity or sensitivity to levamisole, regardless of route of administration. Conversely, budesonide had a marked reducing effect on AP activity.

We also looked at fecal AP activity. As shown in Fig. 5A, AP activity measured in fecal samples taken at the end of the treatment period was augmented over 4-fold in the TNBS group compared with the control (p < 0.05). Furthermore, the sensitivity to levamisole was also enhanced in feces, similar to the results obtained

in colonic tissue (Fig. 5B). Budesonide but not AP treatment normalized fecal AP levels (Fig. 5A).

3.4. Time course changes in fecal AP in control, TNBS and DSS rat colitis

In view of the above observations we carried out additional experiments in which rats were housed individually and their daily fecal output examined for AP activity and immunoreactivity. This approach was followed because of substantial rat to rat variability in this parameter. Colitis was induced with TNBS/ethanol as in the previous experiment or with 5% DSS in drinking water. TNBS colitis was quantitatively similar to that previously induced (not shown), while DSS colitis was characterized by increased DAI (Fig. 6A), colonic MPO activity (Fig. 6B), and augmented colonic AP activity (Fig. 6C). The latter was not associated to increased sensitivity to levamisole (Fig. 6D).

As expected, fecal AP activity remained low, although variable, in the noncolitic control rats throughout the week (Fig. 7A), and the corresponding inhibition by levamisole was also modest

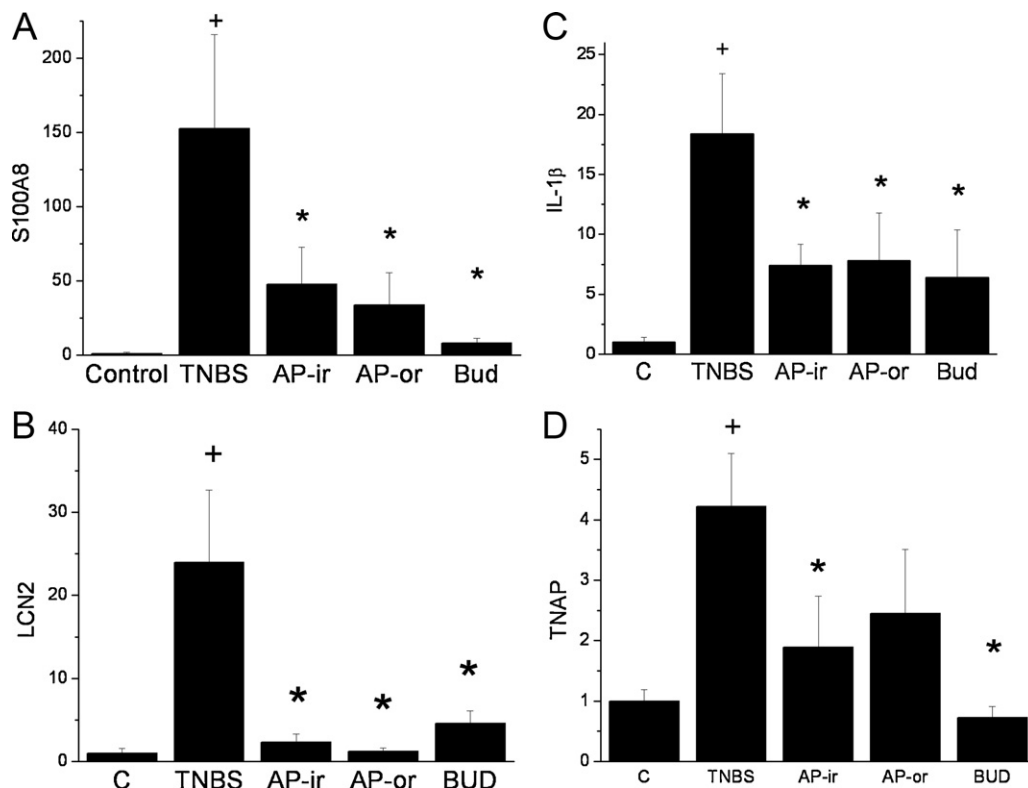


Fig. 2. Colonic inflammatory markers determined by qRT-PCR (expressed as fold change based on $2^{-\Delta\Delta Ct}$ using 18S as reference gene). The neutrophil markers calgranulin A (S100A8, A) and lipocalin 2 (LCN2, B), IL-1 β (C) and the tissue nonspecific AP (TNAP, D) were measured. * p < 0.05 vs. control group, * p < 0.05 vs. TNBS group (n = 4–6).

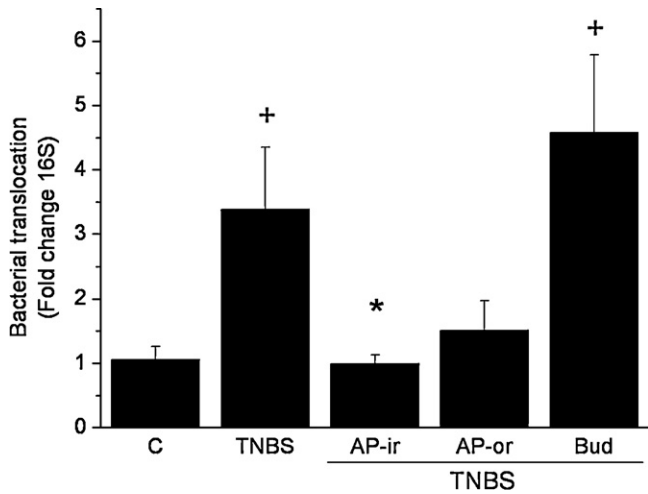


Fig. 3. Bacterial translocation. An invariant region of bacterial 16S was measured in the rat liver by qPCR as an index of translocation. Both AP treated groups had normal values, while budesonide was comparable to the TNBS group. * $p < 0.05$ vs. control group, * $p < 0.05$ vs. TNBS group ($n = 4-6$).

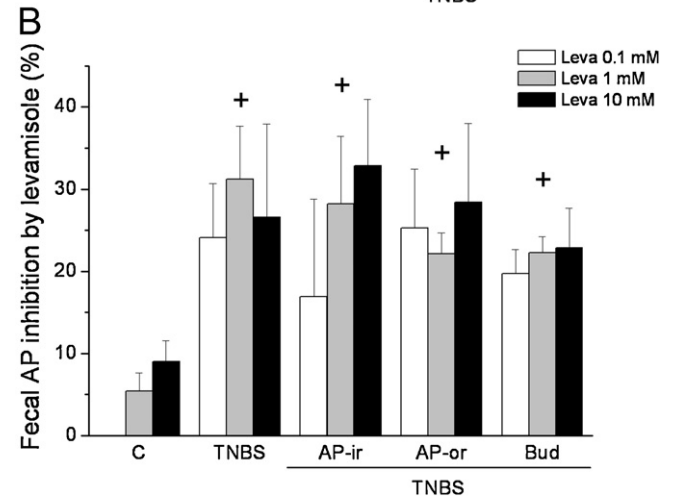
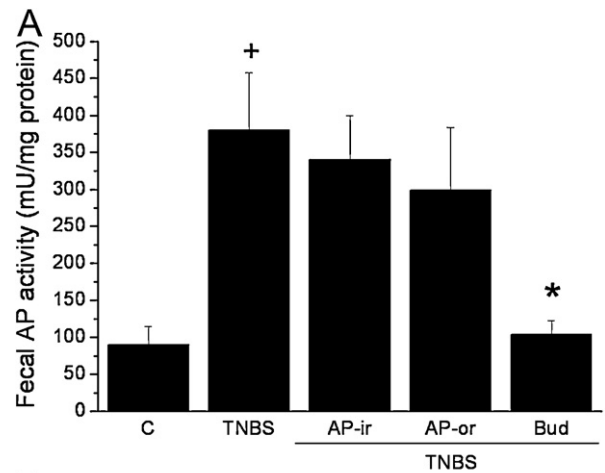


Fig. 5. Fecal AP activity. AP enzymatic activity in the feces (A) and its sensitivity to the inhibitor levamisole (B) are shown. Fecal material was retrieved just prior to animal sacrifice. * $p < 0.05$ vs. control group; * $p < 0.05$ vs. TNBS group ($n = 4-6$).

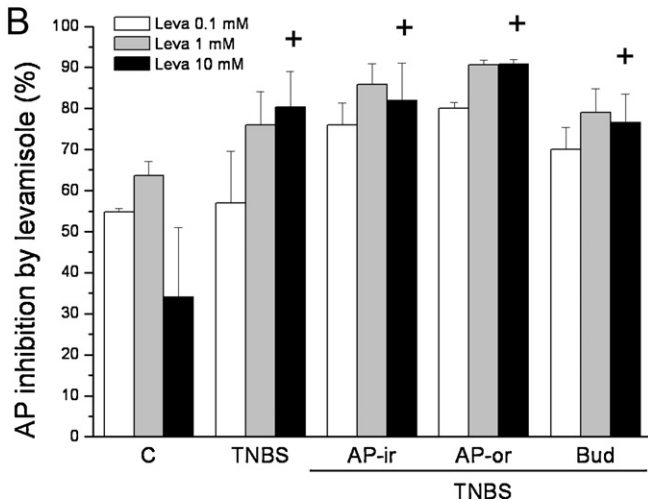
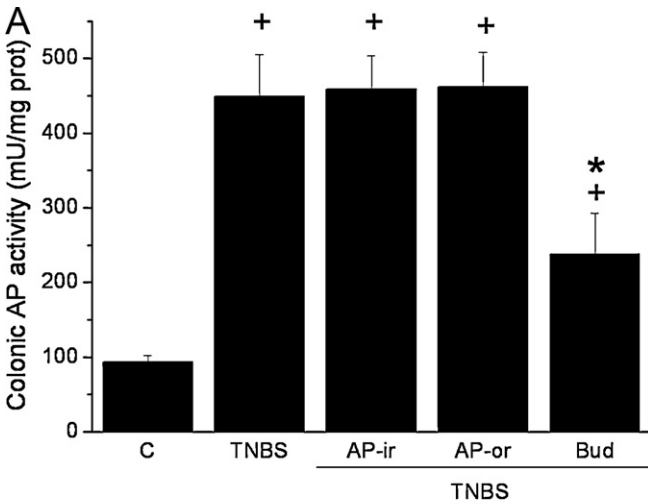


Fig. 4. Colonic AP activity. AP enzymatic activity in the colonic tissue (A) and its sensitivity to the inhibitor levamisole (B) are shown. * $p < 0.05$ vs. control group, * $p < 0.05$ vs. TNBS group ($n = 4-6$).

(Fig. 7B). In contrast, rats with TNBS/ethanol colitis exhibited an increase in activity which started 2–3 days after colitis induction and stayed at high levels until sacrifice. This was associated with a higher inhibition by levamisole, although with substantial variability. Finally, DSS colitis also showed a high AP activity but no major changes in sensitivity. Panels C–E in Fig. 7 show representative blots of fecal homogenates. TNAP (B4-78 antibody) was not detected at all in control rats (Fig. 7C), consistent with previous observations, while it had a strong signal every day after TNBS (Fig. 7D), but not DSS administration (Fig. 7E). IAP immunoreactivity was detected as a band of the expected molecular size in the positive control (jejunum), and as a higher mobility band in fecal samples (Fig. 7C–E). This band was of variable day to day and rat to rat size and typically had a spread appearance, suggesting a range of molecular weights. The strength of this signal did not vary much in control and TNBS rats but it tended to increase with time in DSS colitic rats.

3.5. Changes in fecal AP in the lymphocyte transfer model of colitis

TNBS (and DSS) elicits protracted colitis partly by erosion of the epithelial layer, and thus might cause epithelial AP leakage into the lumen in an artifactual manner. Thus we applied Western blot analysis as above using a chronic, nontoxic model of colitis, namely lymphocyte transfer colitis. SCID mice in this experiment received either a selected population of naïve lymphocytes or unfractionated

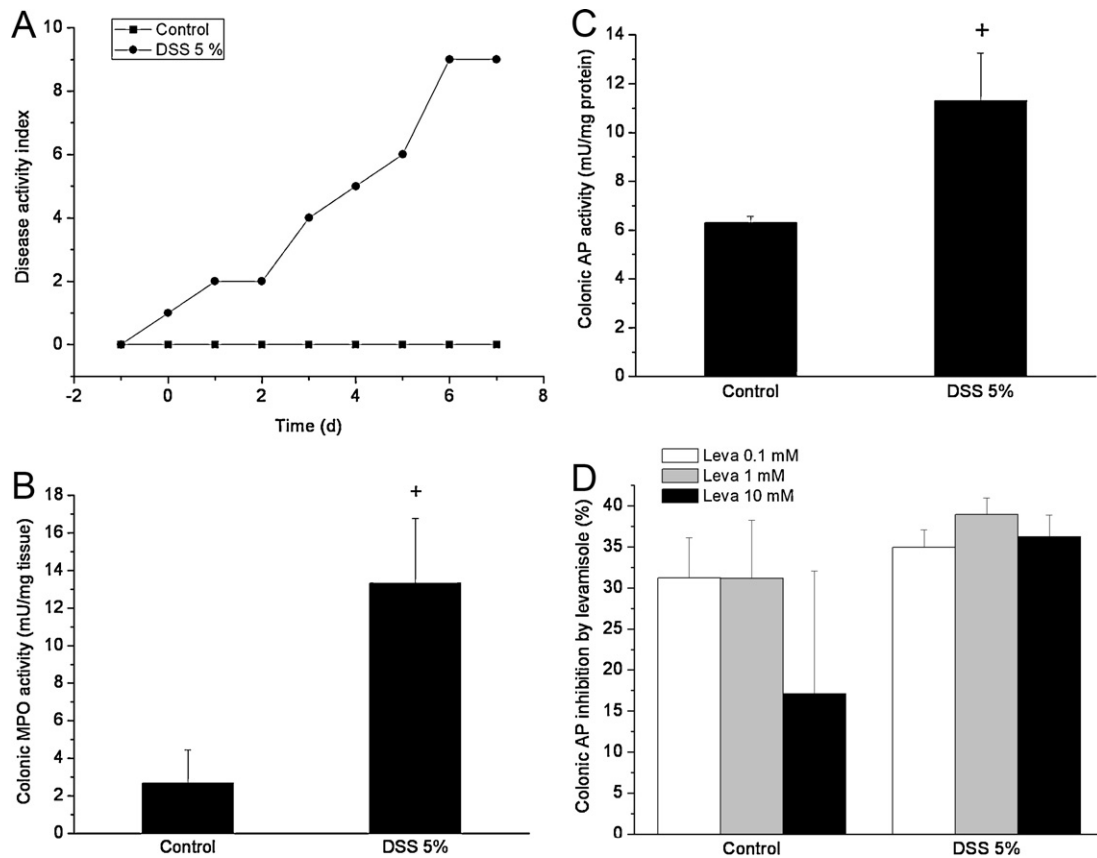


Fig. 6. Inflammatory markers in rat DSS colitis. Rats were treated with 5% DSS in drinking water, resulting in colitis that was evidenced by increased DAI (A), colonic MPO activity (B), and colonic AP activity (C). The sensitivity of colonic AP activity to levamisole (D) was unchanged. * $p < 0.05$ vs. control group; * $p < 0.05$ vs. TNBS group ($n = 3$).

splenoocytes or saline (controls). Two out of 6 mice developed colitis after 16 weeks in this experiment, with loss of body weight and fur and a general sick appearance, confirmed after sacrifice. These animals showed an increase in colonic MPO and AP activity, AP sensitivity to levamisole, iNOS and colonic weight (Fig. 8 and data not shown). Fig. 9 shows that colitic animals have marked levels of TNAP but not IAP in their feces, confirming that TNAP leakage is not specific of TNBS rat colitis.

4. Discussion

Our main objective when we started out this study was to examine the modulatory effect of exogenous AP in a preclinical model of IBD. A protective effect was anticipated based, on one hand, on the prevention of bacterial translocation after ischemia-reperfusion observed by Richard Hodin's group [21], and on the other hand, teleologically, by the increase in AP associated with intestinal inflammation observed by us [3] and others [4–6]. While the experiments were being carried out Tuin et al. published their interesting study [22] in which exogenous AP was indeed shown to exert intestinal antiinflammatory activity. Therefore it is useful to discuss our data in direct comparison with it.

Our data indicate that exogenous treatment with AP ameliorates TNBS elicited colonic inflammation, as evidenced by lower neutrophil infiltration (S100A8, LCN2), IL-1 β , colonic damage score and bowel wall thickening. In this regard it is worth noting that the therapeutic effect was exerted mainly by intrarectally administered AP. This is consistent with the fact that AP isoenzymes have been described to be labile in acid environments [22], although it should be remembered that oral treatment retained many of the effects.

Budesonide was used as a positive control for intestinal anti-inflammatory activity. At the dose used the corticoid was more effective than AP on some markers, whereas exogenous AP, but not budesonide, reduced bacterial translocation. AP may decrease bacterial translocation by inactivation of bacterial LPS, as shown previously in the context of ischemia-reperfusion [21]. Budesonide, in turn, downregulates innate immunity, which is increasingly considered essential in keeping intestinal microflora at bay, hence offsetting possibly part of its beneficial effect on the mucosa. Similarly, it has been shown that conditional downregulation of epithelial NF- κ B signaling leads to increased inflammation [31]. It is also possible that epithelial AP downregulation by the corticoid itself, as discussed above, is involved in offsetting mucosal defense in this regard.

One interesting observation is that AP treatment reduces colonic TNAP mRNA levels (Fig. 2D, $p < 0.05$ for AP-ir only), but it does not affect colonic or fecal AP activity (Figs. 4 and 5). This may be explained by cell type-specific effects. TNAP is expressed by enterocytes and infiltrating leukocytes, so that as neutrophil infiltration is reduced by treatment, it is logical that TNAP mRNA is also decreased. In enterocytes, TNAP activity is upregulated by cellular stress without affecting mRNA levels, i.e. it is a posttranscriptional effect [8]. Thus the fact that AP activity remains elevated despite lower TNAP mRNA levels suggests that epithelial TNAP enzyme is dominant (in both tissue and feces), and consequently that exogenous AP, unless budesonide, has no direct effect at this level.

In comparing our study with that of Tuin et al. [22] it is interesting to note that we achieved a comparable degree of efficacy, especially with the intrarectal route. The dose used by that group was 1250 glycine units per rat, i.e. approximately 9-fold higher than that used in the present study. Tuin et al. found reduced LPS

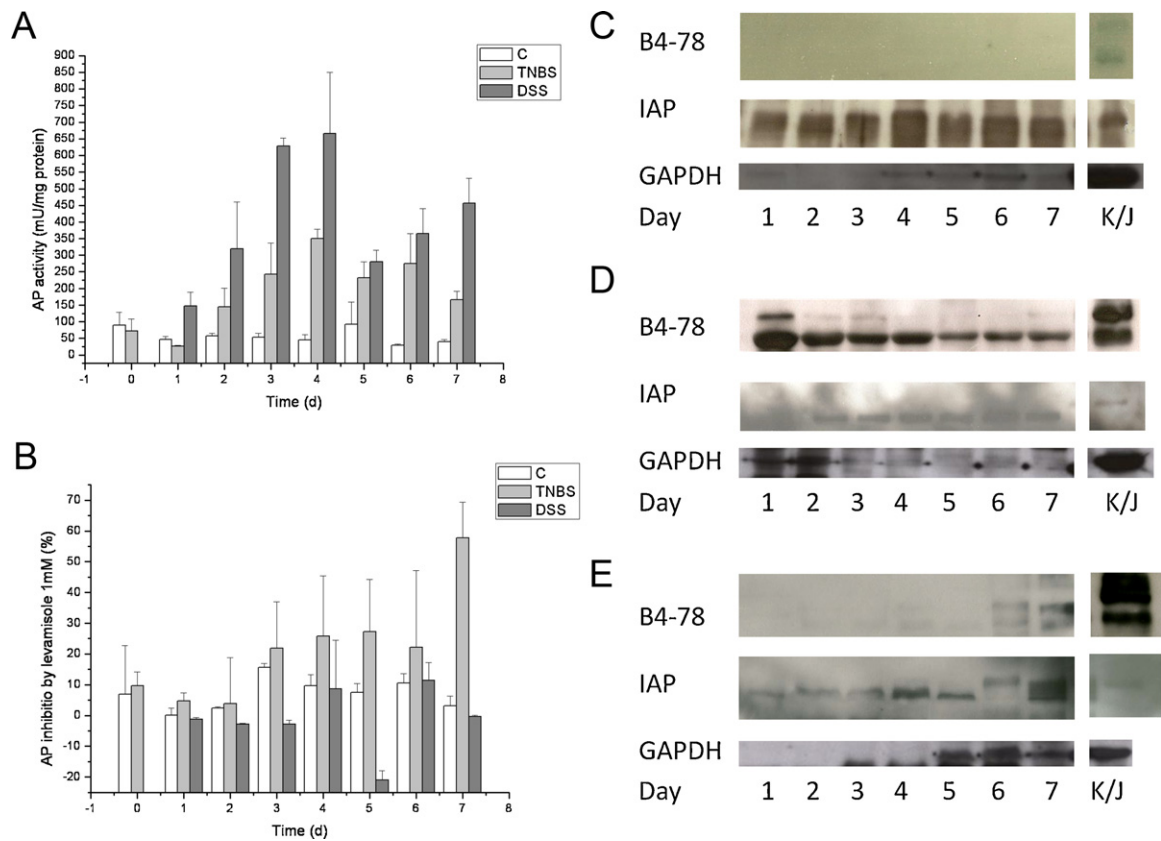


Fig. 7. Time course of fecal AP activity and immunoreactivity. Control, TNBS and DSS colitis rats were maintained in individual cages and their daily fecal output examined until sacrifice 7 days post-induction. AP activity (A) and sensitivity to 1 mM levamisole (B) was measured in each group ($n=3$) and presented as mean \pm SEM. Representative Western blots for TNAP and IAP are presented to the right for control (C), TNBS (D) and DSS colitis (E). Rat kidney (K) and jejunum (J) were used as positive controls for TNAP and IAP, respectively ($n=3$).

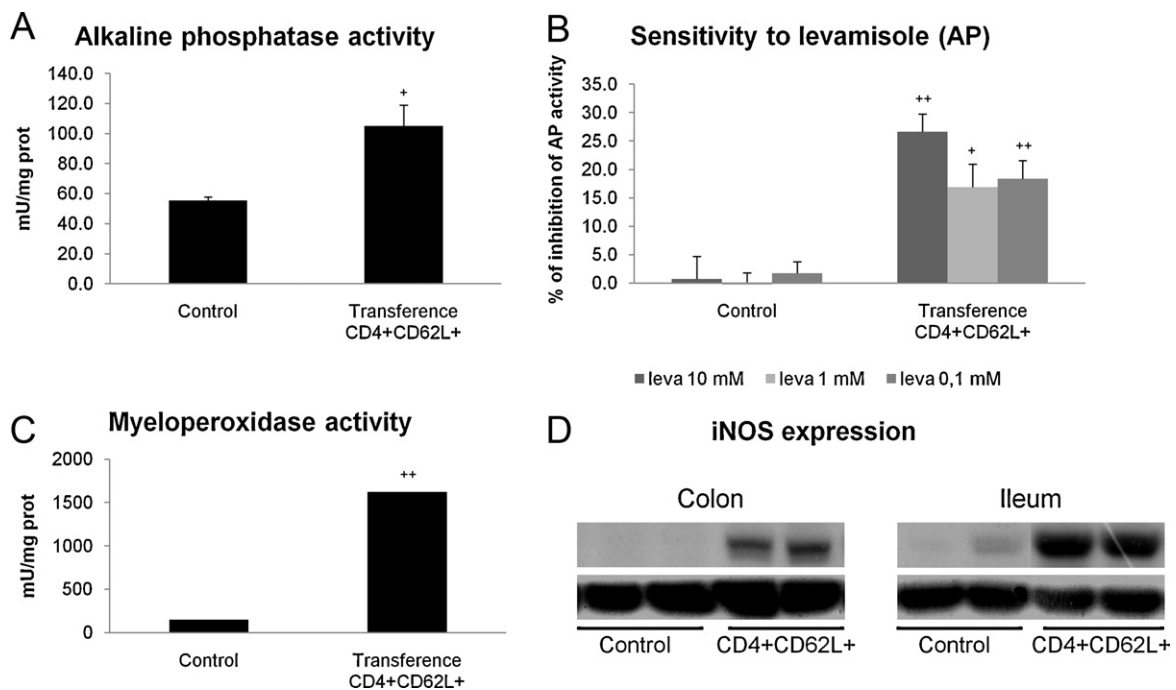


Fig. 8. Lymphocyte transfer colitis in mice. CD4+CD62L+ lymphocytes were obtained from the spleen of B6/CD17 mice by magnetic separation and injected intraperitoneally into SCID mice of the same background. (A) Colonic AP activity (mU/mg prot). (B) AP sensitivity to the inhibitor levamisole, expressed as % inhibition. (C) Colonic MPO activity (mU/mg prot). (D) Colonic expression of iNOS as determined by Western blot. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ vs. control ($n=2-4$).

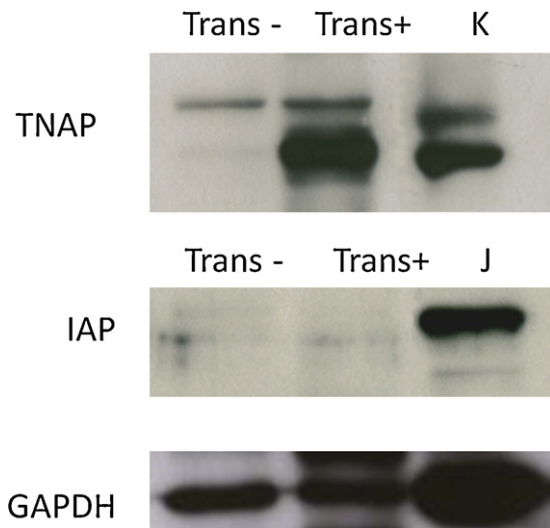


Fig. 9. Detection of the tissue nonspecific and intestinal isoforms of AP in the feces of lymphocyte transfer colitic mice. Fecal material was obtained just prior to animal sacrifice and processed for Western blot analysis. Control or mock transfer (Tr⁻) animals show little or no expression of either isoform. TNAP but not IAP is readily detected in lymphocyte transferred SCID mice (Tr⁺). Rat kidney (K) and jejunum (J) served as positive controls for TNAP and IAP, respectively ($n=2-4$).

inactivation and IAP expression in human IBD biopsies. We and others [3,4,32,33] have previously shown that AP activity is increased rather than decreased in experimental IBD models, and that IAP mRNA is not increased in this setting. Further, another group confirmed recently that AP activity is increased in IBD, using an enzyme assay on histology sections [6]. Thus while there is a consistent appreciation of the lack of involvement of IAP in colitis, the picture is not so clear with regard to actual AP activity [34]. The disagreement might also be related to technical issues.

Our data also indicate that AP specific activity is augmented in the feces of TNBS colitic rats, and that AP is of the levamisole sensitive type and with affinity for the B4-78 antibody. In short, fecal matter is enriched in bone/kidney TNAP under inflammatory conditions. This is probably the consequence of enzyme leakage from the colonic mucosa, which in turn may be of either epithelial or leukocyte (mostly neutrophil) origin. Although our data do not allow a direct identification of the cellular source, intestinal epithelial cells express increased AP levels under intense oxidative stress *in vitro*, as stated above, and they appear AP laden in experimental colitis [3,4]. Considering that epithelial integrity is essentially restored 2–4 days after colitis induction in the TNBS model [35,36], epithelial cells are a plausible source of fecal AP. In order to characterize this phenomenon further, we carried out a time course experiment and compared the changes observed in TNBS colitis with those in the DSS model, which is considered to be caused chiefly by an epithelial erosive action of dextran sulfate. Our data are generally consistent with the notion that TNAP is secreted, or leaked, to the colonic lumen as part of the inflammatory response, based on increased fecal AP activity, augmented sensitivity to levamisole, and TNAP specific immunoreactivity.

IAP in fecal samples exhibited a characteristic low (and variable) molecular weight band compared with the positive control, rat jejunum. It is likely that this band corresponds to membrane anchored enzyme detached by the action of phospholipases or to enzyme secreted as part of the so called surfactant like particles [35]. As IAP travels to the distal regions of the intestine, it is possibly degraded to variable degrees, consistent with the different molecular weights observed in our study. Since IAP is resistant to levamisole, the sensitivity of fecal AP activity to this inhibitor would depend on the balance of IAP (of small intestinal origin) and colonic

TNAP, accounting for the observed variability. Thus the fact that feces of DSS colitic animals have increased AP activity, low levamisole sensitivity and TNAP immunoreactivity, and are stable or increased fecal IAP levels, suggests that DSS increases IAP luminal leakage. Consistent with this hypothesis, DSS is a very weak TNAP inducer in epithelial cell lines *in vitro* (unpublished observations).

We performed an additional experiment to prove that this 'AP leakage' is not an artifact caused by direct epithelial injury using the lymphocyte transfer model of colitis in SCID mice. The results obtained are similar to those in rat TNBS colitis, even though there is no direct manipulation of the lumen that results in epithelial lesions directly.

Last, we had previously shown that the AP inhibitor levamisole and the B4-78 monoclonal antibody have a modest therapeutic effect in the TNBS model of colitis [3]. However, levamisole has well known immunomodulatory properties, and the B4-78 antibody does not block enzyme activity (unpublished data) and may target leukocytes rather than enterocytes *in vivo*. Thus these data may be perfectly consistent with a protective role of intestinal AP. An attractive hypothesis in this regard is that luminal AP (TNAP or IAP) plays a functional role by inactivating LPS before it reaches the mucosa.

Our results therefore offer confirmation for the intestinal anti-inflammatory activity of exogenous AP, and further indicate: (1) that oral and intrarectal AP are generally comparable in efficacy, although the latter is superior; (2) that AP treatment by either route prevents bacterial translocation in experimental colitis; (3) that feces from colitic animals are enriched in TNAP, which may be at least in part of epithelial origin. AP may find its way into IBD therapy, as it is well tolerated in humans, as shown recently in the case of ulcerative colitis [36].

Acknowledgments

The authors kindly acknowledge the technical help of Dr. Mercedes González. This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01432, AGL2008-04332, SAF2011-22922 and SAF2011-22812) and by the Fundación Ramón Areces. PMM, MOG and RLP are funded by Ministerio de Educación and by the Granada Research of Excellence Initiative on Bio-health (GREIB). RG is funded by CIBERehd. CIBERehd is funded by Instituto de Salud Carlos III.

References

- [1] Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World Journal of Gastroenterology* 2008;14:354–77.
- [2] Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627–40.
- [3] Sanchez de Medina F, Martínez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochemical Pharmacology* 2004;68:2317–26.
- [4] Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiau JA, Buller HA, Dekker J, et al. Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *International Journal of Colorectal Disease* 2002;17:317–26.
- [5] Gibson P, Rosella O, Nov R, Young G. Colonic epithelium is diffusely abnormal in ulcerative colitis and colorectal cancer. *Gut* 1995;36:857–63.
- [6] Torres MI, Lorite P, Lopez-Casado MA, Rios A. A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease. *Pathology, Research and Practice* 2007;203:485–7.
- [7] Smith GP, Harris H, Peters TJ. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinica Chimica Acta* 1984;142:221–30.
- [8] Lopez-Posadas R, Gonzalez R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suarez MD, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflammatory Bowel Diseases* 2011;17:543–56.

- [9] Harada T, Koyama I, Matsunaga T, Kikuno A, Kasahara T, Hassimoto M, et al. Characterization of structural and catalytic differences in rat intestinal alkaline phosphatase isozymes. *FEBS Journal* 2005;272:2477–86.
- [10] Martins MJ, Negrao MR, Hipólito-Reis C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clinical Biochemistry* 2001;34:463–8.
- [11] Nosjean O, Koyama I, Goseki M, Roux B, Komoda T. Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochemical Journal* 1997;321:297–303.
- [12] Komoda T, Koyama I, Nagata A, Sakagishi Y, DeSchryver-Kecsckemeti K, Alpers DH. Ontogenic and phylogenetic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development. *Gastroenterology* 1986;91:277–86.
- [13] Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochemistry and Cell Biology* 1997;107:183–91.
- [14] Eliakim R, Goetz GS, Rubio S, Chailley-Heu B, Shao JS, Ducroc R, et al. Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *American Journal of Physiology* 1997;272:G425–34.
- [15] Shao JS, Engle M, Xie Q, Schmidt RE, Narisawa S, Millan JL, et al. Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach. *Microscopy Research and Technique* 2000;51:121–8.
- [16] Young GP, Friedman S, Yedlin S, Alpers DH. Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum. *American Journal of Physiology* 1981;241:G461–8.
- [17] Eliakim R, Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D, Shao JS, Alpers DH. Sulphydryl blocker-induced rat colitis is ameliorated by intravenous injection of antibody to colonic surfactant-like particle. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999;5:16–23.
- [18] Nakano T, Inoue I, Koyama I, Kanazawa K, Nakamura K, Narisawa S, et al. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene *Akp3* impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;292:G1439–49.
- [19] Bodrogi L, Brands R, Raaben W, Seinen W, Baranyi M, Fiechter D, et al. High level expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Research* 2006;15:627–36.
- [20] Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JAAM, Hardonk MJ, Meijer DKF. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *American Journal of Pathology* 1997;151:1163–9.
- [21] Goldberg RF, Austen Jr WG, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:3551–6.
- [22] Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krieken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 2009;58:379–87.
- [23] Lawson GM, Katzmann JA, Kimlinger TK, O'Brien JF. Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzyme oh human alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry* 1985;31:381–5.
- [24] Gonzalez R, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Nieto A, Galvez J, Risco S, et al. Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *British Journal of Pharmacology* 2004;141:951–60.
- [25] Lopez-Posadas R, Requena P, Gonzalez R, Suarez MD, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F, et al. Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *Journal of Nutrition* 2010;140:2014–9.
- [26] Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suarez MD, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O. Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *Journal of Nutrition* 2005;135:1164–70.
- [27] Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *Journal of Biological Chemistry* 1946;164:321–9.
- [28] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985;150:76–85.
- [29] Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 2010;401:318–20.
- [30] Gutierrez A, Frances R, Amorós A, Zapater P, Garmendia M, Ndongo M, et al. Cytokine association with bacterial DNA in serum of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009;15:508–14.
- [31] Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007;446:557–61.
- [32] Venkataranganna MV, Rafiq M, Gopumadhavan S, Peer G, Babu UV, Mitra SK. NCB-02 (standardized Curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene-induced colitis through down-regulation of NF κ B and iNOS. *World Journal of Gastroenterology* 2007;13:1103–7.
- [33] Pellequer Y, Meissner Y, Ubrich N, Lamprecht A. Epithelial heparin delivery via microspheres mitigates experimental colitis in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007;321:726–33.
- [34] Martinez-Augustin O, Lopez-Posadas R, Gonzalez R, Ballester I, Suarez MD, Zarzuelo A, et al. It may not be intestinal, but tissue non-specific alkaline phosphatase. *Gut* 2010;59:560 (author reply).
- [35] Zhang Y, Shao JS, Xie QM, Alpers DH. Immunolocalization of alkaline phosphatase and surfactant-like particle proteins in rat duodenum during fat absorption. *Gastroenterology* 1996;110:478–88.
- [36] Lukas M, Drastich P, Konecny M, Gionchetti P, Urban O, Cantoni F, et al. Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010;16:1180–6.



Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis

Patricia Martínez-Moya^a, Isabel Romero-Calvo^a, Pilar Requena^{a,1}, Cristina Hernández-Chirlaque^a, Carlos J. Aranda^a, Raquel González^b, Antonio Zarzuelo^b, María Dolores Suárez^a, Olga Martínez-Augustin^a, José Juan G. Marín^c, Fermín Sánchez de Medina^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology II, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Spain

^b Department of Pharmacology, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Spain

^c Department of Physiology and Pharmacology, HEVEFARM, IBSAL, CIBERehd, University of Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2012

Received in revised form 22 November 2012

Accepted 29 November 2012

Available online 13 December 2012

Keywords:

Bile acid
Inflammatory bowel disease
Budesonide

ABSTRACT

The denomination of inflammatory bowel disease comprises a group of chronic inflammatory diseases of the digestive tract, ulcerative colitis and Crohn's disease being the most important conditions. Bile acids may play a role both in etiology and pharmacology of this disease. Thus, although deoxycholic acid is regarded as a proinflammatory agent ursodeoxycholic acid, which is currently being used to treat certain types of cholestasis and primary biliary cirrhosis, because of their choleric, cytoprotective and immunomodulatory effects, it has been reported to exert an anti-inflammatory activity. We aim to confirm and characterize the intestinal antiinflammatory activity of ursodeoxycholic acid. The experimental model trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats has been used. Animal status was characterized by a number of macroscopic and biochemical parameters. Oral administration of ursodeoxycholic acid was able to ameliorate experimental colonic inflammation. This occurred only at a relatively high dose (50 mg/kg day), whereas ursodeoxycholic acid was without significant effect at doses of 10 and 25 mg/kg day. The therapeutic effect was evidenced, among others, by a higher body weight recovery, a diminished affected to total mucosal area and lower alkaline phosphatase activity in treated vs. control (TNBS treated) animals. These results indicate that, at the appropriate dose, ursodeoxycholic acid is a potentially useful drug to reduce intestinal inflammation and could be envisaged to be incorporated in the treatment of inflammatory bowel diseases.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The human gut serves an essential function for life, namely the absorption of nutrients for the sustainment of the host, collaborating also in the fine regulation of the body levels of water, electrolytes and oligoelements [1]. It is built as a continuous tube that runs through the body from the mouth through the anus, covered internally by a mucosal layer. Even more than other mucosal surfaces, the gastrointestinal tract is the natural environment for a complex mixture of bacteria and other microorganisms, known as the flora or, more properly, microbiota. Although not essential for life, the microbiota appears to be in symbiotic relationship with the host [2] and is especially prominent in the distal sites of the gastrointestinal tract, i.e. the ileum,

cecum and colon [3]. While the gut normally maintains a delicate equilibrium with the microbiota, disturbances of the intestine are commonplace even in healthy adults, causing malaise, diarrhea, weakness, nausea, and so forth.

In addition, the gastrointestinal tract may be affected chronically by inflammation, as in Crohn's disease and ulcerative colitis, known as inflammatory bowel disease (IBD). IBD is a severe condition that affects approximately 0.1% of the population in developed countries and whose etiology is only partially characterized [4]. While IBD is not infectious, it is generally believed that the microbiota plays a major role in the pathogenesis. Current IBD management is effective but insufficient, and there is a well recognized need for new therapeutic strategies.

Bile acids are biologically relevant compounds acting as tensioactives in the intestinal lumen after the ingestion of lipid containing foods to aid in their digestion. In addition, bile acids have a number of biological properties, including choleric, inhibition of cholesterol synthesis, and modulation of mucosal function, although these effects depend on the particular bile acid considered. Deoxycholic acid (DCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) have received substantial attention in this regard. Both are secondary bile acids, i.e. they are not produced

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, CIBERehd, School of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, Spain. Tel.: +34 958 241747; fax: +34 958 248964.

E-mail address: fsanchez@ugr.es (F. Sánchez de Medina).

¹ Present address: Barcelona Centre for International Health Research (CREsIB), Hospital Clinic-University of Barcelona, Spain.

directly by the liver but result from the biotransformation of the primary bile acids cholic acid and chenodeoxycholic acid. To a certain extent, DCA and UDCA exert opposite actions on the intestinal mucosa [5]. In particular, DCA has been described to have carcinogenic and proinflammatory activities and to induce hydroelectrolytic secretion. Conversely, UDCA has chemopreventive effects in the colon, is neutral with regard to transport and has documented antiinflammatory effects on the intestinal epithelium. UDCA reduces small intestinal permeability and oxidative stress in the indomethacin model of ileitis in the rat [6,7], counteracts ibuprofen intestinal ulceration in rats [8] and ameliorates TNBS colitis [9], although there are also conflicting data [10]. On the basis of the available evidence, DCA is predicted to have enhancing effects on intestinal inflammation. The present study was carried out to assess and characterize the antiinflammatory action of UDCA.

2. Materials and methods

2.1. Material and reagents

Except where indicated, all reagents were obtained from Sigma (Madrid, Spain). *Escherichia coli* strains were the kind gift of Dr. Arlette Darfeuille Michaud (Université d'Auvergne, France) and were provided by Dr. Margarita Martínez Medina (University of Girona, Spain), to both of whom the authors are very grateful.

2.2. Animals

Female Wistar rats (200–250 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Granada were used, housed in macrolon cages, and maintained in our laboratory in air-conditioned animal quarters with a 12-h light–dark cycle. Rats were given free access to tap water and a standard chow diet (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain). This study was carried out in accordance with the Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes of the European Union (86/609/EEC).

2.3. Induction of colitis and experimental design

Colitis was induced by the method of Morris et al. with minor modifications [11]. Briefly, rats were fasted overnight and anesthetized with halothane. Under these conditions, rats were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v:v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. The mechanism of TNBS-induced colitis involves reaction of the hapten with host tissue proteins, generating a variety of new antigens in situ as well as the production of free radicals. Rats were kept in a head-down position for an additional 30 s and returned to their cage.

Rats were randomly assigned to 4 different groups ($n=4-6$). Several groups [TNBS, Budesonide, UDCA (10, 25, 50 mg/kg day)] received the TNBS challenge to induce colitis as described above, and one group [Control (C)] was given 0.25 ml of PBS intrarectally. Groups Budesonide and UDCA 10, 25 and 50 received budesonide (2 mg/kg d) or 10, 25 or 50 mg/kg d UDCA in 1% methylcellulose orally, starting 1 d before the TNBS challenge, while groups TNBS and Control received the vehicle. Budesonide is a corticoid used in IBD and other conditions which has mainly local vs. systemic effects, owing to rapid first pass metabolism, and was used in the present study as a reference drug. Rats were treated for 5–6 d after the TNBS challenge, when the inflammatory response most closely resembles the human condition [12]. Three different experiments were carried out, as presented in the Results section. An esophageal catheter was used to deliver all treatments. We determined food intake, water intake, and body weight every day.

2.4. Assessment of colonic damage

Rats were killed by cervical dislocation and the entire colon was removed, placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper. Each specimen was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The large intestine was longitudinally opened and photographed. Each picture was later scored by FSM and OMA (who were blinded to sample identity) for visible damage on a 0–25 scale according to the following criteria: adhesions (0–3), obstruction (0–2), hyperemia (0–3), fibrosis (rigidity and deformation, 0–5), necrosis (0–5), and other features (proximal dilatation, fragility, scarring (0–4)).

Myeloperoxidase (MPO) activity (a marker of leukocyte, mainly neutrophil, infiltration) was measured according to the technique described by Krawisz et al. [13], using 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in Tris (pH = 6.0) for tissue homogenization and *o*-dianisidine dihydrochloride (533 $\mu\text{mol/l}$) as chromogen. The results are expressed as MPO units per gram of wet tissue. Alkaline phosphatase (AP) activity, a marker of both leukocyte infiltration and enterocyte stress, was measured spectrophotometrically, using disodium nitrophenylphosphate (5.5 mmol/l) as substrate in 50 mM glycine buffer with 0.5 mmol/l MgCl_2 (pH = 10.5). Results are expressed as units per milligram of protein. The sensitivity (% inhibition) to levamisole was also assessed [14].

2.5. Analysis of gene expression by reverse transcriptase-PCR analysis

Total RNA was obtained by the Trizol method (Invitrogen, Barcelona, Spain), 1 μg was retrotranscribed and specific RNA sequences were amplified with Stratagene MX3005P real time PCR device using the following primers: IL-10: (sense 5'-AGTCAGCCAGACCCACATG-3'; antisense 5'-TGCTCCACTGCCTTGCTTTT-3'), IL-1 β : (sense 5'-AATGACCTGTCTTTGAGGCTG-3'; antisense 5'-CGAGATGCTGCTGTGAGATTTGAAG-3'), IL-17: (sense 5'-TTCTCCAGAACGTGAAGGTC-3'; antisense 5'-GGACAATAGAGGAAACGAG-3'), 18S rRNA subunit (sense 5'-CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'; antisense 5'-CGCCGGTCCAAGAATTTACC-3'), S100A8 (sense 5'-GCCCACCCTATACCAAC-3'; antisense 5'-TGCCCTCAGTTTGTGCAGAA-3'), and IFN- γ : (sense 5'-AACAGTAAAGCAAAAGGATGCATT-3'; antisense 5'-TTCATTGACAGCTTTGCTCTGG-3'). Colonic inflammatory marker expression is expressed as fold change based on 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ using 18S as reference gene.

2.6. Western blot

For western blot experiments tissue samples were homogenized in lysis buffer (0.1% w/v SDS, 0.1% w/v sodium deoxycholate, 1% v/v Triton X-100 in PBS) with protease inhibitor cocktail 1:100 (v/v). Then homogenates were sonicated and centrifuged at 7000 \times g for 5 min at 4 °C. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid assay [15]. Samples were boiled for 5 min in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, electroblotted to activated PVDF membranes (Millipore, Madrid, Spain), and probed with the corresponding antibodies. The bands were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, Waltham, MA) and quantitated with NIH software (Scion Image). The composition of the Laemmli buffer (5 \times) was: 312 nM SDS, 50% v/v glycerol, 1% v/v 2-mercaptoethanol, 22.5 mM EDTA trisodium salt, 220 mM Tris and traces of bromophenol blue (pH = 6.8). After the transference of the samples to PVDF membranes, equal loading was checked routinely by reversible Ponceau staining, and additionally by quantitation of GAPDH expression. The antibodies were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI), BD Biosciences (Erembodegem, Belgium), Sigma (Madrid, Spain) and Epitepe Biotech Inc. (Burnaby, Canada).

2.7. Bacterial translocation

Liver samples were processed to obtain rat and bacterial DNA with the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Madrid, Spain). DNA was

quantitated with a Nanodrop (Fisher Scientific, Madrid, Spain) and subjected to qPCR with a Stratagene MX3005P real time PCR device using the following primers: AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG/ACC GCG ACT GCT GCT GGC AC. The 16S primers are not genus or species specific and therefore amplify ribosomal 16S encoding DNA of all bacteria. This technique has been previously validated [16].

2.8. Mesenteric lymph node cells

Mesenteric lymph nodes were extracted from the rats in the study using sterile techniques and dissected mechanically. The cells were incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain), 100 mg/l streptomycin, 100 000 U/l penicillin and 2.5 mg/l amphotericin B. The cells were cultured at 10^6 cells/ml and stimulated with concanavalin A (5 μ g/ml). Cell culture medium was collected after 48 h and assayed for cytokine content by commercial ELISAs (Biosource Europe, Nivelles, Belgium and BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

2.9. Cell culture experiments

Additional experiments were performed with IEC18 rat intestinal epithelial cells (ECACC 88011801) (passages 25–50) and Caco-2 human intestinal epithelial cells (ECACC 86010202) (passages 40–50). The cells were cultured in DMEM (25 mM glucose) supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum (10% v/v), 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2.5 μ g/ml amphotericin and 2 mM glutamine.

The invasion assays were carried out in IEC18 cell monolayers cultured in 12 well plates. The cell monolayers were washed twice with Hank's balanced salt solution (HBSS). *E. coli* K12 and LF82 strains expressing GFP were used. Bacteria were grown routinely in LB broth supplemented with 20 μ g/ml of gentamicin (Sigma Aldrich) overnight at 37 °C with shaking. For every experiment bacteria were freshly grown overnight. Each monolayer was infected with 1 ml of the cell culture medium without antibiotics at a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per epithelial cell. After a 4-h incubation, infected monolayers were washed three times with HBSS and fresh cell culture medium containing 100 μ g of kanamycin and 5% of penicillin/streptomycin per ml was added to kill extracellular bacteria. After incubation for an additional hour, monolayers were washed three times again with HBSS. The cells were collected by trypsinization and analyzed by flow cytometry and expressed as percentage of GFP positive cells.

For the cytokine modulatory experiments, Caco-2 cells were cultured until 3–5 d postconfluence and treated with different concentrations of DCA or UDCA for 20 h. The supernatants were collected, cleared by centrifugation, and kept at -80 °C until measurement. IL-8 was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN and Beckton Dickinson, Madrid, Spain) and lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured as the sodium pyruvate dependent disappearance of β -NADH and expressed as U/ml.

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences among means were tested for statistical significance by either one way analysis of variance and *a posteriori* least significance test on preselected pairs or nonparametric ANOVA on ranks, depending on the applicable conditions as tested by SigmaStat 3.5. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Dose-dependent effects of UDCA

Three different experiments were carried out with UDCA at increasing doses. Some results are presented combined in Fig. 1 for clarity, while

further data obtained in the third experiment are presented in other figures and in the text. As a first approach we assayed a dose of 10 mg/kg of UDCA. DCA was included at an equimolar dose for comparison, as it has been claimed to exert proinflammatory actions in intestinal epithelial cells. The dose of UDCA was selected on the basis of prior reports [6,8,9]. However, as shown in Fig. 1, there was no effect of either UDCA or DCA on a number of parameters, including colonic weight to length ratio, damage score and myeloperoxidase activity, among others

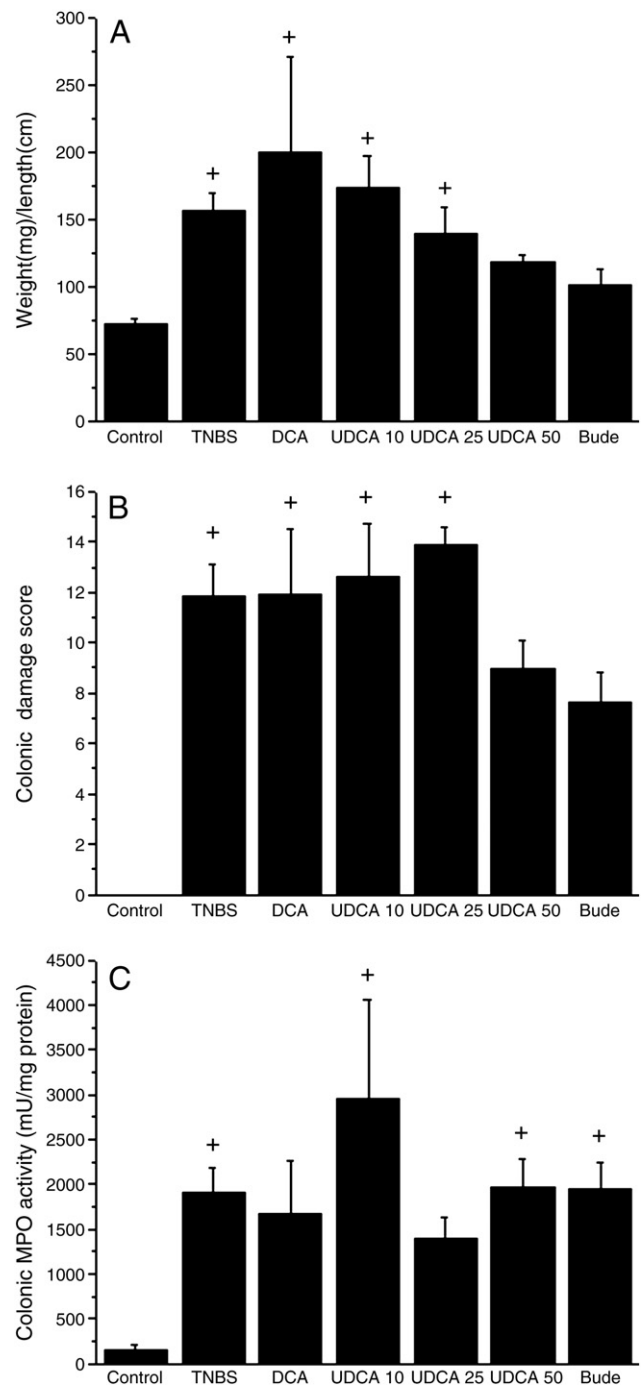


Fig. 1. Colonic weight (A), damage score (B) and MPO activity (C) in rats treated with UDCA. Data from experiments using 3 different doses of UDCA are combined ($n = 5-7$), plus a group treated with DCA (10 mg/kg, $n = 6$), one group treated with budesonide (2 mg/kg, $n = 5$), plus the noncolitic and TNBS controls ($n = 11$ and 18, respectively). Animal status was examined at 5–6 d postcolitis. TNBS colitis increased all three parameters. Colonic weight to length ratio and damage score were ameliorated by UDCA (50 mg/kg) and budesonide, whereas MPO activity was unaffected. ⁺ $P < 0.05$ vs. control group; $P < 0.05$ vs. TNBS group.

(not shown). The data are not supportive of any action of either UDCA or DCA. However, they cannot by themselves rule out a possible effect, especially considering the positive outcomes reported by other authors. Thus we set out to repeat the experiment in order to increase the statistical power. Additionally, we increased the dose in anticipation of a possible potency issue. The results were comparable, i.e. inconsistent with a therapeutic effect of UDCA, despite a positive response to budesonide. Finally, UDCA was tested at 50 mg/kg, with the objective of either confirming that UDCA has intestinal antiinflammatory effects but at higher doses than previously reported, or ruling out this pharmacological activity altogether. Contrary to the previous experiments, UDCA treated rats exhibited a reduced loss of body weight after colitis induction, although it never reached statistical significance (Fig. 3A). Treatment with budesonide, on the other hand, was associated with a heightened body weight loss. Food intake was significantly lowered in all colitic groups compared to the control, but there was no effect of UDCA or budesonide (not shown).

In line with this observation, UDCA treatment resulted in a 40% decrease in colonic weight to length ratio, while budesonide achieved an even higher reduction (55%), so that neither group was significantly different from the noncolitic control (Fig. 1). Both groups exhibited a comparable decrease in damage score (see Fig. 2 for representative images of the intestines). This was attributable to amelioration of obstruction and fibrosis as a common feature, but only UDCA reduced the necrosis score, while budesonide decreased the value assigned for adhesions and deformation (not shown). The extent of necrosis was not significantly affected, although values were lower in the

treated groups (Table 1). Colonic MPO activity, a measure of leukocyte infiltration, was totally unaffected by either UDCA or budesonide (Fig. 1).

3.2. Characterization of the effects of UDCA (50 mg/kg)

Next we assessed the colonic status by other biochemical parameters. Colonic AP activity (a marker of leukocyte infiltration and enterocyte stress) was markedly augmented in TNBS colitic rats and reduced by ~50% by both treatments ($P < 0.05$, Fig. 3B). This effect was associated with parallel changes in the sensitivity of the enzyme to the AP inhibitor levamisole (Fig. 3C). Thus rats from the TNBS group had a larger than 2-fold increase in sensitivity compared with the controls, and this was moderately tempered by UDCA and budesonide (significant for budesonide only).

Colonic expression of inflammatory cytokines was assessed by RT-PCR (Figs. 4 and 5). The results show that the animals in the TNBS group exhibit an increased expression of S100A8 (a neutrophil marker, which together with S100A9 forms calprotectin as a dimer), IFN- γ and IL-1 β , although high variability prevented this difference from reaching statistical significance. IL-17 and IL-10 on the other hand were essentially not changed by TNBS colitis. UDCA treatment produced a significantly higher expression of S100A8 and IL-1 β than the control group. Budesonide produced a marked increase in IL-10 ($P < 0.05$), but no other effects at this level.

TNBS colitis was characterized by a dramatic upregulation of COX-2 and iNOS expression in colonic tissue (Fig. 6). UDCA treated

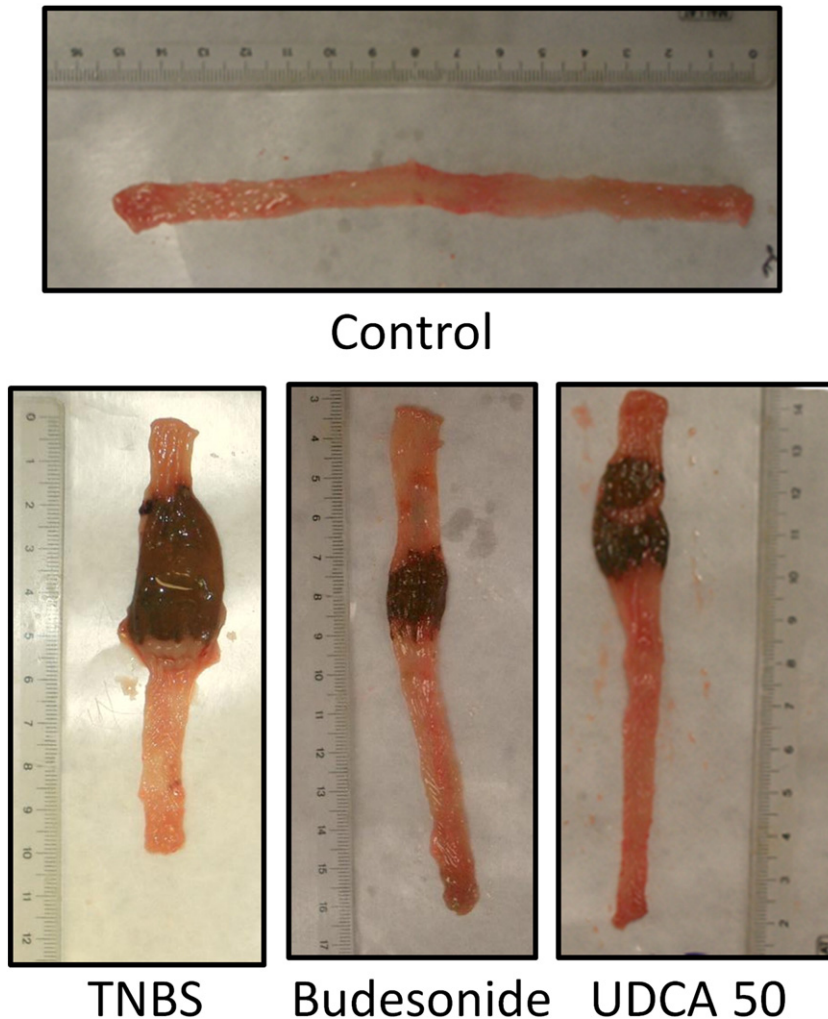


Fig. 2. Representative images of large intestine of the different groups. Control, TNBS, budesonide 2 mg/kg and UDCA 50 mg/kg groups are shown.

Table 1
Effect of UDCA (50 mg/kg) on rat TNBS colitis.

	Control	TNBS	Budesonide	UDCA 50
Colonic damage extension (cm)	0±0	4.1±0.2*	4.3±0.2*	3.4±0.5*
Necrosis area (%)	0±0	41.3±1.6*	33.1±7.6*	29.9±5.2*

Data are expressed as mean ± SEM (n = 3–6).

* $P < 0.05$ vs. control.

rats exhibited lower levels of COX-2 (but not iNOS) than the TNBS control, while budesonide treatment was associated to a decrease in both parameters ($P < 0.05$ for COX2 only). In contrast, there was no change in claudin 4 expression in any group (Fig. 7). On the other hand, TNBS colitis resulted in a nearly 150% increase in bacterial translocation to the liver, as assessed by 16S RNA quantitation (Fig. 8). Of note, UDCA moderately decreased this value, but budesonide actually increased it. The overall ANOVA was not significant because this is a noisy technique ($P = 0.09$).

Last, we measured the production of cytokines by mesenteric node cells (representing mostly lymphocytes) obtained from the different experimental groups and cultured *ex vivo* in basal conditions or in the presence of ConA. The results, shown in Fig. 9, indicate a marked inhibition of IFN- γ release in the budesonide group and a less prominent effect on TNF- α in the stimulated cells. Conversely, UDCA treated rats had an increased production of IFN- γ , TNF- α and IL-2. Again, overall statistical analysis was nonsignificant due to high variability, especially in the UDCA group. Spontaneous secretion of cytokines was negligible.

3.3. Effect of UDCA on intestinal epithelial cells *in vitro*

Cell exposure to either DCA or UDCA for 24 h did not contain bacterial invasion of IEC18 monolayers by either enteroinvasive (LF82) or nonenteroinvasive (K12) *E. coli*, suggesting that UDCA does not affect the capacity of enterocytes to limit bacterial translocation (Fig. 10). On the other hand, DCA elicited a robust IL-8 secretory response in Caco-2 cells at 0.5 mM (Fig. 11, $P < 0.05$). UDCA had no effect at this concentration, and it was a very weak inducer at 2 mM (~5% of the DCA response at 0.5 mM, data not shown). Furthermore, DCA was found to be toxic to Caco-2 cells at this and higher concentrations (see Fig. 11B), while UDCA was relatively nontoxic up to 2 mM (not shown).

4. Discussion

The elucidation of a possible role of bile acids in IBD pathology is of evident interest, since a manipulation of the bile acid pool might represent a new strategy for the management of this condition. In addition, UDCA is currently used for therapeutic purposes in humans under the generic name of ursodiol (for instance URSOCHOL or ACTIGALL). The applications of ursodiol/UDCA include gallstone dissolution and primary biliary cirrhosis, as well as other cholestatic diseases like primary sclerosing cholangitis, and in cystic fibrosis [17]. Thus if UDCA is confirmed as an active agent in IBD, it may have an immediate application in this condition, especially considering its low toxicity. In the present study we have used 3 different doses of UDCA, namely 10, 25 and 50 mg/kg. The lowest dose is the one used in the original studies by Kullmann et al. in indomethacin ileitis and TNBS colitis in rats [7,9]. It is unclear why these authors chose this particular dose, although at least in the ileitis model additional doses were tested, namely 5 mg/kg, which was ineffective, and 15–20 mg/kg, which was comparable to 10 mg/kg [7]. Since we attempted to further study the already described intestinal antiinflammatory activity of UDCA, we decided to use initially the same dose of 10 mg/kg. However, we did not observe any evidence of biological activity in these conditions. The results were basically identical with 25 mg/kg. Thus we moved on to 50 mg/kg, a dose that did

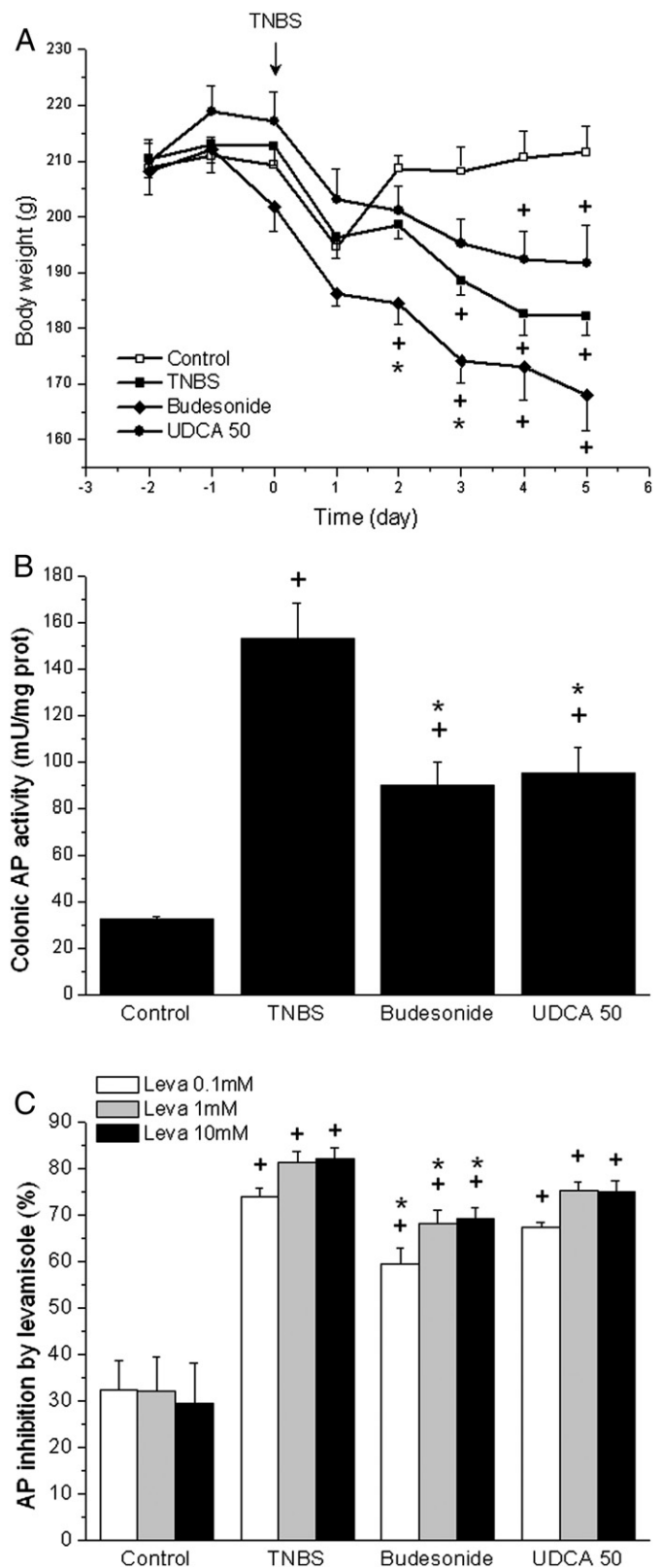


Fig. 3. Body weight gain and colonic AP activity in rats treated with 50 mg/kg UDCA. TNBS colitis was associated with body weight loss and increased colonic AP activity and sensitivity to levamisole. UDCA treatment resulted in reduced AP activity ($P < 0.05$) and a more favorable body weight evolution and lower AP sensitivity to levamisole (both $P > 0.05$). Budesonide ameliorated colonic AP activity and sensitivity to levamisole, but also enhanced body weight loss ($P < 0.05$). $^+P < 0.05$ vs. control group; $^*P < 0.05$ vs. TNBS group. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

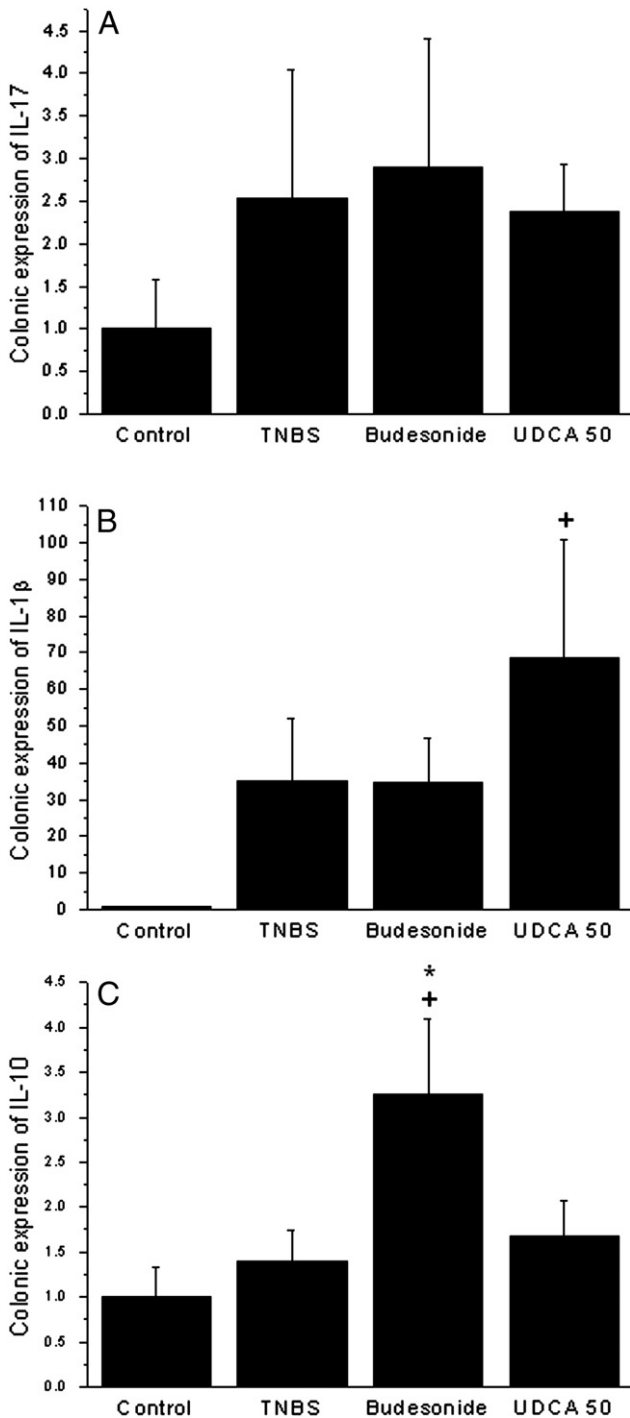


Fig. 4. Colonic cytokine expression in rats treated with 50 mg/kg UDCA. Colonic mRNA levels of IL-17, IL-1β and IL-10 were assessed by RT-PCR and found to be higher in TNBS colitic animals than in the controls. IL-10 was upregulated in budesonide treated rats, while IL-1β was increased in the UDCA group. ⁺*P*<0.05 vs. control group; ^{*}*P*<0.05 vs. TNBS group. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

result in significant, albeit modest, protection from TNBS colitis, evidenced by lower colonic thickening, damage score, and reduced AP activity, and a trend toward less necrosis, body weight loss and COX-2. Surprisingly, neither UDCA nor budesonide treated rats showed changes in colonic MPO activity, and UDCA actually increased the expression of S100A8, a neutrophil/monocyte marker. Consistent with this result, UDCA treatment also augmented IL-1β expression in the colon.

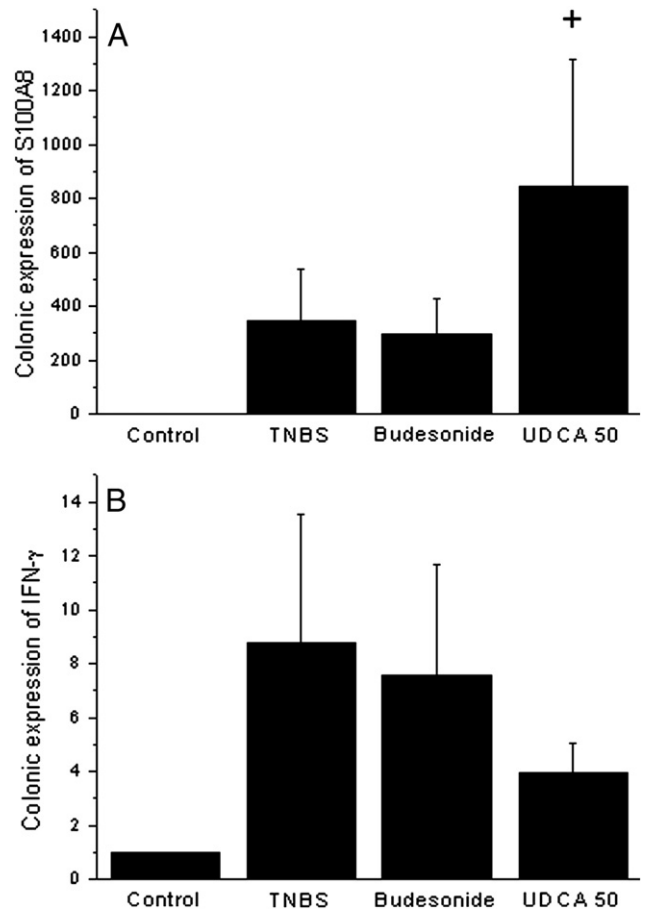


Fig. 5. Colonic expression of S100A8 and IFN-γ in rats treated with 50 mg/kg UDCA. Colonic mRNA levels of S100A8 and IFN-γ were assessed by RT-PCR and found to be higher in TNBS colitic animals than in the controls. S100A8 was significantly increased by UDCA treatment. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

In fact, rats from the UDCA group also had a trend toward a higher level of secretion of inflammatory cytokines by mesenteric node cells *ex vivo*. This observation contrasts with the more ‘typical’ profile of budesonide, which is characterized by reduced colonic thickening and damage score, lower colonic AP activity, decreased IFN-γ release by mesenteric node cells (nonsignificant), and higher IL-10 colonic expression. The relevance of these data is uncertain, since there was no effect of TNBS colitis on cytokine output, but taken together our data suggest that the mechanism of UDCA is not conventional. In principle, it is possible to dampen intestinal inflammation by enhancing mucosal defensive/immune mechanisms. This is based on the hypothesis that failure of the mucosal barrier to contain the bacterial flora results in translocation and a more robust subsequent inflammatory response. For instance, lack of expression of CXCL1, considered the main chemokine responsible for neutrophil recruitment in the colon, is associated with augmented colitis [18]. In line with these findings, neutrophil depletion itself aggravates colitis [19]. In a different study, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) administration has been shown to be protective in experimental colitis acting on innate immunity mechanisms [20]. In our experiment, bacterial translocation was indeed augmented by experimental inflammation and partly limited by UDCA, consistent with a reinforcement of barrier function. This is not achieved at the epithelial level, because UDCA did not prevent bacterial invasion *in vitro*. Interestingly, budesonide treatment ameliorated colitis while facilitating bacterial translocation, which again is consistent with our hypothesis. This point of course will require further research to assess whether this is relevant to the clinical use of corticoids in intestinal inflammation.

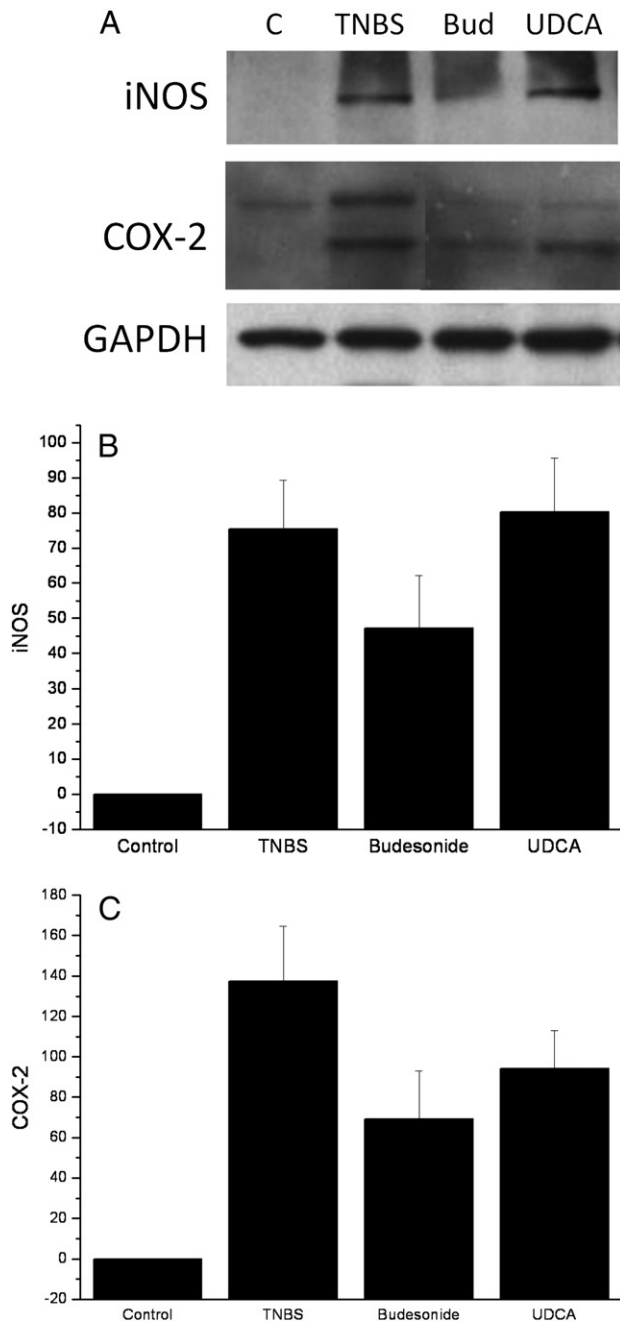


Fig. 6. Expression of iNOS and COX-2 in TNBS colitis. A: Representative Western blot of colonic tissue. B: Quantitative expression measured as iNOS or COX-2/GAPDH ratio by Scion Image software. Both iNOS and COX-2 were upregulated by TNBS colitis. Budesonide reduced this effect ($P < 0.05$ for COX-2 only). UDCA had a similar although nonsignificant effect on COX-2 but failed to modulate iNOS expression. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

The intestinal antiinflammatory activity of UDCA has been related in previous studies to reduced oxidative stress, to amelioration of intestinal permeability, and to various immunomodulatory properties observed in vitro, particularly downregulation of IL-8 secretion by intestinal epithelial cells (of human origin) [5–7,9]. Our data indicate that DCA and UDCA have quite different effects on intestinal epithelial cells, consistent with previous results [5]. The IL-8 secretory effect of DCA was reported previously in HT29 cells, which were somewhat more sensitive than Caco-2 cells in the present study [21,22]. UDCA was totally ineffective at 0.5 mM in Caco-2 cells and minimal IL-8 secretion was achieved at 2 mM. Similar also to previous studies, DCA was found to be cytotoxic to Caco-2 at concentrations of 0.5 mM,

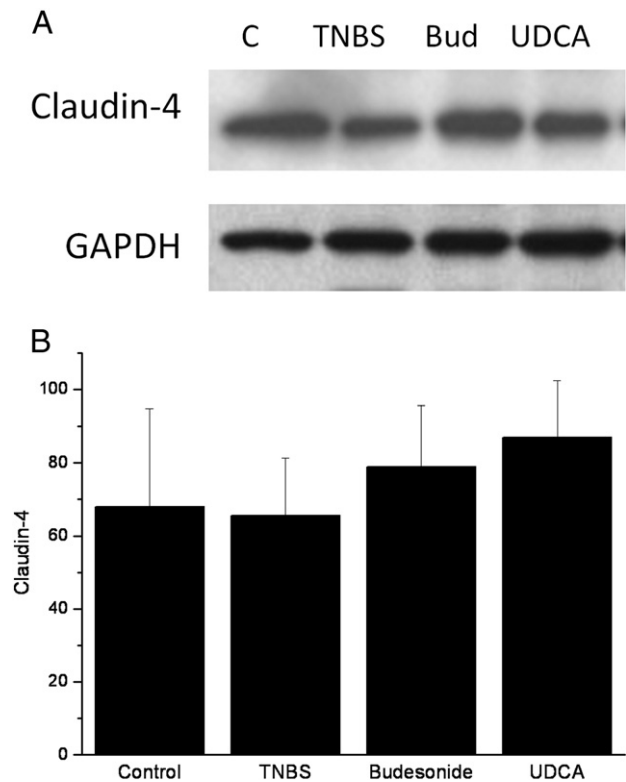


Fig. 7. Expression of claudin 4 in TNBS colitis. A: Representative Western blot of colonic tissue. B: Quantitative expression measured as claudin 4/GAPDH ratio by Scion Image software. No significant differences were found. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

comparable to the 0.2 mM threshold observed in HT29 cells [22]. UDCA was much less harmful to cells. Since DCA reportedly activates the NF- κ B pathway and this is engaged by cell injury, it is possible that this is involved in the effect of DCA. At any rate, our data are not consistent with a major role of epithelial cytokine secretion in the effect of UDCA.

Colonic AP activity is increased in colonic inflammation as a result of leukocyte infiltration and a change in the AP isoform expressed by epithelial cells under severe stress, especially oxidative stress [14]. Namely, the liver type of tissue nonspecific AP shifts to the kidney/bone isoform by a posttranscriptional mechanism that involves a higher specific activity and an increased inhibition by levamisole. Hence the decrease in colonic AP activity brought about by UDCA must be considered an

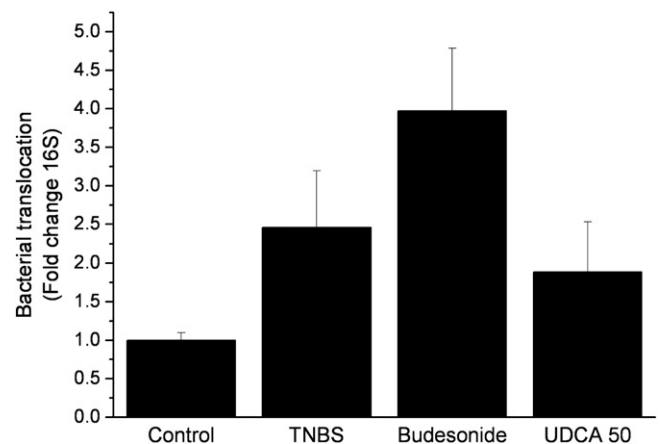


Fig. 8. Bacterial translocation in TNBS colitis. Bacterial 16S RNA was quantitated in the rat liver by PCR. Differences were not significant (ANOVA $P = 0.09$), due to the noise of this technique. Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

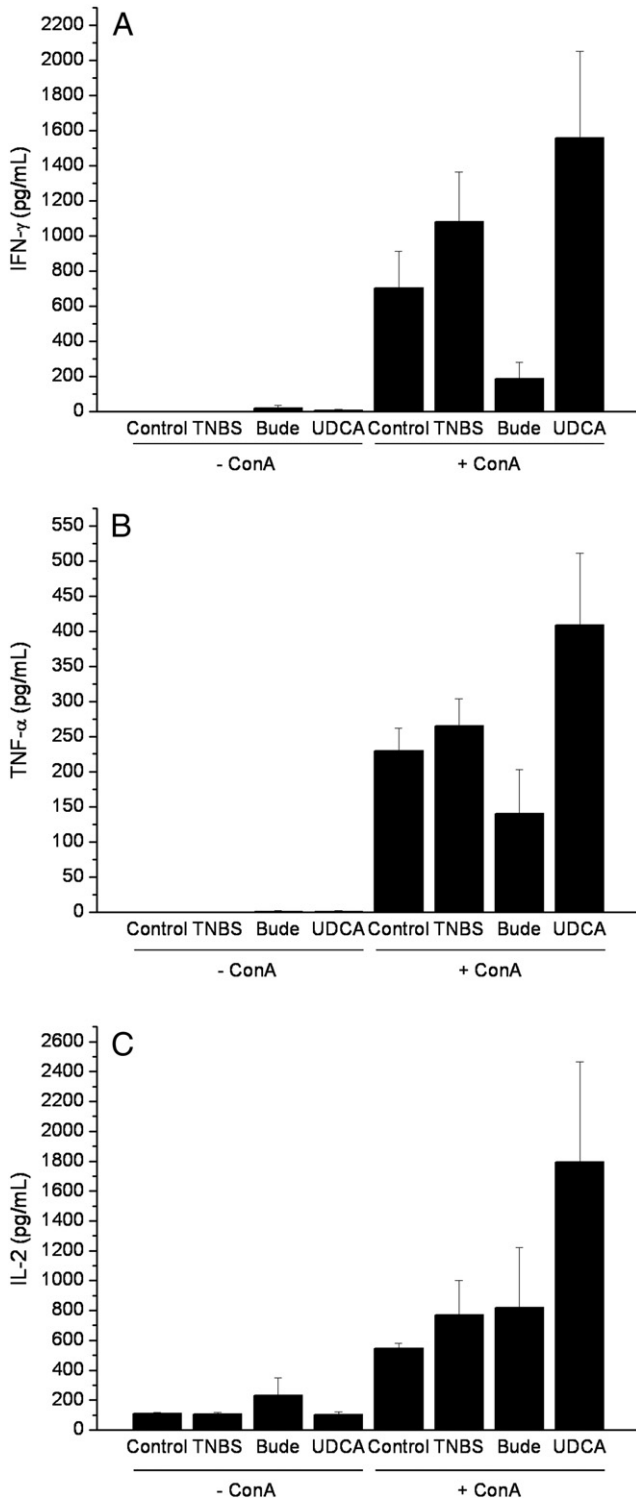


Fig. 9. Cytokine ex vivo production by mesenteric lymph node cells obtained from rats treated with 50 mg/kg UDCA. Mesenteric lymph node cells were isolated as described in [Materials and methods](#) and cultured under basal or ConA stimulatory conditions. Cytokine secretion was measured by ELISA. Basal production was very low and was robustly upregulated by ConA, as expected. Cells obtained from TNBS colitic rats exhibited a slightly higher level, but this difference was not significant. UDCA treatment was associated to a substantial increase of all 3 cytokines (1.6–3.0 fold), but this was not a significant change. In contrast, budesonide was associated with a trend toward lower IFN- γ and TNF α . Group sizes were: control (4), TNBS (6), UDCA (5), and budesonide (5).

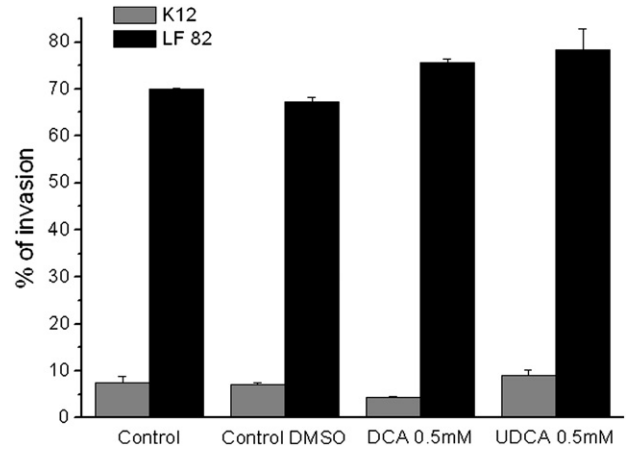


Fig. 10. DCA and UDCA fail to contain bacterial invasion of intestinal epithelial cells. IEC18 cell monolayers were exposed apically to enteroinvasive (LF82) or nonenteroinvasive (K12) strains of green fluorescent protein transformed *E. coli*. Bacterial invasion of the monolayer was quantitated by flow cytometry and expressed as percent of GFP positive cells. These data are representative of two experiments, performed in quadruplicate. Neither bile acid affected invasion significantly.

epithelial effect. UDCA has been shown previously to reduce epithelial permeability and to decrease oxidative stress, consistent with this putative mechanism [6]. Although we looked at claudin 4 expression as one of the proteins involved in epithelial cell adhesion, there was no effect of colitis or either treatment.

There may be a dose dependent range of effects of this bile acid, so that at low doses protection prevails, while at high doses stimulation is excessive and results in heightened inflammation. Thus Uchida et al. reported that UDCA is deleterious in the TNBS colitis model at doses equivalent to 400 and 40 mg/kg day (and neutral at 4 mg/kg) [10]. In this study taurine conjugated UDCA was broadly equivalent to the parent compound (which could be expected because in bile, and hence in intestinal lumen, conjugated forms of bile acids are majority), while taurochenodeoxycholic acid was antiinflammatory. Although not measured in our study, it has been claimed that 4 d of feeding a diet supplemented with bile acids is sufficient to achieve a new steady state in the bile acid pool [23]. These conditions have been established for relatively high doses, namely a 0.4% diet (equivalent to 320 mg/kg d) in that study, or a 0.5% diet (400 mg/kg d) in the paper by Uchida et al. [10]. A lower dose of 10 mg/kg of UDCA, much closer to the 50 mg/kg found effective by us, has been shown to be unable to affect the bile pool after 3 d [8]. Thus it seems likely that the bile acid pool is affected in our conditions, but it is unclear to what extent. As UDCA becomes prominent in the bile acid pool, total hydrophobicity decreases (considered beneficial for inflammation and cancer prevention), but the capacity to control the overgrowth of luminal flora and subsequent bacterial translocation decreases as well [24,25]. Also, as discussed above UDCA is toxic to epithelial cells in vitro although at higher concentrations than DCA. Hence a relatively high dose may offset any positive actions of UDCA by affecting the luminal microbiota or the epithelial layer, and indeed the only study documenting a deleterious effect of UDCA employed a relatively high dose. Also of interest are the possible differences in the effects on the small intestine and the colon, i.e. ileitis vs. colitis. The former has a much lower bacterial load and may be more sensitive to modulation by bile acids, as mentioned above. Contrary to previous studies, we did not see evidence of therapeutic activity at doses below 50 mg/kg. Whatever the reasons, probably related to differences in design, the equivalent of the 50 mg/kg day dose for humans based on body surface is 560 mg for a 70 kg adult, which is in fact the recommended dose for biliary calculi treatment.

In summary, our results indicate that, at doses equivalent to those used in human pharmacotherapy, i.e. 50 mg/kg, UDCA has significant

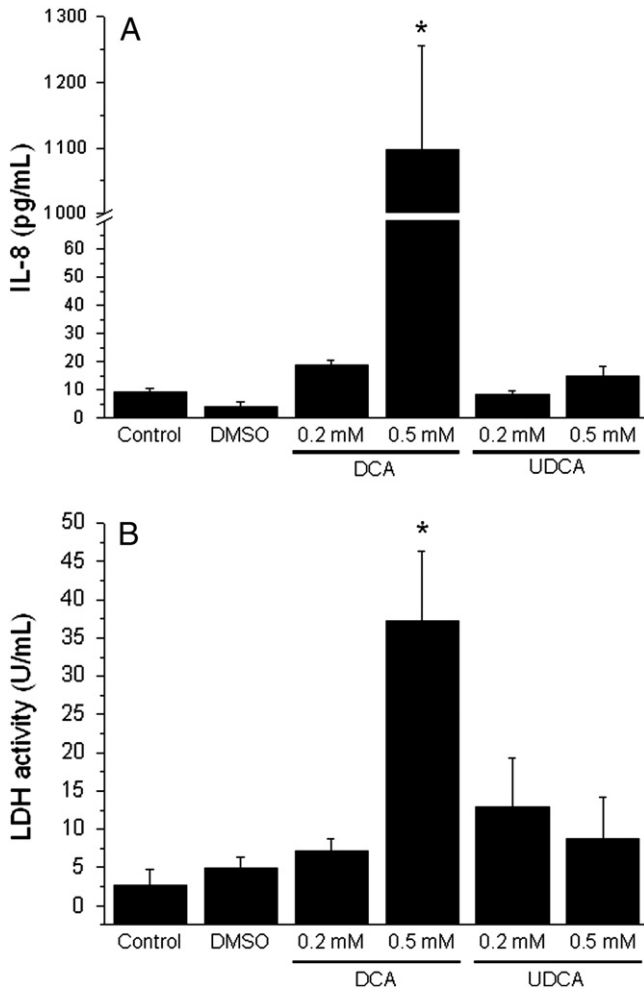


Fig. 11. Effect of DCA and UDCA on IL-8 secretion and LDH leakage in Caco-2 cells. Cells were exposed to the bile acids for 24 h, supernatants were collected and cleared by centrifugation, and ultimately IL-8 (A) was measured by ELISA and LDH (B) by enzymatic determination. * $P < 0.05$ vs. control ($n = 5$). This is representative of 4 experiments ($n = 4$ –6 per group in each experiment).

colonic antiinflammatory effects in rats, comparable to those of 2 mg/kg budesonide, that may be related to enhancement of mucosal defense mechanisms.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Science and Innovation (SAF2008-01432, AGL2008-04332, SAF2011-22922, SAF2011-22812, SAF2009-08493 and SAF2010-15517), by Junta de Castilla y Leon (Grants GR75-2008 and SAN09/10), by the European Regional Development Fund (ERDF), by funds from Junta de Andalucía (CTS-6736 and CTS164), and by the Fundación Ramón Areces. PMM, IRC and PR were supported by a fellowship of the Ministry of Education and Science of Spain. CIBERhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. The authors are grateful to the technical assistance of Dr. Mercedes Gonzalez.

References

- Martínez-Augustín O, Romero-Calvo I, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:114–27.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688–93.
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241–59.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573–621.
- Martínez-Augustín O, Sánchez de Medina F. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2008;14:5630–40.
- Bernardes-Silva CF, Damiao AO, Sipahi AM, Laurindo FR, Iriya K, Lopasso FP, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates experimental ileitis counteracting intestinal barrier dysfunction and oxidative stress. *Dig Dis Sci* 2004;49:1569–74.
- Kullmann F, Gross V, Ruschoff J, Arndt H, Benda W, Winkler von Mohrenfels A. Effect of ursodeoxycholic acid on the inflammatory activity of indomethacin-induced intestinal inflammation in rats. *Z Gastroenterol* 1997;35:171–8.
- Lloyd-Still JD, Beno DW, Uhing MR, Jiyamapa-Serna VA, Kimura RE. Ursodeoxycholic acid ameliorates ibuprofen-induced enteropathy in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:270–3.
- Kullmann F, Arndt H, Gross V, Ruschoff J, Scholmerich J. Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on mucosal damage in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:1205–11.
- Uchida A, Yamada T, Hayakawa T, Hoshino M. Taurochenodeoxycholic acid ameliorates and ursodeoxycholic acid exacerbates small intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1997;272:G1249–57.
- Martínez-Augustín O, López-Posadas R, González R, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with modulation of NF- κ B but not PPAR- γ signaling. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:363–72.
- Palmen MJ, Dieleman LA, van der Ende MB, Uytterlinde A, Pena AS, Meuwissen SG, et al. Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 1995;99:226–32.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984;87:1344–50.
- López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez MD, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:543–56.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
- Gutiérrez A, Frances R, Amorós A, Zapater P, Garmendía M, Ndongo M, et al. Cytokine association with bacterial DNA in serum of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:508–14.
- Sharkey KA, Wallace JL. Treatment of disorders of bowel motility and water flux; antiemetics; agents used in biliary and pancreatic disease. In: Brunton LL, editor. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th edition. China: McGraw-Hill; 2011. p. 1323–50.
- Shea-Donohue T, Thomas K, Cody MJ, Aiping Z, Detolla LJ, Kopydlowski KM, et al. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun* 2008;14:117–24.
- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Kuhl AA. Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:909–20.
- Sainathan SK, Hanna EM, Gong Q, Bishnupuri KS, Luo Q, Colonna M, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:88–99.
- Lee DK, Park SY, Baik SK, Kwon SO, Chung JM, Oh ES, et al. Deoxycholic acid-induced signal transduction in HT-29 cells: role of NF- κ B and interleukin-8. *Korean J Gastroenterol* 2004;43:176–85.
- Muhlbauer M, Allard B, Bosserhoff AK, Kiessling S, Herfarth H, Rogler G, et al. Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF- κ B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G1000–8.
- Rodrigues CM, Kren BT, Steer CJ, Setchell KD. Tauroursodeoxycholate increases rat liver ursodeoxycholate levels and limits lithocholate formation better than ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1995;109:564–72.
- Floch MH, Binder HJ, Filburn B, Gershengoren W. The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 1972;25:1418–26.
- Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990;159:79–84.