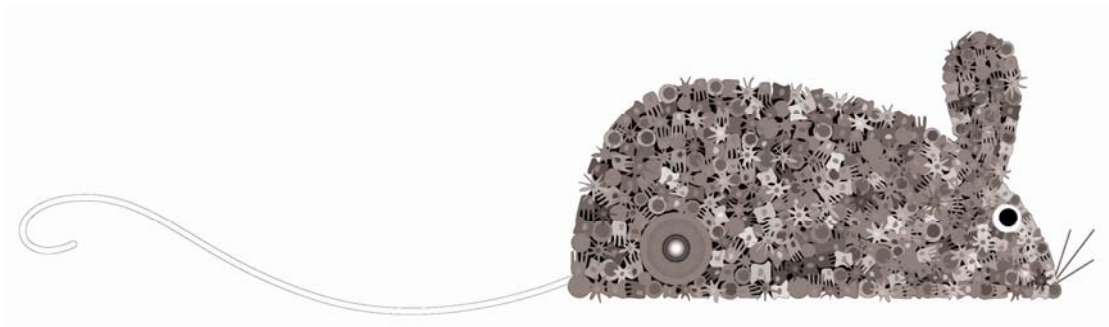


UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de farmacología

**UR-1505, ¿un nuevo salicilato para
la enfermedad inflamatoria
intestinal?**



TESIS DOCTORAL

ELVIRA BAILÓN FERNÁNDEZ

GRANADA, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Elvira Bailón Fernández
D.L.: GR. 1993-2009
ISBN: 978-84-692-1868-6

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de farmacología



UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la enfermedad inflamatoria intestinal?

TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

ELVIRA BAILÓN FERNÁNDEZ

Bajo la dirección de los doctores:

Antonio Zarzuelo Zurita

Julio Juan Gálvez Peralta

Mònica Comalada Vila

GRANADA, 2009

D. Julio Juan Gálvez Peralta, Profesor Titular y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada

Certifica:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado: "UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la enfermedad inflamatoria intestinal?" ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia Elvira Bailón Fernández en los laboratorios de este departamento.

Y, a los efectos legales, se firma la siguiente constancia en

Granada, a 20 de Enero de 2009.

Dr. Julio Juan Gálvez Peralta

D. Antonio Zarzuelo Zurita, Profesor Catedrático, D. Julio Juan Gálvez Peralta, Profesor Titular, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada y Dña. Mònica Comalada Vila, doctora contratada Ramón y Cajal, como directores

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada "UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la enfermedad inflamatoria intestinal?" presentada por la Licenciada en Farmacia Elvira Bailón Fernández, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos 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 20 de Enero de 2009

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Dr. Julio Juan Gálvez Peralta

Dra. Mònica Comalada Vila



Índice

Índice	17
Índice de tablas.....	21
Índice de figuras.....	23
Capítulo 1: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	25
1.- Aspectos generales	27
2.- Epidemiología	28
3.- Etiología y fisiopatología	28
3.1.- Factores Inmunológicos	29
3.1.1.- Sistema inmunitario de las mucosas. Tolerancia oral.....	30
3.1.1.1.- Inmunidad innata	30
3.1.1.2.- Inmunidad adaptativa.....	32
3.1.2.- Alteración del sistema inmunológico. EII	36
3.1.2.1.- Alteración de la barrera epitelial.....	36
3.1.2.2.- Alteración de las células del sistema inmunológico.....	38
3.1.2.3.- Patrón de citocinas en la EII.....	39
3.2.- Factores genéticos implicados en la EII.....	43
3.3.- Factores ambientales involucrados en la EII	44
Capítulo 2: Modelos animales para el estudio de la EII	55
1.- Modelos de colitis inducidos químicamente.	59
1.1.- Colitis inducida por TNBS.	59
1.2.- Colitis inducida por DSS.	61
1.3.- Colitis inducida por Oxazolona.	63
1.4.- Colitis inducida por Iodacetamida.	63
1.5.- Colitis inducida por Indometacina.	63
1.6.- Colitis inducida por Polisacárido-peptidoglicano.....	64
1.7.- Colitis inducida por ácido acético.....	64
2.- Modelos manipulados genéticamente	65
2.1.- Ratones KO para IL-2.	65
2.2.- Ratones KO para IL-10.	65
2.3.- Ratones con mutación en el receptor de células T.....	66
2.4.- Ratones TNF ^{ΔARE}	67
2.5.- Ratas transgénicas HLA-B27.	68
2.6.- Ratones transgénicos de STAT4.....	68
2.7.- Ratones transgénicos de IL-7.....	69

2.8.- Ratones KO MDR1a.....	69
2.9.- Ratones KO <i>Gai2</i>	69
3.- Modelos de colitis espontánea.....	70
3.1.- Ratones C3H/HeJBir.....	70
3.2.- Ratones SAMP1/Yit Y SAMP1/YitFc.....	70
4.- Modelos de transferencia celular.....	71
4.1.- Modelo de transferencia CD45RB.....	71
5.- Selección del modelo a estudiar.....	72
Capítulo 3: Terapias actuales en la EII.....	79
1.- Tratamientos actuales en la EII.....	81
1.1.- Fármacos antiinflamatorios.....	81
1.1.1.- Aminosalicilatos.....	81
1.1.2.- Corticoides.....	82
1.2.- Inmunosupresores.....	82
1.3.- Terapias biológicas.....	84
2.- Terapia en la EII.....	85
Capítulo 4: Posibles estrategias farmacológicas en la EII. Objetivos.....	91
Objetivos.....	94
Capítulo 5: UR-1505, a New Salicylate, Blocks T cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells.....	97
Capítulo 6: The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition.....	113
Capítulo 7: UR-1505, a Salicylate Able to Selectively Block T-Cell Activation, Shows Intestinal Anti-inflammatory Activity in the Chronic Phase of the DSS Model of Rat Colitis.....	129
Capítulo 8: The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a DSS model of colitis which resembles to ulcerative colitis.....	145
Capítulo 9: UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la EII?.....	163
Los linfocitos como diana terapéutica del UR-1505.....	167

Mecanismo de acción del UR-1505	169
Modelos experimentales: evaluación del proceso inflamatorio.....	174
Efecto antiinflamatorio del UR-1505 en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS y DSS.....	178
UR-1505, un nuevo salicilato para la EII	184
Conclusiones	195
Abreviaturas	199
Esquema de células.....	205
Anexo.....	209

Capítulo 1: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	25
Tabla 1. Características diferenciales entre la EC y la CU	28
Tabla 2. Perfil de citocinas en la EII	40
Capítulo 2: Modelos animales para el estudio de la EII	55
Tabla 1. Modelos de colitis inducidos químicamente en roedores.....	57
Tabla 2. Modelos de colitis inducidos genéticamente en roedores	58
Tabla 3. Modelos de colitis espontánea en roedores	58
Tabla 4. Modelos de transferencia celular en roedores	59
Tabla 5. Escala de valoración del índice de daño macroscópico (IDM) descrito por Bell y col. (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en rata	60
Tabla 6. Asignación del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducido por DSS en rata	62
Capítulo 5: UR-1505, a New Salicylate, Blocks T cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells	97
Tabla 1. Efecto del UR-1505 sobre la actividad de las kinasas p38, GSK y CK1	109
Capítulo 6: The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition	113
Tabla 1. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) en la relación peso/longitud del colon, la extensión de la lesión inflamatoria, el índice de daño macroscópico y el contenido de GSH en la colitis experimental inducida por TNBS en rata	123
Tabla 2. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre la actividad de la enzima MPO, el LTB ₄ , la citocina TNF α y la expresión de iNOS en la colitis experimental inducida por TNBS en rata.....	124
Capítulo 7: UR-1505, a Salicylate Able to Selectively Block T-Cell Activation, Shows Intestinal Anti-inflammatory Activity in the Chronic Phase of the DSS Model of Rat Colitis	129
Tabla 1. Índice de actividad de la enfermedad (IAE)	137
Tabla 2. Criterios de puntuación del engrosamiento de las secciones del colon distal ...	138
Tabla 3. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre la relación peso/longitud del colon, el índice de daño histológico, el contenido de GSH y la actividad de la MPO en la fase aguda de la colitis experimental inducida por DSS en rata (día 5).....	140

Tabla 4. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre la relación peso/longitud del colon, el contenido de GSH, la actividad de la MPO y los niveles de TNF α e IL-1 β en la fase establecida de la colitis experimental inducida por DSS en rata (día 15).....	141
Tabla 5. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre el índice de daño histológico en la fase establecida de la colitis experimental inducida por DSS en rata (día 15)	142
Capítulo 8: The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a DSS model of colitis which resembles to ulcerative colitis	145
Tabla 1. Efecto del UR-1505 sobre la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 en esplenocitos activados por ConA y sobre la secreción de IgG e IgA en esplenocitos activados con LPS	160

Capítulo 1: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	25
Figura 1. Vías de captación de antígenos en el intestino	31
Figura 2. Diferenciación de los subtipos de células T.....	34
Figura 3. Sistema inmunitario de las mucosas	36
Figura 4. Patogénesis en la EII.....	42
Capítulo 3: Terapias actuales en la EII	79
Figura 1. Propuesta de tratamiento para la enfermedad de Crohn.....	86
Figura 2. Propuesta de tratamiento para la colitis ulcerosa	87
Capítulo 4: Posibles estrategias farmacológicas para la EII. Objetivos	91
Figura 1. El UR-1505, un salicilato derivado del ácido salicílico y del HTB	94
Capítulo 5: UR-1505, a New Salicylate, Blocks T cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells	97
Figura 1. Estructura química del UR-1505	102
Figura 2. El UR-1505 inhibe específicamente la proliferación de células T inducida por el TCR, y posee un efecto menor sobre la proliferación inducida por la vía JAK/STAT	103
Figura 3. Efecto del UR-1505 sobre el ciclo celular y los niveles de p27 ^{KIP1}	104
Figura 4. El UR-1505 no disminuye la viabilidad de las células T.....	105
Figura 5. El UR-1505 disminuye la producción de citocinas en células T	106
Figura 6. Inhibición de la expresión de IL-5 e IFN γ por el UR-1505.....	107
Figura 7. El UR-1505 disminuye la unión al ADN del NFAT, sin afectar a NF κ B y AP-1 en las células T	108
Figura 8. El UR-1505 no posee efecto sobre la importación del NFAT hacia el núcleo inducida por ionomicina en células HeLa	109
Figura 9. El bloqueo de la exportación nuclear no afecta al bloqueo de la unión al ADN del NFAT por parte del UR-1505	109
Capítulo 6: The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition	113
Figura 1. Efecto del UR-1505 sobre la proliferación y la viabilidad celular en linfocitos T y macrófagos	120
Figura 2. Efecto del UR-1505 sobre la secreción de citocinas Th1 en linfocitos T activados	121
Figura 3. Efecto del UR-1505 sobre marcadores proinflamatorios en macrófagos activados.....	122

Figura 4. Secciones histológicas de la mucosa colónica de ratas colíticas tratadas con TNBS, teñidas con hematoxilina/eosina que muestran el efecto antiinflamatorio del tratamiento con el UR-1505.....	123
Figura 5. El tratamiento con el UR-1505 inhibe la expresión de IFN γ e iNOS, pero no modifica la expresión de COX-2 en la colitis inducida por TNBS en ratas	124
Figura 6. El tratamiento con el UR-1505 inhibe la infiltración de macrófagos y linfocitos T en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas	125
Capítulo 7: UR-1505, a Salicylate Able to Selectively Block T-Cell Activation, Shows Intestinal Anti-inflammatory Activity in the Chronic Phase of the DSS Model of Rat Colitis	129
Figura 1. Estructura química del UR-1505.....	136
Figura 2. Efecto del UR-1505 sobre la producción de citocinas en linfocitos T.....	139
Figura 3. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre el índice de actividad de la enfermedad en el periodo experimental de 15 días en el modelo de colitis por DSS en rata	140
Figura 4. Secciones histológicas de la mucosa colónica de las ratas colíticas tratadas con DSS, teñidas con hematoxilina/eosina que muestran el efecto del tratamiento con UR-1505 en la fase establecida de la colitis experimental inducida por DSS	141
Figura 5. Efecto del tratamiento con UR-1505 (10 y 30 mg/kg) sobre la expresión de iNOS y COX-2 en colon en el modelo de colitis experimental por DSS en ratas	142
Capítulo 8: The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a DSS model of colitis which resembles to ulcerative colitis	145
Figura 1. Efecto del tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg/día) sobre los niveles de IL-4, IL-10, IgG e IgA en colon en la colitis establecida por DSS	161
Capítulo 9: UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la EII?	163
Figura 1. Activación del NFAT en linfocitos T.....	171
Figura 2. Protocolos de administración del UR-1505 en los modelos de colitis experimental en rata inducidos por TNBS y por DSS	179



Capítulo 1

La enfermedad inflamatoria intestinal

1.- Aspectos generales

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) hace referencia a una patología caracterizada por una inflamación crónica y recurrente del tracto intestinal de etiología desconocida. Los cuadros clínicos más representativos son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Dichas enfermedades se caracterizan por períodos de exacerbación de los síntomas seguidos de intervalos más o menos prolongados de remisión de los mismos, y aunque presentan síntomas comunes como dolor abdominal, diarrea, malestar general y pérdida de peso (Sutherland, 1994), también muestran claras diferencias en cuanto a la distribución de las lesiones que causan y a sus manifestaciones clínicas (Tabla 1).

La EC puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, si bien es más frecuente en la región ileocecal (Gassull y Cabre, 1994). La inflamación, de carácter transmural, se propaga a través de toda la pared intestinal, favoreciendo la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas con órganos adyacentes (Gasche, 2000; Levine, 1994); además, en ocasiones se muestra obstrucción intestinal. Las lesiones con frecuencia afectan de forma discontinua y simultánea a distintas zonas del aparato digestivo, separadas entre sí por segmentos intactos; y se caracterizan por la presencia de granulomas, constituidos esencialmente por macrófagos, pero también por otras células inflamatorias como linfocitos, polimorfonucleares y fibroblastos.

A diferencia de lo que ocurre en la EC, la CU se limita al colon, fundamentalmente a la región distal (recto/ano), y se extiende progresivamente en dirección proximal de forma continua. La inflamación afecta predominantemente a las capas superficiales de la pared intestinal, normalmente mucosa y submucosa, y se caracteriza por necrosis del epitelio, presencia de edema y hemorragia con infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas. Además, es frecuente la formación de abscesos en las criptas, consistentes en un acúmulo de neutrófilos (Obrador y Riera, 1994; Stenson y McDermott, 1991). La mucosa tiene un aspecto granuloso, consecuencia de la irregularidad de la inflamación, y con frecuencia aparecen pólipos inflamatorios (Geller, 1994).

En un 10-15% de los pacientes con EII es imposible establecer un diagnóstico definitivo de CU o EC de colon. La presencia de granulomas en la EC constituye el único carácter diferencial frente a la CU, pero tan sólo se detectan en un 25% de las biopsias y no son específicos de la EC, ya que se han observado también en enfermedades como la tuberculosis colónica y la esquistosomiasis (Geboes, 1994).

En ambas entidades patológicas pueden aparecer complicaciones de tipo autoinmune, afectándose las articulaciones, los ojos o la piel (Litchman y Sartor, 1994) y complicaciones no autoinmunes, como episodios tromboembólicos, anemia y osteoporosis (Gasche, 2000; Szulc y Meunier, 2001). Además, el riesgo de cáncer se incrementa en los

pacientes de EII de modo acumulativo, siendo factores predisponentes la duración de la enfermedad, la extensión de la misma, las complicaciones extraintestinales y la aparición de la enfermedad en edades tempranas. El riesgo de cáncer es superior en pacientes con CU que con EC (Pohl y col., 2000).

Tabla 1. Características diferenciales entre la EC y la CU

Enfermedad de Crohn (EC)	Colitis ulcerosa (CU)
Desde la boca hasta el ano	Recto y/o Colon
Afectación discontinua	Afectación continua
Transmural	Implica sólo la mucosa
Diarrea pastosa	Diarrea líquida con sangre, moco y pus
Fístulas y estenosis intestinal frecuentes	Fístulas y estenosis intestinal poco frecuentes
Anatomía patológica: Granulomas y agregados linfoides	Anatomía patológica: Abscesos de criptas, depleción de mucina y distorsión glandular
Fibrosis	

2.- Epidemiología

Parece ser que la incidencia de estas enfermedades varía mucho en cada área geográfica y su frecuencia se encuentra influenciada por una serie de factores demográficos como son la edad, el género o las diferencias étnicas. Por ejemplo, es más frecuente en raza blanca y la incidencia es de 2 a 4 veces más alta en judíos que en otros grupos étnicos (Roth y col., 1989). En cuanto a la edad, la EC tiene su máxima incidencia entre los 15 y 35 años y la CU es de 5 a 10 años más tardía (Bjornsson y Johannsson, 2000; Loftus y col., 2000). Además, en general, se encuentra un ligero predominio de la EC en la mujer, y por otra parte, si existe algún tipo de influencia del sexo en la CU, parece ser que afecta más al varón (Loftus y col., 2000). Se calcula que hay 2,2 millones de afectados en Europa y 1,5 en EEUU. En España, varios estudios poblacionales han demostrado una frecuencia variable, entre 8 y 16 casos por cada 100.000 personas y año (Saro Gismera y col., 2000; Arin Letamendia y col., 2008), aunque la prevalencia de la enfermedad está aumentando en los últimos años.

3.- Etiología y fisiopatología

Aunque se ha progresado en la caracterización de la patogenia de estas enfermedades, su causa primaria sigue siendo desconocida. La hipótesis genérica actual es que la EII engloba a un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen una manifestación final común: la presencia de inflamación y que, varios **factores inmunológicos, genéticos y**

ambientales están implicados en su fisiopatología (Podolsky, 2002). De hecho, se propone que se trataría de una respuesta inmune incontrolada frente a bacterias de la microbiota intestinal que se desarrolla en un individuo genéticamente predispuesto.

3.1.- Factores inmunológicos

La mucosa intestinal supone una extensión total de 300 m² por lo que constituye una gran área de contacto con el exterior, expuesta continuamente a una gran variedad de antígenos, entre ellos microorganismos patógenos y antígenos procedentes de la comida; por ello, no es de extrañar que el 85% del total de linfocitos y el 67% de la producción total de inmunoglobulinas (Ig) se encuentren asociados a la inmunidad de la mucosa intestinal. Pero a pesar de esta exposición a antígenos, sólo un pequeño porcentaje de individuos desarrolla una respuesta inmunitaria (o bien alergia alimentaria) contra ellos, ya que existen mecanismos de control que evitan una respuesta inmunitaria desproporcionada.

La función del sistema inmunitario es "*reconocer lo propio de lo extraño*", entendiendo como "*propio*" aquello que el organismo conoce y por "*extraño*", aquello que desconoce y que, por tanto, podría suponer un peligro. De esta forma, en condiciones no patológicas se establece un equilibrio entre la capacidad de una respuesta incrementada frente a antígenos patogénicos y un estado de no respuesta frente a antígenos "*conocidos*" como por ejemplo los procedentes de la comida, o la propia microbiota intestinal. A este estado de no respuesta inmunitaria a ciertos antígenos es a lo que se denomina **tolerancia oral** (Strobel y Mowal, 1998; Strober y col., 1998). Por tanto, este proceso se considera una inhibición activa de la respuesta inmunitaria frente a los antígenos que penetran a través de la vía oral después de una dosis elevada o una dosis repetida de ese antígeno (Chehade y col., 2005).

Cuando esta "*homeostasis*" (tolerancia oral) se rompe por diferentes causas se produce un proceso inflamatorio (ya sea alergia alimentaria o inflamación debida a patógenos). El sistema inmunitario de las mucosas se activa y reacciona frente al agente extraño, lo que conduce a la activación de la inmunidad innata (células epiteliales intestinales, macrófagos, neutrófilos, etc.), y de la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B). La respuesta innata y adaptativa interaccionarán entre sí para intentar resolver el problema.

Una de las patologías en las que el proceso de tolerancia oral se ve alterado en el tiempo y, por tanto, se ven afectadas la inmunidad innata y adaptativa, es en la EII. Para entender mejor todo el proceso inmunológico que tiene lugar en esta patología, es necesario hacer primero un recorrido por el sistema inmunitario de las mucosas, lo que se comenta en el siguiente apartado.

3.1.1.- Sistema inmunitario de las mucosas. Tolerancia oral.

3.1.1.1.- Inmunidad innata

La monocapa epitelial y el revestimiento de moco que la recubre, junto con las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos (células epiteliales de la mucosa intestinal), forman una barrera física frente al exterior que previene a los antígenos luminales y/o patógenos potenciales de pasar libremente a la lámina propia.

La mayoría de las células intestinales se dedican a la absorción de nutrientes (pequeñas moléculas como pueden ser los aminoácidos y los azúcares), pero algunas de ellas se han modificado para permitir la entrada de antígenos (generalmente sustancias de mayor tamaño como es el caso de oligopéptidos, oligosacáridos o incluso microorganismos enteros) (Figura 1A). Otra vía de entrada de antígenos luminales de mayor tamaño se encuentra mediada por células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos, las **células M** (Kucharzik y col., 2000). Estas células M captan antígenos particulados o aquellos antígenos luminales para los cuales estas células expresan receptores, y los transportan así hacia el espacio subepitelial de las placas de Peyer, distribuidas en el intestino delgado y en el recto (Figura 1B).

Justo por debajo de las células M se acumulan linfocitos B (60%), T (40%), macrófagos y células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) (0,4%) formando el denominado folículo linfoide de la placa de Peyer. Las DCs y los macrófagos residentes en estas zonas se denominan **células presentadoras de antígeno** (APCs, *antigen-presenting cells*), por la capacidad que poseen de digerir y modificar el antígeno, para mostrarlo mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de clase II a las células T, por vía del receptor de células T (TCR, *T cells receptor*).

Las DCs, aparte de encontrarse en las placas de Peyer, se distribuyen por diferentes áreas del intestino, incluyendo lámina propia intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos (Scheinecker y col., 2002). También pueden presentarse intercaladas entre las células epiteliales intestinales preservando la integridad de la barrera intestinal a través de la expresión de proteínas de las uniones estrechas, y pueden enviar dendritas hacia el lumen para captar antígenos directamente (Rescigno y col., 2001) (Figura 1C).

Además de la captación de antígenos liberados por la membrana de las células epiteliales, la vía directa y la mediada por células M, una cuarta vía de acceso de antígenos tiene lugar cuando la integridad epitelial se encuentra comprometida, como en el caso de la EII, de forma que el material antigénico interacciona directamente con las DCs y los macrófagos residentes en tejidos profundos (Stagg y col, 2003) (Figura 1D).

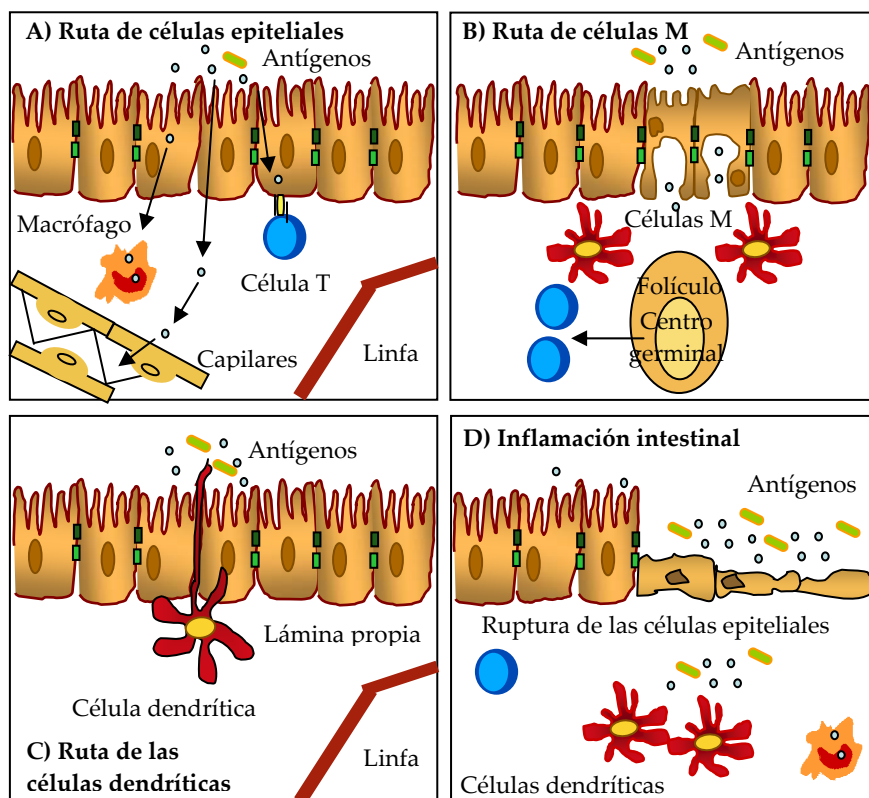


Figura 1: Vías de captación de antígenos en el intestino. A) Los antígenos solubles pueden atravesar el epitelio a través de las rutas inter e intracelulares y enfrentarse a macrófagos, a células T o alcanzar la circulación sistémica. B) Antígenos particulados son captados por las células M de las placas de Peyer y liberados hacia las DCs subepiteliales, que se dirigen hacia el folículo germinal donde se encuentran las células T y B. C) El antígeno puede ser captado directamente por las DCs, que extienden sus prolongaciones hacia el propio lumen intestinal. D) Cuando la integridad epitelial se encuentra comprometida, como en el caso de la EII, los antígenos pasan a la lámina propia, son reconocidos por las APCs y posteriormente son presentados a los linfocitos T, dándose una activación descontrolada de la respuesta inmunológica.

Por tanto, las respuestas inmunológicas frente a antígenos que escapan a la barrera epitelial se inician en las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos, conduciendo, en un primer momento, a la activación de la inmunidad innata. Para la discriminación entre patógenos potenciales y microbiota intestinal, el sistema inmunitario se vale de una serie de receptores celulares expresados en la superficie de células epiteliales, neutrófilos, macrófagos y DCs, denominados **receptores reconocedores de patrones bacterianos** (PRRs, *pattern recognition receptors*). Entre ellos, se incluyen lectinas, receptores del complemento, las proteínas de oligomerización de nucleótidos NOD (NOD, *nucleotide-binding oligomerization domain*), entre las que cabe destacar la NOD2/CARD15 (CARD, Dominio de reclutamiento y activación de caspasas, *caspase activation and recruitment domains*), y también se encuentran los receptores de tipo Toll (TLR, *toll-like*

receptors) (Aderem y Ulevitch, 2000), de los que se han descrito hasta la fecha 11 tipos diferentes (Yamamoto-Furusho y Podolsky, 2007).

Este tipo de receptores reconocen motivos conservados en las distintas especies de bacterias, son los **patrones moleculares asociados a patógenos** (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*). Este es el caso del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, lipoproteínas, o el peptidoglicano-polisacárido (PG-PS) (Schwab, 1993). Por ejemplo, las proteínas NOD participan en la detección de productos bacterianos, concretamente del muramil dipéptido (MDP), la unidad menor del peptidoglicano común a grampositivos y gramnegativos (Girardin y col., 2003), los TLR4 reconocen al LPS, los TLR5 a la flagelina, los TLR9, DNA bacteriano, o los TLR2 a lipoproteínas (Abreu y col., 2005; Yamamoto-Furusho y Podolsky, 2007). Por tanto, estos PAMP son capaces de estimular a macrófagos, DCs y neutrófilos tras ser reconocidos por sus receptores específicos activando así la inmunidad innata. Además, los péptidos, polisacáridos y glicolípidos bacterianos pueden ser reconocidos por las células T y las células asesinas naturales (NK, *natural killer*) presentes en la mucosa, dando lugar a una participación directa de la inmunidad adaptativa.

La estimulación de estos receptores PRRs provoca la activación de diferentes vías de señalización intracelular. En el caso de los TLR y NOD2/CARD15, la vía más estudiada es la vía de factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*) (Doyle y O'Neill, 2006; Inohara y col., 2002). El NF κ B, una vez activado, entra al núcleo celular y regula la expresión de diversos genes en la célula que ha reconocido el antígeno; normalmente suele ser responsable de la inducción de citocinas proinflamatorias (Rakoff-Nahoum y col., 2004) como el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *tumor necrosis factor α*) y la interleucina-1 β (IL-1 β), que aumentan la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, promoviendo así la adhesión leucocitaria y la extravasación de células del sistema inmunológico hacia los tejidos (Charo y col., 2006) que permitirán la resolución de la inflamación en condiciones normales.

En este sentido, se ha propuesto que las bacterias de la microbiota intestinal podrían inducir tolerancia gracias a mecanismos que disminuyeran o alteraran dicha expresión de citocinas inflamatorias a través del bloqueo de la activación de NF κ B, contribuyendo a la homeostasis intestinal y al mantenimiento de la barrera epitelial intacta. Por ejemplo, se ha propuesto que ciertas bacterias podrían activar a otras moléculas nucleares como es el caso del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*), y bloquear la acción de NF κ B (Kelly y col., 2004). Sin embargo, a pesar de la aparente simplicidad de este modelo, el reconocimiento bacteriano y la inducción de la respuesta es mucho más complejo.

3.1.1.2.- Inmunidad adaptativa

El resultado final de este procesamiento antigénico por parte de las APCs en la mucosa dañada es la migración de estas células a los nódulos mesentéricos para presentar

el antígeno a los linfocitos T vírgenes. Entonces, las células T activadas van a la mucosa dañada para desarrollar la inmunidad adaptativa característica de estas células. El proceso de extravasación celular de las células T vírgenes desde la circulación periférica a las placas de Peyer o a los nódulos linfáticos mesentéricos del intestino es logrado por la interacción específica entre la L-selectina asociada a célula T y su ligando, la molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1 (GlyCAM-1: *Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*) localizada en células endoteliales especializadas del tejido linfático. Además, las células T vírgenes pueden migrar específicamente a la mucosa del intestino a través de la interacción entre la integrina $\alpha_4\beta_7$, asociada a células T y la molécula de adhesión celular adresina 1 (MAdCAM-1: *mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) de la célula endotelial de la mucosa (Abbas, 2004).

La decisión de cuál es el fenotipo que las **células T** van a adoptar en respuesta a una estimulación se toma en el primer encuentro con el antígeno, y dependerá de éste y de las señales coestimuladoras que intervengan en su presentación el que se diferencien en linfocitos T colaboradores (Th, *T helper*) CD4⁺ o citotóxicos CD8⁺ efectores o de memoria. La respuesta inmunológica requiere la unión del TCR con el antígeno asociado al MHC en presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas. Dentro de estos coestimuladores, se encuentran el B7-1 (CD80) y el B7-2 (CD86) de DCs que son reconocidos por el CD28 de linfocitos T. Además, los linfocitos T activados expresan una molécula denominada ligando de CD40 (CD40L) que se une al CD40 expresado por las APCs y transmite una serie de señales que potencian la expresión de los coestimuladores B7 en las APCs. Ante estas señales activadoras, se provoca una expansión clonal de las células T, aumentando la proliferación a través de la vía del factor nuclear de células T activadas (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*). Cuando las células están en reposo, el NFAT se encuentra fosforilado en el citoplasma, y tras una estimulación por ligandos que elevan el calcio intracelular (Ca²⁺), se activa la calmodulina y a su vez, el complejo calmodulina/Ca²⁺ activa a la calcineurina. La calcineurina activada, desfosforila al NFAT, y este proceso conduce a la exposición de las secuencias de localización nuclear y a la entrada del factor al núcleo, permitiendo la transcripción de múltiples genes, entre los cuales se encuentra la IL-2, citocina involucrada en la expansión clonal de linfocitos T (Rao y col., 1997).

En esta situación, las células se diferencian y adquieren un fenotipo **Th1, Th2 o Th17**, que se distinguen por las citocinas que producen en respuesta a la activación, y en consecuencia en su función (Figura 2). Las células Th1 producen cantidades considerables de IL-2, interferón γ (IFN γ) y TNF α , las células Th17 dan lugar a secreción de IL-17, IL-6 y TNF α , mientras que las células Th2 producen de forma característica IL-4, IL-5 e IL-13 (Shih y Targan, 2008; Sartor, 1997). El ambiente de citocinas al que las células T vírgenes están expuestas es el factor determinante para la diferenciación hacia el fenotipo Th1, Th17 o Th2. La IL-12 junto con la IL-18, ambas producidas por APCs, inducen diferenciación hacia Th1; la IL-23 producida por macrófagos y DCs, lleva a una diferenciación hacia células Th17; por otro lado, la IL-4, producida por células NK, mastocitos, basófilos y células CD4⁺ maduras, conduce a la diferenciación hacia Th2 (Shih y Targan, 2008). Las

células Th1 y Th2 se inhiben mutuamente a través de las citocinas liberadas, de forma que la diferenciación de las células productoras de citocinas Th2 es inhibida por $\text{IFN}\gamma$, mientras que la activación de las células Th1 se encuentra bloqueada por IL-10 (Monteleone y col., 2002).

Existe otra población de células T CD4^+ denominadas reguladoras (Tr), **Th3 y Tr1**, productoras de citocinas inmunomoduladoras. Las células Th3 producen principalmente $\text{TGF}\beta$, mientras que las Tr1 secretan IL-10, siendo ambas citocinas claves en el control de la inflamación al controlar la activación de otros tipos celulares (Allez y Mayer, 2004). Estudios recientes sugieren que el $\text{TGF}\beta$ es crucial en el equilibrio entre la respuesta proinflamatoria Th17 y la antiinflamatoria Tr1 (Mangan y col., 2006).

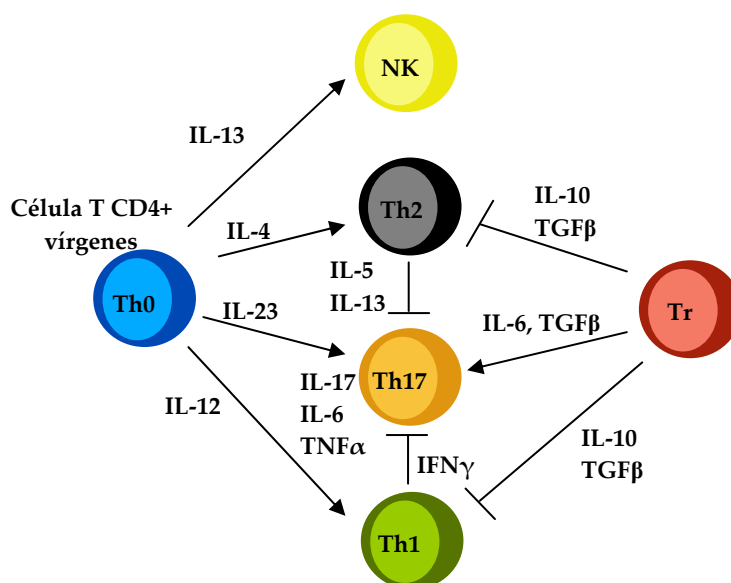


Figura 2: Diferenciación de los subtipos de células T. Después de la estimulación, las células T CD4^+ se diferencian hacia 3 subtipos: Th1, Th2 y Th17. La IL-12 induce la formación de $\text{IFN}\gamma$ por las células Th1, la IL-23 promueve el desarrollo de células T CD4^+ Th17, y la IL-4 lleva a diferenciación de células Th2. Las células T reguladoras suprimen la diferenciación y función de células Th1 y Th2. Sin embargo, en la presencia de IL-6, el $\text{TGF}\beta$ derivado de las células reguladoras puede inducir la diferenciación de las células Th17.

Por tanto, el que las células T produzcan un tipo de respuesta u otra dependerá de los diferentes estímulos de activación, originándose así fenómenos de alergia, cuando se produce activación de células Th2 fundamentalmente (Larché, 2006), o procesos inflamatorios cuando se da lugar a activación de las células T de tipo Th1/Th2 (Fuss y col., 1996). La respuesta tipo Th17 está implicada tanto en procesos inflamatorios como alérgicos (Asarch y col., 2008; Oboki y col., 2008; Tesmer y col., 2008) y las células T reguladoras intentarán contrarrestar todos estos fenómenos.

Los mecanismos principales de inducción de tolerancia oral son la anergia clonal, la deleción clonal y la inducción de células reguladoras. Si los linfocitos T reconocen al antígeno sin coestimulación, son incapaces de responder a dicho antígeno. Es el proceso denominado **anergia clonal**. Esta anergia también puede inducirse si los linfocitos T emplean CD152, un receptor inhibidor de las moléculas B7, para reconocer los coestimuladores presentes en las APCs mientras se produce el reconocimiento antigénico. Como consecuencia de esta interacción, se provoca una inhibición de la expresión de IL-2 y de la proliferación de células T, dando lugar a una atenuación de la respuesta inmunológica (Janeway y Bottomly, 1994).

Otro proceso de tolerancia oral es la **delección clonal**, que se provoca cuando la respuesta inmunológica se ha desarrollado y el antígeno ha sido eliminado. Entonces, la producción de IL-2 cae, llevando a la apoptosis de la mayoría de las células efectoras excepto una pequeña población de linfocitos de memoria (Akbar y col., 1996).

Finalmente, la tolerancia también está mediada por las **células T reguladoras**, que como se ha dicho anteriormente, producen altos niveles de TGF β e IL-10, y son capaces de contrarrestar respuestas inmunes perjudiciales en la mucosa. Ambas son capaces de inhibir la síntesis de citocinas y mediadores proinflamatorios derivados de células Th1 y/o macrófagos (Leach y col., 1999; Strober y col., 1997).

Por último, las células B también participan en la respuesta inmunitaria adaptativa de las mucosas. Cuando las DCs presentan el antígeno, los linfocitos B migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, donde maduran a células plasmáticas y luego, se desplazan hasta la lámina propia intestinal para diferenciarse y secretar IgA dimérica (Roux y col., 1981; Kraehenbuhl y col., 1992). Estas IgA bloquean las uniones de los antígenos al epitelio y previenen su internalización; además, son capaces de aglutinar bacterias y virus en unos grandes complejos que son atrapados en la barrera de moco y eliminados en las heces. Por tanto, la IgA protegerá al epitelio intestinal de la translocación de antígenos hacia la lámina propia, participando también en la inmunidad innata, e intercalará estas funciones con la respuesta inmunitaria adaptativa.

Los mecanismos de protección y algunos de los fenómenos que tienen lugar en el sistema inmunitario de las mucosas quedan resumidos en la figura 3.

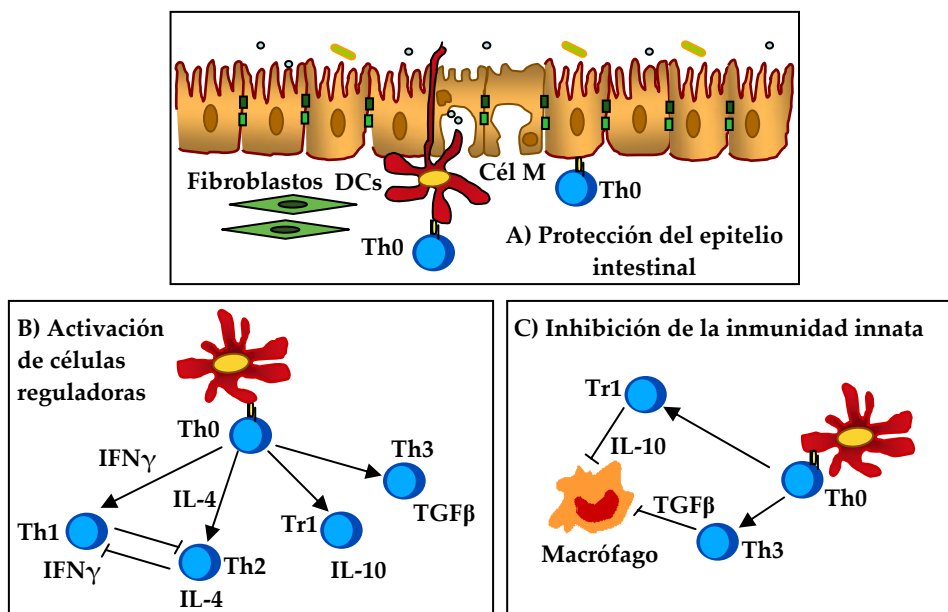


Figura 3: Sistema inmunitario de las mucosas. En el intestino sano, el epitelio protege al organismo de la entrada de agentes externos (A). Las DCs procesan constitutivamente los productos bacterianos y migran a los nódulos linfáticos mesentéricos, dando lugar a la activación de células T reguladoras (Tr1 y Th3) (B). Estas células se dirigen a la lámina propia donde secretan citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF β), provocando una inhibición de la inmunidad innata (C).

3.1.2.- Alteración del sistema inmunológico. Enfermedad inflamatoria intestinal

Por algún motivo que se desconoce, los pacientes de EII no son capaces de mantener el equilibrio de regulación del sistema inmunológico intestinal, provocándose una respuesta exagerada e incontrolada, que conduce a un daño del tejido con inflamación severa y crónica, donde participan numerosas células inmunológicas, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. La EC y la CU son un claro ejemplo de esta situación, y se cree que son el resultado de una respuesta inapropiada y mantenida del sistema inmune de la mucosa a la microbiota entérica normal en un individuo genéticamente susceptible, probablemente facilitada por alteraciones en la barrera epitelial intestinal y mediada principalmente por células T de la mucosa, con pérdida de la tolerancia oral frente a esta microbiota endógena (Podolsky, 2002). Podríamos dividir el proceso en una serie de pasos:

3.1.2.1.- Alteración de la barrera epitelial:

En la EII, la integridad de la barrera epitelial está comprometida, lo que permite el paso de los antígenos lumenales y la microbiota a la lámina propia, contribuyendo a la

perpetuación del proceso inflamatorio (Plevy, 2002). Así, se ha demostrado la existencia de una permeabilidad intestinal incrementada en pacientes con EII (Soderholm y col., 2002; Teahon y col., 1992), y se ha descrito como un factor temprano predisponente a la patogénesis de esta enfermedad. El epitelio intestinal puede participar en la iniciación de la respuesta inmunológica por medio de varios mecanismos:

a.- El aumento de la permeabilidad, intensifica la absorción de antígenos, lo que llevaría a una exagerada estimulación del sistema inmune intestinal (Wyatt y col., 1993). La alteración de la permeabilidad de la barrera epitelial puede ser debida a una serie de mecanismos como niveles aumentados de proteinasas, que interrumpen las uniones estrechas entre células epiteliales (Chin y col., 2003), o interacciones de microorganismos con células epiteliales intestinales (Johansen y col., 1989).

b.- Alteraciones de la capa de moco (Corfield y col., 2001; Shirazi y col., 2000), del funcionamiento de ciertos transportadores de células epiteliales intestinales (Merlin y col., 2001), la disminución de la expresión de defensinas (Cobrin y Abreu, 2005) y de la producción de IgA (Brandtzaeg y col., 2006) han sido relacionados con la EII.

c.- Las personas con EII poseen alteraciones en la respuesta innata en la capa epitelial. De hecho, los individuos sanos expresan TLR3 y TLR5 en células epiteliales, y sin embargo, TLR2 y TLR4 apenas son detectables. Pero, por otra parte, TLR3 está significativamente disminuido en la EC activa, aunque no en la CU, y TLR4 se encuentra muy aumentado en ambas enfermedades (Cario y col., 2000; Yamamoto-Furusho y Podolsky, 2007). Las células epiteliales también expresan TLR9, el cual permite responder directamente al DNA bacteriano, dando lugar a la secreción de IL-8, agente quimiotáctico de granulocitos. Por todo esto, el epitelio intestinal puede actuar como transductor de señales inflamatorias mediante liberación de citocinas, quimiocinas y otras sustancias proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-8 o $IFN\gamma$, aumentando la permeabilidad paracelular de la mucosa intestinal (Kagnoff y Eckmann, 1997; Madara y Stafford, 1989; Mullin y Snack, 1990).

d.- Además, las células epiteliales intestinales expresan constitutivamente moléculas del MHC de clase II (Hershberg y col., 1998), pudiendo actuar por tanto como APCs no clásicas presentando antígenos a las células T (Mayer y col., 1991). A diferencia de las APCs clásicas, estas células normalmente activan selectivamente a células T supresoras $CD8^+$, jugando un papel en la supresión local de la respuesta inmunológica. Sin embargo, en los pacientes con EII, las células epiteliales adquieren un fenotipo activado con incremento de la expresión del MHC en presencia de citocinas proinflamatorias como $IFN\gamma$ o $TNF\alpha$ (Cruickshank y col., 2004), llevando a cabo una presentación del antígeno de forma alterada, y provocando una activación de las células T colaboradoras $CD4^+$ más que de las supresoras $CD8^+$ (Mayer y Eisenhardt, 1990).

3.1.2.2.- Alteración de las células del sistema inmunológico:

En la EII, se rompen todos los mecanismos de tolerancia oral, la anergia y delección clonal, y además, se ha observado un incremento de la respuesta Th1, Th17 y/o Th2 que inhibe la respuesta de células reguladoras, provocando una inflamación intestinal crónica (Veldhoen y col., 2006).

Así, el reconocimiento antigénico y el procesamiento llevado a cabo por las APCs se muestran alterados en la EII. En los pacientes con EC y CU, se ha comprobado un aumento de la expresión de CD80, CD86 y CD40 en la superficie de las DCs (Stagg y col., 2003), lo que lleva a un incremento de la activación, maduración y reconocimiento antigénico por parte de estas APCs, dando lugar también a la producción de IL-12, y provocando la diferenciación de las células T hacia Th1. Además, estudios *in vitro* y en animales sugieren que las DCs reconocen incorrectamente a las bacterias de la microbiota intestinal induciendo una respuesta Th1 y Th17. Esto podría ser debido a una alteración o aumento de la respuesta de los receptores de reconocimiento. Un ejemplo de ello es el incremento de la expresión de TLR4 observado en DCs mieloides (Hart y col., 2005).

Por otra parte, ha sido determinada una alta resistencia a la apoptosis de células T de la mucosa de pacientes con EII (Ina y col., 1999) como consecuencia de alteraciones en las vías de apoptosis como la activación del receptor Fas, de CD95, o la liberación del citocromo C mitocondrial (Peppelenbosch y van Deventer, 2004). Este fenómeno también parece estar asociado a un incremento en el cociente de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la molécula pro-apoptótica Bax. Además, existen evidencias de que la activación de STAT3 (STAT, *signal transducers and activator of transcription*) por la interacción IL-6/IL-6R contribuye a rescatar células T residentes del proceso de apoptosis, prolongando su ciclo vital y favoreciendo la acumulación de células T. De hecho, la administración de un anticuerpo contra el receptor de IL-6, incrementa la apoptosis de las células T de la lámina propia y suprime la colitis en diversos modelos animales de EC (Atreya y col., 2000).

En cuanto a las células T vírgenes que entran en contacto con el antígeno, cuando se produce su activación y proliferación, se despojan de sus L-selectinas, incrementándose entonces la expresión en superficie de moléculas de adhesión adicionales tales como la integrina $\alpha_L\beta_2$ (antígeno asociado a la función leucocitaria 1, LFA-1, *leukocyte-function-associated antigen 1*) integrina $\alpha_4\beta_1$ (antígeno de activación tardía 4, VLA-4, *very late activation antigen 4*) y CD44 (Abbas, 2004). Este patrón de migración constante es mediado por la interacción de las moléculas de adhesión mencionadas con la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*), la molécula de adhesión intercelular 1 y 2 (ICAM-1, -2, *intercellular adhesion molecule*), y el hialuronato, respectivamente (Abbas, 2004). El resultado de la migración hacia la zona dañada será la síntesis y liberación de citocinas que estimulan a los macrófagos para que secreten TNF α , IL-1 β e IL-6.

Finalmente, los linfocitos B también desarrollan un papel esencial en la respuesta inmunológica adquirida y en la innata. Se ha demostrado un importante infiltrado de células plasmáticas en la lámina propia intestinal en pacientes con EII (Kett y col., 1987). Casi el 60-80% de los enfermos tienen anticuerpos de clase inmunoglobulina G (IgG), en el suero o la mucosa (Rüthlein y col., 1992), contra diversos antígenos órgano-específicos o no, frente a antígenos epiteliales del colon (Hibi y col., 1990), a componentes perinucleares de neutrófilos y a autoantígenos como la tropomiosina epitelial (Onuma y col., 2000), sugiriendo una mayor respuesta de tipo humoral (Th2) en este tipo de enfermedades (Monteleone y col., 2002). La sobreproducción de IgG en la mucosa intestinal, particularmente de IgG1 en CU y de IgG2 en EC (Furrie y col., 2004) podría ser relevante en la patogénesis de la EII, por la activación del complemento, y la liberación de mediadores proinflamatorios como la prostanglandina E₂ (PGE₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂), que son capaces de amplificar y perpetuar el proceso inflamatorio. Además, se conoce que la inmunodeficiencia de IgA en humanos puede estar asociada con alteraciones inmunológicas como la CU (Brandtzaeg y col., 2006).

El resultado final de la respuesta inmunológica que tiene lugar en el colon es el acúmulo principalmente de linfocitos en la mucosa intestinal y la producción de múltiples mediadores proinflamatorios, incluyendo, además de los ya mencionados, los radicales derivados del oxígeno y del nitrógeno, el factor activador de plaquetas (PAF, *platelet activating factor*) y el leucotrieno B₄ (LTB₄). Muchos de ellos son quimiotácticos y provocan el reclutamiento de más células del sistema inmunológico, perpetuando la inflamación y convirtiéndola en crónica.

3.1.2.3.- Patrón de citocinas en la EII.

La respuesta exagerada e incontrolada que se origina en la EII viene determinada por un patrón de citocinas diferente en la EC y en la CU. Los datos indican que en la EC tiene lugar una reacción de hipersensibilidad mediada por células T, mientras que en la CU parece predominar el incremento de la inmunidad de tipo humoral (Tabla 2).

Aunque los modelos animales de EII muestran una clara polarización hacia respuestas de tipo Th1 o Th2 (ver capítulo 2), es menos clara la situación en la enfermedad humana. Se ha puesto de manifiesto que el perfil de citocinas producidas en la EC es predominantemente del **tipo Th1**, y se encuentra caracterizada por la producción de **IL-2**, **IFN γ** , **IL-12** y **TNF α** , mediadores esenciales en la inflamación intestinal. De hecho, los linfocitos T de la lámina propia aislados de la mucosa inflamada de pacientes de EC contienen cantidades apreciables de ARNm del IFN γ y espontáneamente producen mayor cantidad de IFN γ *in vitro* que los linfocitos de individuos control (Fais y col., 1991; Fuss y col., 1996). Un único estudio ha demostrado un aumento de IL-4 en EC recurrente (MacDonald y col., 2000). Algunos fenómenos inmunológicos observados en el tejido inflamado de la EC pueden estar relacionados con los efectos de la citocinas Th1. El aumento de IFN γ detectado en la EC puede asimismo facilitar la activación de macrófagos

residentes, activando la producción de IL-12 e IL-18 e induciendo la diferenciación y activación de células Th1, en un ciclo que se autoalimenta dada la producción de mayores cantidades de IFN γ , IL-2, IL-6, TNF α , IL-1 β por las células Th1 (MacDonald y col., 2000). Además, diversos estudios en modelos animales de EII corroboran el papel de la IL-12 en la lesión intestinal mediada por células Th1. En ratones con colitis inducida por ácido 2, 4, 6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), la inhibición de la señal de IL-12 induce la apoptosis de las células Th1 a través de un mecanismo mediado por Fas, apoyando el concepto de que la resistencia de las células Th1 a la apoptosis es patogénicamente relevante en la EC (Fuss y col., 1999). La participación de IFN γ e IL-12 en la EC se pone de manifiesto con la administración de anticuerpos a estos pacientes frente a estas dos citocinas, donde ambos suprimen el desarrollo de la enfermedad (Hommes y col., 2006; Mannon y col., 2004).

Tabla 2. Perfil de citocinas en la enfermedad inflamatoria intestinal

Respuesta inmunitaria innata			Respuesta inmunitaria adaptativa		
Citocinas	EC	CU	Citocinas	EC	CU
IL-1 β	A	A	IL-5	N	A
IL-6	A	A	IL-13	N	A
IL-8	A	A	IL-17	A	A
IL-12	A	N	IL-21	A	N
IL-18	A	A	IFN γ	A	N
IL-23	A	N			
IL-27	A	N			
TNF α	A	A			

A: Aumento N: Normal

Por otra parte, en la CU parece predominar una respuesta de **tipo Th2** (Podolsky, 2002) y dependiente de anticuerpos, asociada a una marcada liberación de **IL-5, IL-13 e IL-10**. La expresión de IFN γ en la CU es menor que en la EC y, de hecho, similar al de los controles sanos. Los linfocitos T en la CU liberan gran cantidad de IL-5 tras su estimulación mediante la vía CD3/CD28, y esta citocina es importante para facilitar la respuesta de anticuerpos. No obstante, a pesar del aumento de secreción de IL-5, estas mismas células segregan 50 veces más IFN γ . Además, en la CU se incrementa el número de linfocitos NK produciéndose IL-13 e IL-5 (Fuss y col., 2004), lo que tiende a ampliar y reforzar la respuesta, causando perpetuación de la inflamación. Estos linfocitos NK se consideran células NK “no clásicas” ya que expresan un TCR que reconoce antígenos en asociación con CD1d, una molécula de MHC de clase I presente en las DCs y células epiteliales (Kronenberg y Gapin, 2002).

En ambas enfermedades, CU y EC, se produce una síntesis elevada de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α . No está claro qué clase de mediadores influyen en este fenómeno, pero parece ser que el factor de transcripción NF κ B regula la expresión de IL-1 β , TNF α , IL-18 en linfocitos, monocitos y células del epitelio intestinal, y su actividad se encuentra aumentada en la mucosa de pacientes con enfermedad activa (Neurath y col., 1998). La **IL-1 β** y el **TNF α** comparten muchas de sus propiedades proinflamatorias, siendo críticas para la amplificación de la inflamación de la mucosa en la EII (Ardizzone y Porro, 2002). Por ejemplo, estas citocinas a nivel local provocan la síntesis de metaloproteinasas de la matriz, una familia de endopeptidasas, a través de la estimulación de los fibroblastos del intestino, con lo cual se renueva lentamente la matriz y tiene lugar un daño tisular (Monteleone y col., 2002). La contribución del TNF α en la patogénesis de la EII ha quedado ampliamente demostrada con la utilización de los anticuerpos anti-TNF α (infliximab, adalimumab) como terapia para combatir la enfermedad. Aunque, en el caso del infliximab, se ha demostrado que más que bloquear al TNF α , su acción terapéutica se ejerce principalmente por inducir apoptosis en linfocitos T activados de forma crónica en el colon (ten Hove y col., 2002), y por tanto, actuaría favoreciendo la delección clonal.

Además, el TNF α y la IL-1 β podrían producir indirectamente cambios en la morfología del intestino a través de sus efectos sobre la producción de factores de crecimiento por células del estroma, de hecho, el factor de crecimiento de queratinocitos se encuentra sobreexpresado en pacientes con EII, pudiendo ser responsable de la hiperplasia de las células de la cripta observada en estas condiciones (Bajaj-Elliott y col., 1998).

Otra citocina implicada en la respuesta inflamatoria es la **IL-17**, que induce la producción de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, TNF α , la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide sintase*), metaloproteasas y quimiocinas (Kolls y Linden, 2004). El número de células IL-17⁺ en la mucosa inflamada se encuentra incrementado en pacientes con EII activa, siendo más elevado en pacientes con EC en comparación con los pacientes de CU. En particular, las células IL-17⁺ en pacientes con CU están localizadas principalmente en lámina propia, sin embargo, en pacientes con EC se encuentran en la capa submucosa y muscular (Fujino y col., 2003). IL-23 promueve el desarrollo de las células T CD4⁺ productoras de IL-17, y también se ha observado un incremento de esta citocina en ambas patologías (Fujino y col., 2003; Kobayashi y col., 2008).

Por último, se ha demostrado que la actividad de TGF β es anormal en la mucosa de enfermos de EII como consecuencia de una producción aumentada de SMAD7, un inhibidor de la transducción de la señal de TGF β (Monteleone y col., 2001). Por otra parte, la **IL-10** también se ve afectada en la EII, de hecho los pacientes con CU y EC tienen incrementados los niveles de IL-10 (Kucharzik T y col., 1995), pero estos valores de la citocina antiinflamatoria no son efectivos para controlar el aumento de citocinas proinflamatorias que se origina en la EII y que desarrolla la inflamación crónica.

Similarmente, se ha observado que los ratones deficientes en IL-10 (IL-10^{-/-}) manifiestan enterocolitis, con activación de células Th1, macrófagos y liberación de mediadores proinflamatorios como TNF α , IL-12, IL-6, IL-8, IFN γ , y MHC de clase II (Kühn y col., 1993); y la administración de IL-10 recombinante o la terapia génica con IL-10 han mostrado una mejoría de la colitis experimental (Lindsay y col., 2001).

Por todo lo descrito anteriormente, se puede afirmar que la EII consiste en una alteración del sistema inmunológico como resultado de la interacción entre distintos tipos celulares y mediadores inflamatorios de forma que se produce una respuesta exacerbada (Figura 4).

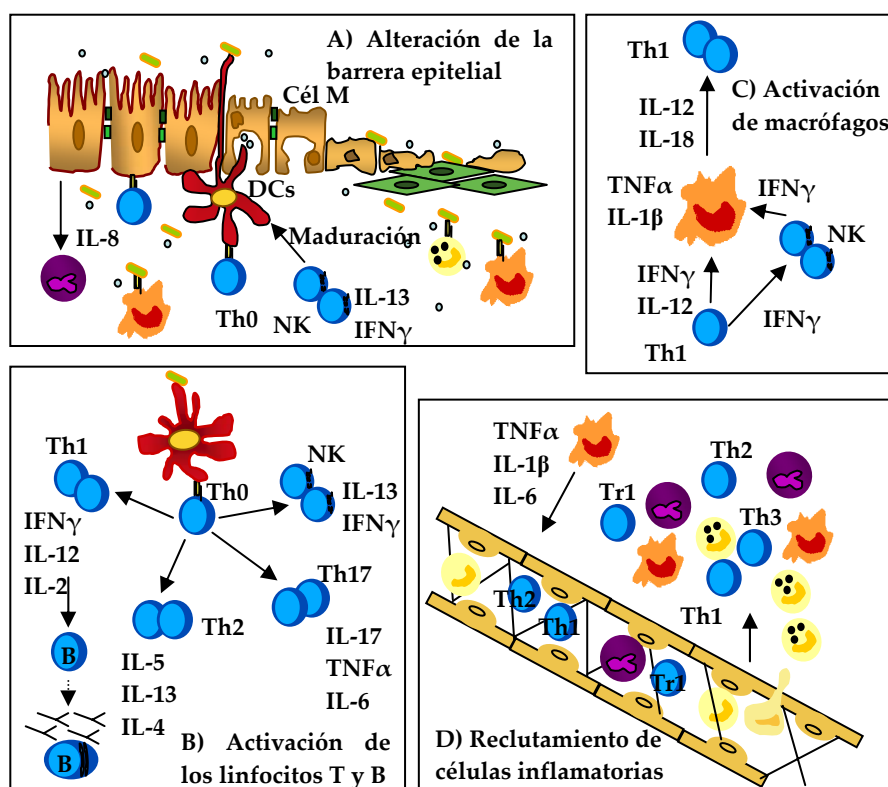


Figura 4: Patogénesis de la EII. Los antígenos bacterianos acceden al epitelio intestinal cuya permeabilidad se encuentra alterada (A). Las APCs (DCs, macrófagos, células epiteliales) presentan los antígenos a las células T CD4⁺ residentes, originando su diferenciación en células Th1, Th2 y Th17 (B), con la consiguiente liberación de citocinas proinflamatorias que producen la activación de macrófagos (C). Además, desde el torrente sanguíneo son reclutados polimorfonucleares, neutrófilos, y mastocitos (D) y todas estas células inmunitarias involucradas liberan una serie de mediadores que colaboran con el proceso inflamatorio.

3.2.- Factores genéticos implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal

Son muchas las evidencias de la contribución de los genes en la EII. Se sabe que los parientes en primer grado de los enfermos de Crohn o CU tienen una probabilidad mucho mayor que la población general de presentar estas enfermedades. La evidencia más sólida de lo anterior ha sido la observación de una concordancia muy alta en la frecuencia de aparición de la enfermedad en pares de gemelos (44%) comparada con un 3,8% en mellizos (Orholm y col., 2000), existiendo un riesgo mayor en EC que en CU (Gaya y col., 2006). Esto sugiere que los factores genéticos determinan el curso de la patología. Hugot y col. (1996) y Ogura y col. (2001) identificaron el primer gen de susceptibilidad para la EC, el NOD2/CARD15 (ver apartado 3.1.1). Las mutaciones que ocurren en este gen conducen a una apoptosis anormal y a una pérdida de la activación del factor de transcripción NF κ B, que influye en la patogénesis de la EII (Ogura y col., 2001; Inohara y col., 2003). Estudios en ratones con el gen NOD2 mutado muestran que la ausencia de expresión de NOD2 puede llevar a una señal alterada de TLR y a un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos, o a una reducción de la capacidad para activar a NF κ B y a una disminución de la producción de proteínas antimicrobianas (α -defensinas) por las células epiteliales (Watanabe y col., 2004). Por todo ello, el estímulo antigénico no puede ser controlado.

Muy recientemente se han identificado nuevos genes asociados con la EC. Uno de ellos codifica para el transportador de cationes orgánicos, OCTN, y sus mutaciones afectan a la capacidad de los transportadores para bombear xenobióticos y aminoácidos a través de las membranas (Peltekova y col., 2004). Otro gen, DLG5, es miembro de la familia de la guanilato kinasa (Stoll y col., 2004) y está implicado en el mantenimiento de la integridad epitelial. Ambos genes son importantes en la permeabilidad epitelial, y un fallo en su función podría provocar una exposición inapropiada del sistema inmunológico de la mucosa a productos bacterianos. Otras mutaciones observadas en los últimos años es la del gen del receptor de IL-23, que podría proteger frente a la EC (Duerr y col., 2006).

Por otra parte, parece que hay una asociación entre CU y el gen MDR1 (MDR1, *multidrug resistance 1*) y su producto, la P-glicoproteína, implicada en el transporte de xenobióticos, incluyendo productos bacterianos, susceptibilidad asociada a una expresión alterada de la P-glicoproteína (Ho y col., 2006).

3.3.- Factores ambientales involucrados en la enfermedad inflamatoria intestinal

Existen bastantes factores ambientales reconocidos como de riesgo para la EII, algunos de ellos son el tabaco, la dieta, los fármacos, la situación geográfica y social, el estrés y los microorganismos (Danese y col., 2004).

En los últimos años se ha ido incrementando la importancia atribuida a la función de los **factores microbiológicos**, ya que aproximadamente 2×10^{14} bacterias residen en el tracto gastrointestinal, lo que representa un extraordinario desafío para el sistema inmunitario intestinal, que tiene que llevar a cabo un equilibrio apropiado entre respuesta a patógenos y tolerancia. Durante muchos años se ha tratado de establecer una relación entre un agente infeccioso específico y la EII. Se han propuesto *Lysteria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, como los responsables de la EC y CU, pero no se han obtenido resultados concluyentes. Sin embargo, actualmente se considera que la microbiota intestinal es fundamental en el desarrollo de este tipo de patologías, así diferentes estudios han comprobado que puede ser objetivo del sistema inmunitario, desencadenando inflamación (Guarner y Malagelada, 2003). De hecho, se ha comprobado la eficacia clínica del uso de antibióticos de amplio espectro en algunos grupos de pacientes con EII (Perencevich y Burakoff, 2006). Además, las investigaciones desarrolladas en los últimos diez años muestran como en diversos modelos animales de EII, incluyendo animales transgénicos (HLA-B27) y *knock out* (IL-10), la enfermedad no se manifiesta en ambiente libre de patógenos, pero sí en presencia de microbiota normal (Rath y col., 1996).

Por otro lado, la **dieta** ejerce una influencia destacable en la EII, como cabe esperar de una enfermedad que afecta al tubo digestivo. Se ha observado que el consumo de azúcar refinado puede ser un factor de riesgo para la EC, pero no para la CU (Sonnenberg, 1988) y el consumo de grasa ha sido asociado con la CU, mientras que el consumo de fruta, vegetales y fibra parece descender el riesgo de EII (Reif y col., 1997). Los anticonceptivos orales (Corrao y col., 1998) y los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) (Hanauer y Sandborn, 2001) son los dos principales grupos de **fármacos** que han sido estudiados por una posible relación etiológica entre su uso y el mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. En lo que se refiere al factor **tabaco**, éste presenta un llamativo efecto contrario en la EC y la CU, siendo un importante factor de riesgo para la EC, aumentando la frecuencia de recidivas y la necesidad de cirugía (Rubin y Hanauer, 2000) y, sin embargo, mostrándose como un factor protector para la CU (Bridger y col., 2002). En distintos modelos experimentales de colitis, se observa como, tras la administración de nicotina, la colitis mejora, coincidiendo con una disminución local de la concentración de varias de las citocinas proinflamatorias (Sher y col., 1999). Por último, el **estrés** está también asociado con la EII, pero más como un agente modificador que inductor. Así, existen estudios en animales que relacionan el estrés psicológico duradero con un aumento de exacerbación de

los síntomas de la enfermedad (Levenstein y col., 2000). Probablemente esté implicada una compleja interacción entre factores nerviosos, endocrinos e inmunes (Hart y Kamm, 2002).

Referencias

- Abbas** AK y Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Madrid: Elsevier, 2004.
- Abreu** MT, Fukata M, Arditi M. TLR signalling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174:4453-4460.
- Aderem** A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-787.
- Akbar** AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayoitidis P, Pilling D, Bofill M, Krajewski S, Reed JC, Salmon M. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* 1996; 26:294-299.
- Allez** M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10:666-676.
- Ardizzone** S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252:475-496.
- Arin Letamendia** A, Borda Celaya F, Burusco Paternain MJ, Prieto Martínez C, Martínez Echeverría A, Elizalde Apestegui I, Laiglesia Izquierdo M, Macias Mendizábal E, Tamburri Moso P, Sánchez Valverde F. High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31:111-6.
- Asarch** A, Barak O, Loo DS, Gottlieb AB. Th17 cells: A new therapeutic target in inflammatory dermatoses. *J Dermatolog Treat* 2008; 14:1-9.
- Atreya** R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6:583:588.
- Bajaj-Elliott** M, Poulosom R, Pender SL, Wathen NC, MacDonald TT. Interactions between stromal cell--derived keratinocyte growth factor and epithelial transforming growth factor in immune-mediated crypt cell hyperplasia. *J Clin Invest* 1998; 102:1473-1480.
- Bjornsson** S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:31-38.
- Berrebi** D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003; 52:840-846.
- Bridger** S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51:21-25.
- Buisine** MP, Desreumaux P, Leteurtre E, y col. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 2001; 49:544-551.
- Cario** E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68:7010-7017.
- Chan** VW, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 1999; 93:3610-3616.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **2006**; 354:610-621.

Cehade M. and Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* **2005**; 115:3-12.

Chin AC, Vergnolle N, MacNaughton WK, Wallace JL, Hollenberg MD, Buret AG. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**; 100:11104-11109.

Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* **2005**; 206:277-295.

Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* **2001**; 6:D1321-D1357.

Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D. 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**; 27:397-404.

Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cells mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* **2004**; 53:678-684.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* **2004**; 3:394-400.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A

basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* **2001**; 193:827-838.

Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* **2006**; 72:1102-1113.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **2006**, 314:1461-1463.

Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, Di Marco P, Boirivant M, Dianzani F, Torsoli A. 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**; 32:403-407.

Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Koval J, Wong CJ. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's study group investigators. *N Engl J Med* **2000**; 342:1627-1632.

Fiocchi C. The normal intestinal mucosa: a state of "controlled inflammation". En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers **2003**; 101-120.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **2003**; 52:65-70.

Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut* **2004**; 53:91-98.

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **2004**; 113:1490-1497.

Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **1999**; 117:1078-1088.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas Ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* **1996**; 157:1261-1270.

Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* **2000**; 47:49-56.

Gassull MA, Cabré E. Clinical guidelines for the diagnosis of IBD. En: *Management of inflammatory bowel disease*. Barcelona: Prous Science **1994**; 7-12.

Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* **2006**; 367:1271-1284.

Geboes K. The role of histological studies in IBD. En: Gassull MA, Obrador A, Chantarr C, eds. *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science **1994**; 45-66.

Geller SA. Pathology of inflammatory bowel disease: a critical appraisal in diagnosis and management. En: Targan SR, Shanagan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins **1994**; 336-351.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J y col. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **2003**; 278:8869-72.

Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2003**; 17:793-804.

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna

JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **2002**; 277:41701-41705.

Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* **2001**; 96:635-643.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **2005**, 129:50-65.

Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther* **2002**; 16:2017-2028.

Hershberg RM. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2002**; 283:G833-G839.

Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* **1998**; 102:792-803.

Hibi T, Ohara M, Toda KK, Hara A, Ogata H, Iwao Y, Watanabe N, Watanabe M, Hamada Y, Kobayashi K, Aiso S, Tsuchiya M. In vitro anticolon antibody production by mucosal or peripheral blood lymphocytes from patients with ulcerative colitis. *Gut* **1990**; 31:1371-1376.

Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet* **2006**; 15:797-805.

Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zákuciová M, D'Haens G, Van Asshe G, Ba S, Lee S, Pearce T. Fontolizumab, a humanised anti-interferon

gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **2006**; 55:1131-1137.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **2003**; 52:144-151.

Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **2002**; 122:7-14.

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Fak PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **2001**; 291:881-884.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **1996**; 379:821-823.

Ina K, Itoh J, Fukushima K et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* **1999**; 163:1081-1090.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **1999**; 274:14560-14567.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **2003**; 278:5509-5512.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* **2002**; 5:76-80.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor

control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2004**; 5:987-995.

Janeway CA Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **1994**; 76:275-285.

Johansen K, Stintzing G, Magnusson KE, Sundqvist T, Jalil F, Murtaza A, Khan SR, Lindblad BS, Mollby R, Orusild E, et al. Intestinal permeability assessed with polyethylene glycols in children with diarrhea due to rotavirus and common bacterial pathogens in a developing community. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1989**; 9:307-313.

Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **1997**; 100:6-10.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **2000**; 18:621-663.

Kelly D, Campbell JL, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Petterson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and Rel A. *Nat Immunol* **2004**; 5:104-112.

Kerhavarzian A, Banan A, Farhadi A et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **2003**; 52:720-728.

Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P. Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* **1987**; 93:919-924.

Klotz U. The role of aminosalicylates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Pharmacol* **2000**; 56:353-362.

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe KI, Hibi T. IL-23

differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **2008**.

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **2004**; 21:467-476.

Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. *Trends Cell Biol* **1992**, 2:170-174..

Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* **2002**; 2:557-568.

Kucharzik T, Lügering N, Rautenberg K, Luger A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* **2000**; 915:171-183.

Kucharzik T, Stoll R, Lügering N, and Domschke W. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* **1995**; 100:452-456.

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **1993**; 75:263-274.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* **2004**; 82:434-448.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **2005**; 201:233-240.

Larché M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* **2006**; 18:745-750.

Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, Powrie F, Rennick DM. The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* **1999**; 27:123-133.

Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G,

Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95:1213-1220.

Levine DS. Clinical features and complications of Crohn's disease. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins **1994**; 296-319.

Lichtman SN, Balfour Sartor R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: clinical aspects and natural history. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins **1994**; 317-335.

Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Hodgson HJ, Brennan FM. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol* **2001**; 166:7625-7633.

Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* **2000**; 46:336-343.

MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* **2000**; 51:2-9.

Mach J, Hsieh T, Hsieh D, Grubbs N, Chervonsky A. Development of intestinal M cells. *Immunol Rev* **2005**; 206:177-189.

Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* **1989**; 83:724-727.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **2006**; 441:231-234.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO,

Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's disease study group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **2004**; 351:2069-2079.

Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **1990**; 86:1255-1260.

Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1991**; 100:3-12.

Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, Hediger MA, Madara JL. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class I molecules. *Gastroenterology* **2001**; 120:1666-1679.

Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **2001**; 108:601-609.

Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* **2002**; 50:III60-III64.

Mullin JM, Snock KV. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer Res* **1990**; 50:2172-2176.

Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* **1998**; 43:856-860.

Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int* **2008**; 57:121-134.

Obrador A, Riera J. Definitions. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C, eds. *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science **1994**; 1-6.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **2001**; 276:4812-4818.

Onuma EK, Amenta PS, Ramaswamy K, Lin JJ, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): a predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5. *Clin Exp Immunol* **2000**; 121:466-471.

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* **2000**; 35:1075-1081.

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **2004**; 36:471-475.

Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* **2004**; 53:1556-1558.

Perencevich M, Burakoff R. Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12:651-64.

Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **2002**; 31:77-92.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **2002**; 347:417-429.

Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* **2000**; 47:57-70.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **2004**; 118:229-241.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **1997**; 15:707-747.

Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* **1996**; 98:945-953.

Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **1997**; 40:754-760.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2001**; 2:361-367.

Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol* **1981**; 61:141-153.

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JL. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1989**; 97:900-904.

Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2000**; 12:855-862.

Rüthlein J, Ibe M, Burghardt W, Mössner J, Auer IO. Immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2 determinations from endoscopic biopsy specimens in control, Crohn's disease, and ulcerative colitis subjects. *Gut* **1992**; 33:507-512.

Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, Rosenfeld MR, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* **2007**; 146:829-838.

Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**; CD000545.

Saro Gismera C, Lacort Fernández M, Argüelles Fernández G, Antón Magarzo J, García López R, Navascues CA, Suárez González A, Díaz Álvarez G, González Bernal A, Palacios Galán A, Altadill Arregui A, Vizoso F. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias, Spain. *Gastroenterol Hepatol* **2000**; 23:322-7.

Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* **1997**; 92:5S-11S.

Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* **2002**; 196:1079-1090.

Schwab J. Phlogistic properties of peptidoglycan-polysaccharide polymers from cell walls of pathogenic and normal-flora bacteria which colonize humans. *Infect Immun* **1993**; 61:4535-4539.

Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **2005**; 6:551-57.

Sher ME, Bank S, Greenberg R, Sardinha TC, Weissman S, Bailey B, Gilliland R, Wexner SD. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **1999**; 5:73-78.

Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of

inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14:390-400.

Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000; 76:473-478.

Smithson JE, Campbell A, Andrews JM, Milton JD, Pigott R, Jewell DP. Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut* 1997; 40:234-240.

Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH y col. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the noninflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 2002; 50:307-13.

Sonnenberg A. Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* 1988; 41:161-171.

Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003; 52:1522-1529.

Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 2000; 23:429-448.

Stenson WF, McDermott RP. Inflammatory Bowel Disease. En: Yamada T, ed. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott Company 1991; 1588-1645.

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36:476-480.

Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 1998; 19:173-181.

Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997; 18:61-64.

Strober W, Kelsall B, Marth T. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 1998; 18:1-30.

Sutherland LR. Clinical course and complications of ulcerative colitis and ulcerative proctitis. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins 1994; 279-295.

Sutherland LR. Prevention of relapse of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6:321-328.

Sutherland L, Roth D, Beck P, May G, Makiyama K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintaining remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD000544.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pemthaler A, y col. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44-54.

Szulec P, Meunier PJ. Is vitamin K deficiency a risk factor for osteoporosis in Crohn's disease? *Lancet* 2001; 357:1995-1996.

Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, Menzies IS, Bjarnason I. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992; 33:320-323.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:87-113.

Tromm A, Griga T, May B. Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:3124-3135.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.

Immunity **2006**; 24:179-189.

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **2004**; 5:800-808.

Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **1993**; 341:1437-1439.

Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins **1994**; 133-150.

Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2007**; 13:5577-5580.



Capítulo 2

Modelos animales para el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal

El desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), inicialmente implica la utilización de modelos experimentales con animales de laboratorio (principalmente ratas y ratones) antes de su aplicación para humanos. Estos modelos contribuyen al conocimiento de los mecanismos que participan en la patogénesis de estas enfermedades, además de promover el descubrimiento de nuevas dianas y estrategias para obtener tratamientos más efectivos y seguros. Un modelo ideal debería parecerse a la enfermedad en humanos y debería provocar una inflamación intestinal espontánea sin manipulación genética (Pizarro y col., 2000). Sin embargo, y aunque estos modelos existen, son utilizados en menor medida por los grandes costes que suponen. Por el contrario, la literatura científica revela la existencia de numerosos modelos experimentales, genética o químicamente inducidos en roedores, con similares condiciones a las que se presentan en la enfermedad de Crohn (EC) o en la colitis ulcerosa (CU), y a pesar de su diferente naturaleza, comparten muchas características, apoyando así el concepto de que el proceso de inflamación intestinal ocurre como la combinación de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. Los diferentes modelos han sido divididos en cuatro categorías (Tabla 1-4):

1.- Modelos inducidos químicamente: Animales normales expuestos a agentes químicos exógenos como el ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS: *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*), sulfato de dextrano sódico (DSS: *dextran sodium sulfate*), oxazolona, iodacetamida, indometacina, polisacárido-peptidoglicano (PS-PG), o ácido acético.

Tabla 1. Modelos de colitis inducidos químicamente en roedores					
Categoría	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Similitudes	Referencias
TNBS/Etanol	Colon	Aguda Crónica	Transmural Th1	EC	Morris y col., 1989
DSS	Colon	Aguda Crónica	Superficial Th1/Th2	CU	Okayasu y col., 1990
Oxazolona	Colon descendente	Aguda Crónica	Superficial Th2	CU	Boirivant y col., 1998
Iodacetamida	Colon	Aguda Crónica	Th1	---	Satoh y col., 1997
Indometacina	Intestino delgado Colon	Crónica	Transmural, Th1	EC	Yamada y col., 1993
PS-PG	Colon	Aguda	Transmural, Th1	---	Sartor y col., 1988
Ácido acético	Colon descendente Recto	Aguda	Th1	CU	MacPherson y Pfeiffer, 1978

2.- Modelos inducidos genéticamente: Animales a los que se le ha provocado una delección genética (KO, *Knock out*, *-/-*) o bien se les ha sobreexpresado un gen (Tg, transgénicos). Estos modelos permiten identificar cómo y porqué los defectos

inmunológicos provocan inflamación intestinal. Dentro de ellos podemos incluir: IL-2^{-/-}, IL-10^{-/-}, TCR α ^{-/-}, TNF ^{Δ ARE}, Tg HLA-B27, Tg STAT4, Tg IL-7, MDR1a^{-/-}, G α i2^{-/-}.

Tabla 2. Modelos de colitis inducidos genéticamente en roedores					
Categoría	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Similitudes	Referencias
IL-2 ^{-/-}	Colon	Aguda Crónica	Th1	CU	Sadlack y col., 1993
IL-10 ^{-/-}	Intestino delgado Colon	Crónica	Transmural Th1(inicio)/ Th2(final)	CU	Kühn y col., 1993
TCR α ^{-/-}	Colon	Crónica	Th2	CU	Mombaerts y col., 1993
TNF ^{ΔARE}	Ileon>Colon	Crónica	Transmural Th1	EC	Kontoyiannis y col., 2002
HLA-B27 Tg	Intestino delgado Colon	Aguda Crónica	Th1	---	Hammer y col., 1990
STAT4 Tg	Ileon terminal Colon	Crónica	Transmural Th1	---	Wirtz y col., 1999
IL-7 Tg	Colon	Aguda Crónica	Th1/Th2	CU	Watanabe y col., 1998
MDR1a ^{-/-}	Colon		Transmural Th1	---	Panwala y col., 1998
G α i2 ^{-/-}	Colon	Crónica >Aguda	Th1	CU	Rudolph y col., 1995.

3.- **Modelos de colitis espontánea:** Estos modelos ofrecen la mejor opción para definir los factores genéticos que llevan a la inflamación de la mucosa. Son los ratones C3H/HeJBir y SAMP1/Yit.

Tabla 3. Modelos de colitis espontánea en roedores					
Categoría	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Similitudes	Referencias
C3H/HeJBir	Ciego/Colon	Aguda Crónica	Superficial Th1	---	Sundberg y col., 1994.
SAMP1/Yit	Ileon/Ciego	Aguda Crónica	Transmural Th1/Th2	EC	Rivera-Nieves y col., 2003

4.- **Modelos de transferencia celular:** La inflamación en este caso es inducida transfiriendo poblaciones de células en el tejido linfoide del hospedador: células T CD4⁺ CD45RB/SCID.

Tabla 4. Modelos de transferencia celular en roedores

Categoría	Área involucrada	Inflamación	Tipo de respuesta	Similitudes	Referencias
4.- Transferencia de células adoptivas					
Células T CD4 ⁺ CD45RB/SCID	Colon>Ileon	Crónica >Aguda	Transmural Th1	EC	Leach y col., 1996

1.- Modelos de colitis inducidos químicamente

1.1.- Colitis inducida por TNBS

Este modelo fue descrito inicialmente en ratas por Morris y col. (1989), aunque su utilización ha sido también extendida a ratones. Básicamente el modelo consiste en la aplicación de un enema de TNBS disuelto en una solución de etanol/agua (a diferentes concentraciones: 30-50%). Las dosis de TNBS utilizadas varían dependiendo de los animales de laboratorio: 10 a 30 mg en ratas, ó 0,5 a 4 mg en ratones. El etanol principalmente promueve la destrucción de la barrera intestinal e incrementa la permeabilidad, permitiendo así el acceso del TNBS a la lámina propia intestinal, donde éste manifiesta un efecto tóxico directo y actúa como un hapteno activando la respuesta inmunológica del intestino. La inflamación intestinal inducida en este modelo posee muchas características similares a la EC en humanos, incluyendo la severa inflamación transmural asociada a diarrea, prolapso rectal, anorexia y pérdida de peso. El colon aparece engrosado como resultado del edema y el daño macroscópico es habitualmente evaluado de acuerdo a una tabla de puntuaciones que valoran la extensión y la intensidad de las lesiones inducidas por TNBS (Bell y col., 1995) (Tabla 5). Además, histológicamente, es evidente la presencia de granulomas en todas las capas del intestino con infiltración de células inflamatorias.

Por otra parte, parece ser que el modelo está mediado por una respuesta Th1 (Th, linfocito T colaborador, *T helper*), asociada a una elevada producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α , *tumor necrosis factor α*), la interleucina-12 (IL-12) y el interferón γ (IFN γ), de forma similar a lo que sucede en la EC humana (Fuss y col., 2002). Aunque este modelo es uno de los más utilizados para investigar la inmunopatogénesis de la EII y evaluar las nuevas estrategias antiinflamatorias, es importante anotar que en la literatura científica existen varios protocolos de inducción de colitis que muestran diferencias según la cepa y la edad de los animales de laboratorio, la cantidad y tiempos de administración de TNBS, el porcentaje de etanol añadido y el día de sacrificio de los

animales (Te Velde y col., 2006). En más del 75% de los estudios, los animales son sacrificados en la primera semana del desarrollo de la colitis (Te Velde y col., 2006). Además, como se ha mostrado en ratones, la respuesta inflamatoria depende mucho de la especie: los ratones SJL/J son altamente susceptibles y los BALB/c son susceptibles, sin embargo, los C57BL6 y 10 son resistentes a la colitis inducida por TNBS (Scheiffele y col., 2002).

Tabla 5. Escala de valoración del índice de daño macroscópico (IDM) descrito por Bell y col. (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en rata

IDM	Daño colónico
0 puntos	Colon normal
1 punto	Hiperemia localizada, sin úlceras
2 puntos	Ulceración sin hiperemia ni engrosamiento de la pared intestinal
3 puntos	Ulceración con un punto de inflamación
4 puntos	Dos o más puntos de ulceración e inflamación
5 puntos	Grandes zonas de daño, inflamación y ulceración con una extensión mayor de 1 cm
6-10 puntos	Grandes zonas de daño tisular con una extensión mayor de 2 cm, añadiéndose 1 punto (hasta 10) por cada cm adicional de daño

Una variante del modelo de colitis por TNBS consiste en el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH, *delayed-type hypersensitivity*), manifestada por la administración repetida de TNBS en diferentes intervalos. El primer periodo es la fase de sensibilización (aproximadamente una semana) por la aplicación inicial del hapteno al animal (por ejemplo en la piel), que resulta en una modificación de las moléculas autólogas en la mucosa, dejando preparadas las células T específicas del antígeno. La reacción de hipersensibilidad retardada es inducida después con una nueva aplicación del agente desencadenante de forma intrarrectal (Camoglio y col, 2000). Abad y col. (2003), describen los cambios histopatológicos que ocurren durante los primeros días después de la inducción de colitis: infiltración de neutrófilos y macrófagos en la mucosa y submucosa colónica. En el día 3, la inflamación transmural observada, se encuentra asociada con engrosamiento de la pared intestinal, ulceraciones, pérdida de células caliciformes y fibrosis.

Por otra parte, en el modelo de colitis por TNBS en rata existen diferentes protocolos: agudo, establecido y crónico. En el **modelo agudo**, observado a los 3 días de la

inducción intrarrectal de colitis por TNBS, se analiza una respuesta inflamatoria no específica correspondiente a la fase de inducción de la respuesta Th1. Por esta razón, cuando este modelo agudo es utilizado para estudiar el efecto de nuevos fármacos con actividad antiinflamatoria intestinal, los resultados deben ser evaluados con cautela cuando se intentan extrapolar a la EII en humanos, ya que la inflamación aguda es una parte no específica del proceso patológico de la EII. En consecuencia, se puede obtener información más valiosa con la **colitis establecida**, en la cual la respuesta de hipersensibilidad retardada se reproduce con una repetida administración del hapteno, o con la **colitis crónica**, que se evalúa tras 7 días de la administración de TNBS. Ambos protocolos permiten el análisis de la respuesta Th1 específica y la observación de lesiones fibróticas que aparecen, típicamente presentes en la EC humana. La administración intrarrectal semanal de TNBS en etanol, por periodos de hasta 49 días, puede desarrollar una colitis crónica parecida a la fase crónica de la EC humana y que se acompaña con producción de IL-23 e IL-17 como demuestra el cultivo de leucocitos polimorfonucleares obtenidos del colon de estos ratones al final del periodo experimental (Fichtner-Feigh y col., 2005).

El interés en este modelo ha sido ratificado cuando se utilizan ratones modificados genéticamente, proporcionando entonces información adicional sobre la patogénesis de la inflamación intestinal. Por ejemplo, estudios con ratones C57BL/6 $IFN\gamma^{-/-}$ muestran que la colitis por TNBS en estos ratones puede ser asociada con una respuesta mediada por Th2 (Dohi y col., 1999; Dohi y col., 2000).

1.2.- Colitis inducida por DSS

Este modelo consiste en la administración de polímeros de DSS disueltos en agua destilada, en diferentes concentraciones (1-5%), a ratones, ratas, hamsters o cobayas. Originalmente fue descrito por Okayasu y col. en 1990, y los mecanismos exactos implicados en el daño intestinal por DSS no se conocen completamente. Se cree que el DSS ejerce un efecto tóxico directo sobre las células del epitelio intestinal de las criptas, afectando a la integridad de la barrera epitelial, y permitiendo la translocación de las bacterias lumenales y la infiltración de neutrófilos y otras células inmunológicas. Todo esto lleva a pérdida de peso, diarrea y sangre rectal, parámetros utilizados para asignar un índice de actividad de la enfermedad (IAE) a cada animal (Tabla 6) y seguir el proceso inflamatorio en el tiempo (Cooper y col., 1993). A nivel macroscópico, es evidente el acortamiento del intestino y la presencia de ulceraciones, afectando más al segmento distal del colon. El análisis histológico del colon revela un daño de las criptas y de células epiteliales, con infiltración significativa de granulocitos, células mononucleares, y edema tisular, frecuentemente asociado a una ulceración severa (Wirtz y col., 2007).

De forma similar a lo que se ha descrito en el modelo del TNBS, en este modelo experimental existen diferentes fases de inflamación intestinal, fase aguda y establecida. En la **fase aguda**, que tiene lugar con la administración de DSS (3-5% durante 5-7 días), se

considera que en la inducción de la inflamación juega un papel más relevante la inmunidad innata más que la inmunidad adaptativa (Dieleman y col., 1994). Por esta razón, las lesiones observadas durante esta fase han sido asociadas con un incremento de la producción de citocinas proinflamatorias derivadas de macrófagos, incluyendo TNF α , IL-1 β e IL-6; y la colitis aguda por DSS se considera un interesante modelo para evaluar la participación de los mecanismos de inmunidad innata de la colitis, que incluyen procesos de reparación tisular, y su modulación después del tratamiento farmacológico (Williams y col., 2001). Además, ha sido atribuido un papel importante en la patogénesis de este modelo a las bacterias luminales, así el tratamiento con antibióticos lleva a una disminución del proceso inflamatorio intestinal inducido por el polímero (Podolsky, 2002), tratamiento también clínicamente efectivo en la EII humana, apoyando así la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo de la colitis (Rath y col., 2001). Por otro lado, estudios llevados a cabo en ratones TLR4^{-/-} y MyD88^{-/-} sugieren que la vía de señalización del receptor de tipo Toll (TLR, *toll-like receptor*) es requerida para limitar la translocación bacteriana después de que el DSS induzca daño en el epitelio intestinal, sugiriendo también la importancia de la señal del TLR para el mantenimiento de la barrera epitelial (Fukata y col., 2005).

Tabla 6. Asignación del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en el modelo de colitis experimental inducido por DSS en rata

Puntuaciones	Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Sangre rectal
0	No	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Heces blandas	
3	10-20%		
4	>20%	Diarrea	Pérdida de sangre

El valor del IAE se considera la suma de las puntuaciones dadas para la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia de sangre rectal dividida por 3.

La **fase establecida** puede ser inducida después de disminuir la concentración de DSS (1-2% durante 10-15 días) (Bailón y col., 2008) o parar su administración y cambiar a agua normal (durante 7-14 días) (Dieleman y col., 1998; Melgar y col., 2005). Esta fase probablemente es debida a la lenta regeneración del epitelio colónico después del extenso daño inicialmente inducido por el DSS, aunque es mucho menor que los modelos agudos donde se utilizan sustancias más tóxicas como el etanol o ácido acético (Dieleman y col., 1994). La fase establecida se considera causada por linfocitos que han sido activados por las citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos activados (Okayasu y col., 1990). De hecho, estudios histológicos en este modelo han revelado que la presencia de macrófagos y células T CD4⁺ es más importante en áreas de regeneración del daño en la lámina propia. Estos linfocitos secretan altos niveles de IFN γ e IL-4, sugiriendo que ambos tipos de células, Th1 y Th2 juegan un papel patogénico en esta fase de inmunidad crónica de la colitis inducida por DSS (Dieleman y col., 1998). Finalmente, es importante anotar que, en especies susceptibles, la administración de DSS en varios ciclos (por ejemplo, 7 días de DSS,

14 días de agua) y, en combinación con una única dosis intraperitoneal inicial del carcinógeno genotóxico, azoximetano (AOM), lleva a una inflamación colorrectal asociada a cáncer (Tanaka y col., 2003). Por esto, el modelo DSS/AOM es una herramienta muy útil para estudiar los mecanismos que unen la inflamación a la carcinogénesis colónica.

1.3.- Colitis inducida por oxazolona

Boirivant y col. (1998) fueron los primeros en estudiar que la administración intrarrectal de oxazolona disuelta en etanol podía inducir colitis, mostrando síntomas como pérdida de peso y diarrea a partir del segundo día del enema, y que claramente disminuía 10-12 días después (Boirivant y col., 1998). El daño intestinal se localiza sólo en la parte distal del colon, y exclusivamente afecta a la capa mucosa, mostrando ulceraciones y disminución relevante de las células epiteliales. Estos rasgos histológicos, en combinación con una elevada producción de citocinas Th2, incluyendo IL-4, IL-5 e IL-13, hacen que, en algunos aspectos, posea características similares a la CU humana. De hecho, es uno de los pocos modelos adecuados para estudiar la participación de la respuesta inmunológica Th2 en la inflamación intestinal, en la cual el tratamiento con anticuerpos anti-IL-4 claramente disminuyen la severidad de la enfermedad (Boirivant y col., 1998). De forma similar a lo comentado anteriormente en el modelo del TNBS, la colitis por oxazolona depende de la especie considerada, y puede requerir sensibilización por aplicación de oxazolona en la piel 10-14 días antes de la instilación colónica. Se debe tener especial cuidado con la dosis, ya que dosis bajas pueden también inducir una mezcla de colitis Th1/Th2 (Iijima y col., 2004).

1.4.- Colitis inducida por iodacetamida

Este modelo se basa en el supuesto efecto protector ejercido por los compuestos endógenos de sulfidrilo (SH), como el antioxidante tripéptido glutation (GSH). Así, la administración intracolónica de la iodacetamida puede llevar a un daño de la mucosa capaz de disminuir los componentes implicados en los mecanismos de defensa antioxidantes; y conduce a un estado colítico caracterizado por diarrea y pérdida de peso, asociado a dilatación colónica, adhesión y daño de la mucosa de diferente intensidad dependiendo de la dosis utilizada (Satoh y col., 1997). Además, provoca una respuesta del tipo Th1 con aumento de citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 (Barada y col., 2006) y disminución de algunas citocinas Th2 como IL-4 (Pérez-Navarro y col., 2005). Este modelo puede ser de interés para aclarar si las propiedades antioxidantes de un compuesto pueden ser atribuidas a efectos beneficiosos en la inflamación intestinal.

1.5.- Colitis inducida por indometacina

La administración peritoneal de indometacina a los roedores es capaz de inducir ulceración en el intestino grueso y delgado de forma dosis dependiente (Yamada y col., 1993). Sin embargo, para obtener una reproducibilidad adecuada es necesario conseguir

una solubilidad completa de la indometacina (primero disolver completamente en etanol al 100% y luego diluir con 5% de bicarbonato sódico o en metilcelulosa). Es importante anotar que la ingesta de comida es muy importante porque los roedores en ayuno desarrollan una respuesta atenuada. El mecanismo por el cual la indometacina provoca daño tisular parece ser debido a su efecto inhibitor sobre la síntesis de prostaglandinas protectoras (PGE₁ y PGE₂) y prostaciclina. El daño intestinal se caracteriza por ulceraciones, inflamación transmural, y manifestaciones extraintestinales. Las bacterias y productos luminales claramente contribuyen a esta respuesta inflamatoria (Yamada y col., 1993). Una de las ventajas principales de este modelo cuando se compara con otros modelos químicamente inducibles, es que las lesiones aparecen en ambos segmentos intestinales, simulando un modelo parecido a la EC (Elson y col., 1995).

1.6.- Colitis inducida por polisacárido-peptidoglicano

La administración intramural del componente de la pared bacteriana polisacárido-peptidoglicano en la parte distal del colon de ratas induce enterocolitis transmural (Sartor y col., 1988), caracterizada por engrosamiento del colon, infiltración de linfocitos, macrófagos y neutrófilos, incremento de la permeabilidad de la mucosa y aumento de la producción de óxido nítrico, de la síntesis de colágeno, y de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8. Existen tratamientos con antagonistas del receptor de IL-1 (McCall y col., 1994) o con IL-10 (Herfarth y col., 1996) que atenúan la colitis inducida por PS-PG en ratas.

1.7.- Colitis por ácido acético

El modelo, originalmente descrito por MacPherson y Pfeiffer en 1978, tiene lugar por la instilación intrarrectal de ácido acético diluido (4-50% en agua) en roedores, induciéndose entonces necrosis e inflamación colónica (Elson y col., 1995). La colitis se caracteriza por un daño agudo, donde aparentemente los neutrófilos no están implicados en fases tempranas. La inflamación de la mucosa y submucosa que se da lugar, después del daño inicial, está asociada con activación de la vía del ácido araquidónico (Elson y col., 1995). Las concentraciones altas de ácido acético inducen perforaciones.

2.- Modelos manipulados genéticamente

Las metodologías con animales Tg y KO han sido utilizadas para desarrollar modelos manipulados genéticamente, en los cuales se puede observar el papel de distintas moléculas inmunológicas en la inflamación crónica intestinal.

2.1.- Ratones KO para IL-2

La IL-2 es una citocina reguladora del sistema inmunológico con múltiples funciones, incluyendo la activación de las células T, los macrófagos, las células asesinas naturales (NK, *natural killer*), la diferenciación de células B y la muerte celular inducida por activación. Sadlack y col. (1993) observaron cómo aproximadamente un 50% de los ratones deficientes para el gen de IL-2 morían a las 4-9 semanas de edad, por esplenomegalia, linfadenopatía y anemia hemolítica autoinmunitaria, y que en el resto de los animales, entre la semana 6 y 15, desarrollaban una colitis crónica con similitud clínica e histológica con la CU en humanos. El intestino delgado en este modelo no sufre modificaciones significativas, mientras que el colon es severamente afectado provocándose ulceración y engrosamiento de la pared. Microscópicamente, se observan abscesos en las criptas, agotamiento de mucina y displasia de las células epiteliales, características de la EII humana. Además, se observan infiltraciones de células T y B activadas, elevada secreción de inmunoglobulinas (IgG1, IgE), anticuerpos frente a proteínas presentes en el colon, y un aumento de la expresión del MHC de clase II (Sadlack y col., 1993).

Los ratones dobles KO deficientes en IL-2 y en otros genes como RAG-2^{-/-}, JH^{-/-} y β 2microglobulina^{-/-} han revelado que las células T CD4⁺, y no las células B ni las células T CD8⁺, son esenciales para la activación de la colitis. En este modelo, la producción de IL-12 e IFN γ están incrementadas, lo que sugiere una participación de la respuesta Th1 (Ehrhardt y col., 1997). Además, el modelo ha sido utilizado para conocer la patogénesis de las condiciones intestinales. Por ejemplo, Boone y col. (2002) emplearon ratones KO para IL-2 para caracterizar el papel de la apoptosis defectuosa de los linfocitos intestinales en la EII. Más recientemente, en estos modelos experimentales se ha descrito el efecto protector de las células T $\gamma\delta$ en la EII, al menos durante la fase temprana de la inflamación intestinal (Kühl y col., 2007). Igualmente, estos ratones KO para IL-2 se han empleado para desarrollar colitis crónica y pueden representar una herramienta útil para encontrar un tratamiento para la EII (Nagahama y col., 2008).

2.2.- Ratones KO para IL-10

La IL-10 es una citocina reguladora producida por células T, B, macrófagos, células del timo y queratinocitos, que disminuye las funciones de células Th1, NK y macrófagos, inhibiendo la producción y liberación de citocinas proinflamatorias como IL-12 y TNF α . En 1993, Kühn y col. observaron cómo los ratones deficientes en IL-10 desarrollaban

espontáneamente una inflamación en todo el intestino, principalmente en duodeno, yeyuno proximal y colon ascendente con infiltración de linfocitos, macrófagos activados y neutrófilos (Kühn y col., 1993). En el intestino delgado, el proceso inflamatorio se caracteriza por un engrosamiento significativo de la pared intestinal debido a los cambios hiperplásicos que tienen lugar; en el colon es evidente la disminución de células caliciformes, la alteración de la capa epitelial, la infiltración de células plasmáticas productoras de IgA y el incremento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de clase II. La causa del proceso inflamatorio en estos ratones se debe a la activación de células Th1 y macrófagos con producción y liberación de mediadores proinflamatorios como TNF α , IL-12 o IFN γ . Estos datos respaldan el papel clave de la IL-10 en la regulación de la respuesta de células T en la mucosa. Además, la inflamación intestinal también tiene lugar en ratones deficientes en CRF2-4, la cadena beta del receptor de IL-10, y en los ratones con deficiencia en STAT3 (STAT, transductor de señal y activador de la transcripción, *signal transducers and activator of transcription*), que resulta en un defecto en la señal de IL-10 (Spencer y col., 1998; Kontoyiannis y col., 1999). De forma similar a lo comentado anteriormente, la participación de los antígenos de la microflora entérica en el desarrollo del daño intestinal muestra ser crucial en este modelo experimental, ya que la colitis no aparece en ratones IL-10^{-/-} libres de gérmenes (Sellon y col., 1998).

La importancia de este modelo intestinal reside, no sólo en la valiosa información aportada sobre la patología de la EII, sino en la evaluación de nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento en estas condiciones. De hecho, Gratz y col. (2002) informan de la eficacia de los anticuerpos monoclonales murinos anti-TNF α en la colitis establecida en ratones IL-10^{-/-}. Actualmente, infliximab constituye uno de los fármacos más eficaces para el tratamiento de la CU y la EC, promoviendo una mejora de muchos de los parámetros clínicos en estos pacientes. De igual manera, con la administración de IL-10 recombinante o con la terapia génica con IL-10 se ha comprobado una mejoría de la colitis experimental (Lindsay y col., 2001); sin embargo, la inyección sistémica de IL-10 recombinante mostró en ensayos clínicos de fase III sólo un beneficio modesto en pacientes con EC (Colombel y col., 2001), lo que se atribuyó a la biodisponibilidad limitada de IL-10 en la mucosa intestinal. Para solucionar esto, en la actualidad se están estudiando propuestas alternativas, incluyendo la terapia génica con retrovirus o utilizando la IL-10 secretada por bacterias transgénicas (Van Montfrans y col., 2002; Braat y col., 2006).

2.3.- Ratones con mutación en el receptor de células T

Mombaerts y col. (1993) mostraron que los ratones deficientes de la cadena α del receptor de células T (TCR, *T cells receptor*) desarrollan colitis de forma espontánea a las 12-16 semanas de edad, manifestando similares características a la CU humana. Estos ratones muestran inflamación en la mucosa e hipertrofia por todo el colon, sin ser afectado el intestino delgado. Histológicamente, el daño se caracteriza por hiperplasia del epitelio colónico, descenso del número de criptas y de células caliciformes, e infiltración de

linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos, con una activación de las células B y un aumento de la producción de autoanticuerpos como resultado de las alteraciones inmunológicas (Mizoguchi y col., 1996). Es interesante hacer notar que la colitis en ratones $TCR\alpha^{-/-}$ se asocia con un incremento en el número de células T $CD4^{+}$ del tipo Th2, productoras de IL-4 principalmente. El predominio de una respuesta inmunológica de tipo Th2 en el tracto gastrointestinal de estos ratones ha sido apoyada por el hecho de que los ratones $TCR\alpha^{-/-}$ y $TCR\alpha^{-/-}/IL-4^{-/-}$ tratados con anti-IL-4 muestran signos clínicos o histológicos de inflamación más suaves (Mizoguchi y col., 1999). De forma similar a lo comentado en otros modelos experimentales, los ratones $TCR\alpha$ deficientes en un ambiente libre de gérmenes no desarrollan inflamación intestinal. Este modelo puede ser interesante para investigar el papel de las diferentes subpoblaciones de células T (Nanno y col., 2008) y/o en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento farmacológico (Sugimoto y col., 2008).

2.4.- Ratones $TNF^{\Delta ARE}$

El desarrollo de anticuerpos anti-TNF α como tratamiento en pacientes con EC y CU (D'Haens y Daperno, 2006), indica el papel clave de esta citocina proinflamatoria en la EII humana. Por esta razón, la existencia de un modelo de inflamación intestinal causado por sobreexpresión de TNF α es de gran valor. Este es el caso del modelo inicialmente propuesto por Kontoyiannis y col. (1999), basado en el hecho de que el mRNA de TNF en la región 3' contiene elementos repetidos ricos en adenina/uracilo (AU), consistentes en AUUUA (ARE, *adenine/uracil-rich element*), e implicados en la regulación de la síntesis de TNF α . La desaparición de esta región 3'-adenina/uracilo en el gen codificado desarrolla ratones $TNF^{\Delta ARE}$ (ΔARE , *change in the TNF AU-rich elements*), que se caracterizan por la presencia de altos niveles circulantes de TNF α , generándose manifestaciones sistémicas y gastrointestinales durante las 2-4 semanas de vida (Kontoyiannis y col., 1999). El análisis histológico del tracto digestivo revela cambios inflamatorios del tipo de la EC, localizados principalmente en el ileon terminal y afectando sólo ocasionalmente al colon proximal. Las lesiones iniciales consisten en alteraciones de la mucosa e infiltración de células inflamatorias como leucocitos mononucleares, células plasmáticas y neutrófilos que se extienden hasta las capas musculares de la pared intestinal, hecho característico de una inflamación transmural. La gravedad de la inflamación intestinal se intensifica con la edad y en ratones adultos (4-7 meses) se observa una completa pérdida de la estructura vellosa, manifestándose un alto grado de mortalidad. Apoyando la similitud histológica con la EC, también se encuentra en este modelo una respuesta Th1, con citocinas como IL-12 e IFN γ , y linfocitos T $CD8^{+}$ (Kontoyiannis y col., 2002). Finalmente, este tipo de ratones muestran manifestaciones extraintestinales como alopecia y cataratas en uno o ambos ojos, por el desarrollo de artritis inflamatoria crónica con hinchazón de las patas y gran impedimento de la movilidad (Kontoyiannis y col., 1999). Este modelo ofrece la posibilidad de estudiar el mecanismo implicado en la ileitis inducida por TNF α y de desarrollar nuevas terapias para reducir la actividad del TNF α en EC humana.

2.5.- Ratas transgénicas HLA-B27

Este modelo fue propuesto inicialmente para estudiar la espondiloartropatía, pero se observó que las ratas transgénicas para HLA-B27 humana presentan una sobreexpresión de esta molécula de reconocimiento de superficie y desarrollan una EII espontánea que afecta a todos los segmentos del tracto gastrointestinal (Hammer y col., 1990). La histología intestinal revela hiperplasia de criptas, infiltración en la mucosa de células inflamatorias mononucleares, y un papel de los linfocitos T tipo Th1 en la patogénesis de este modelo (Brebán y col., 1996). Este modelo ha sido utilizado para estudiar la importancia de las bacterias de la microbiota en la patogénesis de la fase aguda y crónica de la inflamación gastrointestinal. Cuando las ratas transgénicas HLA-B27 se desarrollan en un ambiente libre de gérmenes, no logran desarrollar inflamación intestinal y artritis, mientras que la colitis se desarrolla un mes después de transferir microorganismos específicos al ambiente (Rath y col., 1996). Además, el tratamiento de estas ratas con antibióticos, como ciprofloxacino, metronidazol, y vancomicina/imipenem, es efectivo para prevenir o disminuir la enfermedad (Rath y col., 2001), apoyando la administración de antibióticos que se lleva a cabo en la EII humana (Podolsky, 2002). Similarmente, este modelo ha sido considerado para evaluar otras estrategias que actúan alterando la microbiota intestinal como la utilización de prebióticos y/o probióticos (Dieleman y col., 2003; Hoentjen y col., 2005; Rodríguez-Cabezas y col., 2003).

2.6.- Ratones transgénicos de STAT4

La IL-12 es importante para el desarrollo de la respuesta Th1 en EC, mientras que IL-23 es uno de los factores esenciales requeridos para la expansión de la población de células T CD4⁺, que contribuyen claramente en la patogénesis de estas condiciones intestinales (Langrish y col., 2005). Se ha demostrado la existencia de siete moléculas de la familia de STAT, que juegan un papel importante en la señal de traducción de muchas citocinas. STAT4 es el factor de transcripción que regula específicamente la señal del receptor de IL-12/IL-23 (Kaplan y col., 1996). En 1999, Wirtz y col. generaron ratones transgénicos para STAT4, bajo el control de un promotor de citomegalovirus. Estos ratones expresan un notable incremento de los niveles nucleares de STAT4 en los linfocitos T CD4⁺ de la lámina propia después de la administración sistémica de dinitrofenil-hemocianina (KLH: *keyhole hemocyanin*) lo que no sucede en ratones no transgénicos (Wirtz y col., 1999). Esa sobreexpresión de STAT4 se asoció con signos macroscópicos e histológicos de colitis que se caracterizaron por inflamación transmural de células T y una expresión incrementada de las citocinas proinflamatorias como TNF α e IFN γ , junto con una disminución de la producción de IL-4, sugiriendo un importante papel de las células T Th1 en el comienzo y mantenimiento de la colitis en estos ratones transgénicos. De hecho, los autores encontraron que los esplenocitos de los ratones transgénicos colíticos STAT4 proliferan en respuesta a antígenos bacterianos autólogos presentados por APCs y como

consecuencia producen citocinas proinflamatorias Th1 (Wirtz y col., 1999). Todos estos datos establecen la implicación de la señal molecular de STAT4 en la patogénesis de la inflamación intestinal crónica. Apoyando el papel de la microflora intestinal en la patogénesis de la colitis, la inflamación que tiene lugar en estos ratones se limita a lugares con alta carga bacteriana (ileon terminal, colon).

2.7.- Ratones transgénicos de IL-7

La IL-7 es una citocina esencial para la proliferación y regulación de la función de las células epiteliales y linfocitos intraepiteliales. Además, se ha encontrado en suero de pacientes con CU, de tal forma que influye en la diferenciación y proliferación de las células T en el timo (Watanabe y col., 1997). Los ratones transgénicos para IL-7 desarrollan una colitis aguda a las 1-3 semanas de edad con infiltración de neutrófilos, células T CD4⁺ y células T $\gamma\delta$ en el intestino y unos niveles elevados de IL-7 que inducen la activación de los linfocitos de la mucosa y podría considerarse la causa de la colitis. A las 8-12 semanas de edad, tiene lugar una colitis crónica caracterizada por prolapso rectal, sangre en el ano, infiltración de monocitos, disminución de células caliciformes, e incremento de los abscesos en las criptas (Watanabe y col., 1998). Este modelo se considera como un modelo de CU, pero el incremento de IL-2 e IFN γ , más la disminución de IL-4, también muestra un patrón de colitis tipo Th1.

2.8.- Ratones KO MDR1a

El gen *mdr1a* codifica una proteína transportadora de membrana denominada P-glicoproteína (PGP), que se encarga del transporte de moléculas hidrofóbicas a través de la membrana celular. La PGP se encuentra expresada en niveles elevados en la superficie de células epiteliales del colon y la expresión alterada del gen *mdr* está asociada con EII (Schwab y col., 2003). La supresión del gen *mdr1a* provoca una colitis transmural (Panwala y col., 1998) caracterizada por engrosamiento del colon con hiperplasia en las criptas, ulceración, infiltración de células T CD4⁺, células B y granulocitos, con una respuesta del tipo Th1 por incremento de la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α e IFN γ , así como de las quimiocinas MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos, *monocyte chemoattractant proteins*), y MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1, *macrophage inflammatory protein 1*). En este modelo las bacterias intestinales juegan un papel importante y se sugiere que un defecto en la barrera epitelial es la principal causa de la colitis (Panwala y col., 1998).

2.9.- Ratones KO Gai2

La proteína *Gai2* regula señales de transducción a través de la adenilato ciclasa y se encuentra en linfocitos y células epiteliales gastrointestinales. Los ratones deficientes en *Gai2* desarrollan colitis a las 8-12 semanas de edad (Rudolph y col., 1995) con un defecto en la barrera epitelial, incremento de células T CD4⁺ activadas en la lámina propia y aumento

de los niveles de inmunoglobulinas frente a la microbiota intestinal normal. Este modelo además se caracteriza por una deficiencia de las células B productoras de IL-10 en los nódulos mesentéricos (Dalwadi y col., 2003).

3.- Modelos de colitis espontánea

3.1.- Ratones C3H/HeJBir

Sundberg y col. observaron que los ratones C3H/HeJBir, bajo ciertas condiciones, desarrollan una colitis espontánea. Histológicamente, las lesiones ocurren en ciego y colon proximal y se caracterizan por inflamación aguda y crónica, abscesos en las criptas, ulceraciones e hiperplasia; sin embargo, no se observa engrosamiento de la pared intestinal ni granulomas. Esta colitis ocurre entre la 3ª y 6ª semana y se resuelve a los 3 meses de edad. En ella, se desarrolla una respuesta de células B y de células Th1 frente a bacterias comensales, asociada a un incremento de la producción de IL-2 e IFN γ . Por esta razón, este modelo ha sido útil para confirmar el papel de una respuesta inmunológica anormal frente a la microbiota entérica en la patogénesis de la EII y para la identificación de los antígenos microbianos que son reconocidos por las células T (Brandwein y col., 1997). Los estudios con este modelo concluyen que, aunque la lista de antígenos potenciales es numerosa, sólo un pequeño y seleccionado número de antígenos bacterianos entéricos son responsables del desarrollo de la colitis espontánea en este modelo. Otros estudios han observado que los antígenos más reconocidos son las flagelinas, de hecho, IgG anti flagelina ha sido identificada en al menos la mitad de los pacientes con EC, pero no en pacientes con CU ni en individuos sanos (Lodes y col., 2004).

3.2.- Ratones SAMP1/Yit Y SAMP1/YitFc

Los ratones SAMP1/Yit y SAMP1/YitFc constituyen modelos de inflamación intestinal espontánea bastante similares a la EC (Rivera-Nieves y col., 2003). Estos ratones desarrollan una ileitis establecida a las 10 semanas de edad, y aunque también tienen lugar manifestaciones extraintestinales, la incidencia de lesiones en la piel está inversamente relacionada con la presencia de inflamación intestinal transmural. Las lesiones se caracterizan por hipertrofia muscular, granulomas, alteraciones en la morfología epitelial, y en algunos ratones (5%) se observa enfermedad perianal con ulceración y fístulas. En este modelo, se da lugar a un infiltrado compuesto por células mononucleares (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas) y neutrófilos.; y de igual forma a lo que ocurre en otros modelos de colitis, la flora intestinal también juega un papel importante, ya que los ratones SAMP1/Yit en ambiente libre de gérmenes manifiestan inflamación, aunque atenuada. Además, se detecta una respuesta Th1 con elevada producción de IFN γ a las 4 semanas precedida de ileitis (Rivera-Nieves y col., 2003), pero estudios más recientes indican que ambas respuestas, Th1 y Th2, intervienen en la enfermedad inflamatoria desarrollada (Bamias y col., 2005). Este modelo ha sido muy útil para caracterizar la participación de las

moléculas de adhesión implicadas en el reclutamiento de células T y monocitos (E-, L- y P-selectina, $\alpha_4\beta_1$ - y $\alpha_4\beta_7$ -integrinas) (Inoue y col., 2005; Rivera-Nieves y col., 2005). Es interesante hacer notar que la administración de anticuerpos anti-TNF α a estos ratones tiene un efecto terapéutico similar al mostrado por el infliximab en la EII en humanos (Marini y col., 2003), lo que sugiere un mecanismo de acción similar después del bloqueo de TNF α , mostrando la utilidad del modelo en la evaluación y desarrollo de nuevos tratamientos para la EII. Además, las terapias implicadas en el bloqueo de IFN γ o moléculas de adhesión, como α -integrina, que se han mostrado eficaces para el tratamiento de la EII humana (Kaser y Tilg, 2008), manifiestan una actividad antiinflamatoria en estos ratones (Burns y col., 2001).

4.- Modelos de transferencia celular

4.1.- Modelo de transferencia CD45RB

Los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID: *severe combined immunodeficiency*) desarrollan una mutación espontánea que provoca una deficiencia de células T y B, pero poseen un sistema inmunitario innato intacto compuesto por granulocitos, macrófagos y células NK, que permite su supervivencia. El sistema inmunitario de los ratones SCID puede ser completamente reconstituido por transferencia de células T y B. Así la molécula de superficie CD45RB se encuentra en niveles elevados en células T vírgenes (CD4⁺CD45RB^{hi}) y disminuye su expresión en las células de memoria (CD4⁺CD45RB^{lo}). La transferencia de CD4⁺CD45RB^{hi} a los ratones SCID produce una inflamación transmural en el colon proximal, 5-10 días después de realizar la transferencia celular, lo que no ocurre cuando se transfieren las células CD4⁺CD45RB^{lo} (Leach y col., 1996; Morissey y col., 1993). Típicamente, en estos animales la enfermedad se manifiesta con diarrea no sanguinolenta, acompañada por pérdida de peso, aumentando la gravedad de la enfermedad con el tiempo, hasta llevar a la muerte del animal. El colon aparece muy engrosado con hiperplasia del epitelio e infiltración en la lámina propia y en la submucosa de linfocitos y macrófagos. El resultado, una vez que las células presentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cell*) han presentado los antígenos entéricos, es la producción por parte de las células CD4⁺ de altos niveles de IFN γ y otras citocinas tipo Th1 (Brimnes y col., 2001), confirmando el hecho de que el bloqueo de IL-12, IFN γ o TNF α , pero no de IL-4, previenen del desarrollo de la enfermedad (Mackay y col., 1998). Por otra parte, la IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β , *transforming growth factor β*), han mostrado tener un papel esencial en este modelo de colitis experimental. Así, las células T reguladoras, previenen de la inflamación y de las respuestas específicas al antígeno cuando se transfiere junto con las células T CD4⁺CD45RB^{hi}, mientras que la administración de anticuerpos anti-IL-10 y anti-TGF β promueven el desarrollo de la enfermedad (Asseman y col., 1999). Por todo esto, este modelo proporciona dos importantes claves en la patogénesis de la EII: primero, las células T pueden originar inflamación intestinal cuando reaccionan contra patógenos de forma exagerada y segundo, esta inflamación puede prevenirse con las

células T reguladoras. Además, y suponiendo el importante papel de la microbiota intestinal en la EII, también se ha documentado que la transferencia de células T CD4⁺CD45RB^{hi} a animales SCID con una reducida microbiota entérica, por ejemplo por un tratamiento con antibióticos, da lugar a una mejora del estado inflamatorio (Aranda y col., 1997). Este modelo también ha sido útil para investigar la contribución de la señal apoptótica alterada en la colitis (Bregenholt y col., 2001) y para caracterizar la función de IL-18 en la inflamación intestinal, citocina que aumenta la producción de IFN γ por las células epiteliales y por las células de la lámina propia en pacientes con EC (Wirtz y col., 2002).

5.- Selección del modelo a estudiar

Podemos concluir por tanto, que un modelo experimental de inflamación intestinal debe estar bien caracterizado y puede ser considerado apropiado cuando muestra morfológica y bioquímicamente alteraciones similares a las manifestadas en la EII humana. La caracterización de un modelo de colitis en animales de laboratorio incluiría unos parámetros genéticos e inmunológicos bien definidos. Es de resaltar que cuando son necesarios reactivos para inducir las condiciones inflamatorias en el intestino, los compuestos deben ser accesibles y estar disponibles fácilmente, para la visualización de una respuesta homogénea en los animales. También es evidente que un sólo modelo experimental no puede contener todas las características clínicas y patogénicas de la EII humana; por esta razón, cuando se quieren evaluar nuevas estrategias terapéuticas es conveniente utilizar diferentes modelos para caracterizar mejor la actividad antiinflamatoria intestinal. Así mismo, los modelos que se seleccionarán para los estudios con animales dependerán del mecanismo de acción del fármaco a estudiar, de la experiencia del laboratorio, y por supuesto de los costes. Por ejemplo, para analizar la acción de un fármaco sobre la respuesta de células Th2, se podrían utilizar los modelos de inducción de colitis por oxazolona o los ratones TCR $\alpha^{-/-}$; o para estudiar fármacos antioxidantes podría utilizarse el modelo de colitis mediante la administración de iodacetamida.

Referencias

- Abad C**, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* **2003**; 124:961-971.
- Aranda R**, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients. *J Immunol* **1997**; 158:3464-3473.
- Asseman C**, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **1999**; 190:995-1004.
- Bailón E**, Comalada M, Román J, Michelena P, Ramis I, Merlos M, Nieto A, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J. UR-1505, a salicylate able to selectively block T-cell activation, shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the DSS model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* **2008**; 14:888-897.
- Bamias G**, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, Cominelli F. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* **2005**; 128: 654-66.
- Barada KA**, Mourad FH, Sawah SI, Khoury C, Safieh-Garabedian B, Nassar CF, Saadé NE. Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat. *Life Sci* **2006**; 79:2032-2042.
- Bell CJ**, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* **1995**; 268:G622-G630.
- Boirivant M**, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* **1998**; 188:1929-1939.
- Boone DL**, Dassopoulos T, Lodolce JP, Chai S, Chien M, Ma A. Interleukin-2-deficient mice develop colitis in the absence of CD28 costimulation. *Inflamm Bowel Dis* **2002**; 8:35-42.
- Braat H**, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**; 4:754-759.
- Brandwein SL**, McCabe RP, Cong Y, Waites KB, Ridwan BU, Dean PA, Ohkusa T, Birkenmeier EH, Sundberg JP, Elson CO. Spontaneously colitic C3H/HeJBir mice demonstrate selective antibody reactivity to antigens of the enteric bacterial flora. *J Immunol* **1997**; 159:44-52.
- Breban M**, Fernández-Sueiro JL, Richardson JA, Hadavand RR, Maika SD, Hammer RE, Taurog JD. T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* **1996**; 156:794-803.
- Bregenholt S**, Petersen TR, Claesson MH. The majority of lamina propria CD4(+) T-cells from scid mice with colitis undergo Fas-mediated apoptosis in vivo. *Immunol Lett* **2001**; 78:7-12.
- Brimnes J**, Reimann J, Mogens MH, Claessen MH. Enteric bacterial antigens activate CD4+ T cells from scid mice with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* **2001**; 31:23-31.
- Burns RC**, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Cominelli F, Ley K. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* **2001**; 121:1428-1436.
- Camoglio L**, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* **2000**;

30:1486-1495.

Colombel JF, Rutgeerts P, Malchow H, Jacyna M, Nielsen OH, Rask-Madsen J, Van Deventer S, Ferguson A, Desreumaux P, Forbes A, Geboes K, Melani L, Cohard M. Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* **2001**; 49:42-46.

Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* **1993**; 69:238-249.

Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L, Rawlings DJ, Braun J. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* **2003**; 170:1707-1715.

D'Haens G, Daperno M. Advances in biologic therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* **2006**; 8:506-512.

Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* **2003**; 52:370-376.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* **1998**; 114:385-391.

Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **1994**; 107:1643-1652.

Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology* **2000**; 119:724-733.

Dohi T, Fujihashi K, Rennert PD, Iwatani K, Kiyono H, McGhee JR. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T

helper cell 2-type responses. *J Exp Med* **1999**; 189:1169-1180.

Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* **1997**; 158:566-573.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1995**; 109:1344-1367.

Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* **2005**; 115:3057-3071.

Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**; 288:G1055-G1065.

Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* **2002**; 168:900-908.

Gratz R, Becker S, Sokolowski N, Schumann M, Bass D, Malnick SD. Murine monoclonal anti-TNF antibody administration has a beneficial effect on inflammatory bowel disease that develops in IL-10 knockout mice. *Dig Dis Sci* **2002**; 47:1723-1727.

Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* **1990**; 63:1099-1112.

Herfarth HH, Mohanty SP, Rath HC, Tonkonogy S, Sartor RB. Interleukin 10 suppresses experimental chronic, granulomatous inflammation induced by

bacterial cell wall polymers. *Gut* **1996**; 39:836-845.

Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M, Dieleman LA. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11:977-985.

Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Glickman JN, Nieuwenhuis EE, Nakajima A, Chen D, Fuss IJ, Utku N, Lewicki DN, Becker C, Gallagher TM, Holmes KV, Blumberg RS. Specific regulation of T helper cell 1-mediated murine colitis by CEACAM1. *J Exp Med* **2004**; 199:471-482.

Inoue T, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Matsunaga H, Miyazaki J, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Matsumoto S, Miura S. Blockade of PSGL-1 attenuates CD14⁺ monocytic cell recruitment in intestinal mucosa and ameliorates ileitis in SAMP1/Yit mice. *J Leukoc Biol* **2005**; 77: 287–295.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **1996**; 382:174-177.

Kaser A, Tilg H. Novel therapeutic targets in the treatment of IBD. *Expert Opin Ther Targets* **2008**; 12: 553-563.

Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, Armaka M, Apostolaki M, Pizarro T, Kotlyarov A, Forster I, Flavell R, Gaestel M, Tschlis P, Cominelli F, Kollias G. 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**; 196:1563-1574.

Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **1999**; 10:387-398.

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **1993**; 75:263-274.

Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Hoffmann JC. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J Leukoc Biol* **2007**; 8:168-175.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **2005**; 201:233-240.

Leach MW, Bean AG, Mauze S, Coffman RL, Powrie F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *Am J Pathol* **1996**; 148:1503-1515.

Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Hodgson HJ, Brennan FM. The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol* **2001**; 166:7625–7633.

Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* **2004**; 113:1296-1306.

Mackay F, Browning JL, Lawton P, Shah SA, Comiskey M, Bhan AK, Mizoguchi E, Terhorst C, Simpson SJ. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* **1998**; 115:1464–1475.

MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* **1978**; 17:135-150.

Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Hoang SB, Ross WG, Pizarro TT, Cominelli F. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by

abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100: 8366-8371.

McCall RD, Haskill S, Zimmermann EM, Lund PK, Thompson RC, Sartor RB. Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expresión in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology* **1994**; 106:960-972.

Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**; 288:G1328-1338.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* **1999**; 116:320-326.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Spiekermann GM, Tonegawa S, Nagler-Anderson C, Bhan AK. Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* **1996**; 183:847-856.

Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* **1993**; 75:274-282.

Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Wason JD. 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: 237- 244.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **1989**; 96:795-96803.

Nagahama K, Ogawa A, Shirane K, Shimomura

Y, Sugimoto K, Mizoguchi A. Protein kinase C theta plays a fundamental role in different types of chronic colitis. *Gastroenterology* **2008**; 134:459-469.

Nanno M, Kanari Y, Naito T, Inoue N, Hisamatsu T, Chinen H, Sugimoto K, Shimomura Y, Yamagishi H, Shiohara T, Ueha S, Matsushima K, Suematsu M, Mizoguchi A, Hibi T, Bhan AK, Ishikawa H. Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* **2008**; 134:481-490.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **1990**; 98:694-702.

Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* **1998**; 161:5733-5744.

Pérez-Navarro R, Ballester I, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. *Life Sci* **2005**; 76:1489-1501.

Pizarro TT, Arseneau KO, Cominelli F. Lessons from genetically engineered animal models XI. Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2000**; 278:G665-G669.

Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2002**; 16:933-943.

Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* **1996**; 98:945-953.

Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li

F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* **2001**; 69:2277-2285.

Rivera-Nieves J, Bamias G, Vidrich A, Marini M, Pizarro TT, McDuffie MJ, Moskaluk CA, Cohn SM, Cominelli F. Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* **2003**; 124:972-982.

Rivera-Nieves J, Olson T, Bamias G, Bruce A, Solga M, Knight RF, Hoang S, Cominelli F, Ley K. L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *J Immunol* **2005**; 174: 2343-2352.

Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J, Camuesco D, Lorente MD, Concha A, Martínez-Augustín O, Redondo L, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Nutr* **2003**; 22:463-471.

Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Bradley A, Birnbaumer L. Gai2 protein deficiency: a model of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* **1995**; 15:101S-105S.

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **1993**; 75:253-261.

Sartor RB, Bond TM, Schwab JH. Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infect Immun* **1988**; 56:2101-2108.

Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Jpn J Pharmacol* **1997**; 73:299-309.

Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in

mice. *Curr Protoc Immunol* **2002**; Chapter 15:Unit 15.19.

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* **2003**; 124:26-33.

Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* **1998**; 66:5224-5231.

Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* **1998**; 187:571-578.

Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* **2008**; 118:534-44.

Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* **1994**; 107:1726-1735.

Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* **2003**; 94:965-973.

Te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12:995-999.

Van Montfrans C, Hooijberg E, Rodríguez Pena MS, De Jong EC, Spits H, Te Velde AA, Van Deventer SJ. Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo

interleukin 10 gene transfer. *Gastroenterology* **2002**; 123:1877-1888.

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med* **1998**; 187:389-402.

Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Ueno Y, Tsuchiya M, Ishii H, Aiso S, Habu S, Hibi T. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol* **1997**; 17:282-292.

Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, DaCosta CM, Haldeman KM, Sartor RB, Lund PK. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* **2001**; 120:925-937.

Wirtz S, Becker C, Blumberg R, Galle PR, Neurath MF. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J Immunol* **2002**; 168:411-420.

Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. 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**; 162:1884-1888.

Wirtz S, Neufert C, Weimann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protocol* **2007**; 2:541-546.

Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* **1993**; 17:641-662.

Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham

MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* **1991**; 102:1524-1534.



Capítulo 3

Terapias actuales en la enfermedad inflamatoria intestinal

1.- Tratamientos actuales en la enfermedad inflamatoria intestinal

Los objetivos principales de la terapia farmacológica en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) son promover la remisión del ataque agudo de la enfermedad y reducir la incidencia de recurrencias. Esto se consigue inhibiendo la respuesta inmunológica exacerbada que tiene lugar tanto en la enfermedad de Crohn (EC) como en la colitis ulcerosa (CU), bien actuando sobre el mayor número posible de mediadores proinflamatorios involucrados en la patogénesis de estas enfermedades, o bien actuando en concreto sobre alguno de ellos que posea un papel relevante (capítulo 1 y 2). Algunos de los tratamientos disponibles en la actualidad son los fármacos antiinflamatorios, los inmunosupresores, o las terapias biológicas, que pasaremos a comentar a continuación.

1.1.- Fármacos antiinflamatorios

1.1.1.- Aminosalicilatos

Los aminosalicilatos son fármacos que contienen en su estructura la molécula del ácido **5-aminosalicílico (5-ASA)** o **mesalazina**. Uno de los primeros fármacos empleados es la **sulfasalazina**, en la que a través de un enlace azo, se une una molécula de 5-ASA a otra de sulfapiridina, que actúa de molécula transportadora para asegurar la disponibilidad del 5-ASA en el colon (Desreumaux y Ghosh, 2006). Junto con la sulfasalazina, se han desarrollado nuevas formas de transportar el 5-ASA para solucionar los problemas de toxicidad de la sulfapiridina o para permitir su actuación en localizaciones distintas al intestino grueso (Desreumaux y Ghosh, 2006). Así, en la actualidad se dispone de la **olsalazina**, un dímero compuesto por dos moléculas de 5-ASA unidas mediante enlace azo y que requiere de la reducción bacteriana para liberar el principio activo; también existen las **formas de liberación controlada**, donde el 5-ASA se recubre de una resina acrílica y se disuelve sólo a determinados valores de pH, o las **formas de liberación sostenida**, en las que se forman microgránulos de 5-ASA con una membrana semipermeable de etilcelulosa, que liberan el compuesto de modo continuo; y por último, se puede proceder a la administración del 5-ASA en **forma tópica intrarrectal**: enemas, supositorios, espumas o geles.

Los aminosalicilatos están indicados en los brotes inflamatorios de intensidad leve, tanto en la EC como en la CU (Stein y Hanauer, 1999; Klotz, 2000) y en la prevención de la reactivación de la CU (Sutherland y col., 2000), pero a juzgar por todos los datos clínicos, resulta cada vez más difícil apoyar el uso crónico de la terapia con aminosalicilatos en el mantenimiento de la remisión de la EC (Sutherland, 2000).

El mecanismo de acción de la mesalazina no está del todo definido, aunque diferentes estudios *in vitro* han demostrado su efecto inhibitorio de la inflamación por interferir en la vía del ácido araquidónico, disminuyendo la liberación de leucotrienos (LT),

como el LTB₄, y de prostaglandinas (PG), como la PGE₂ (Tromm y col., 1999), y por disminuir los radicales libres de oxígeno (Small y Schraa, 1994). Otras propiedades incluyen cambios en la producción de inmunoglobulinas (Ig), una disminución de la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *tumor necrosis factor α*), la IL-1 β y la IL-2, y una parcial inhibición de la expresión del factor activador de plaquetas (PAF, *platelet activating factor*), llevando a una menor infiltración leucocitaria (MacDermott, 2000), que preserva la funcionalidad del enterocito. Parece ser que todas estas acciones de los aminosalicilatos se deben a una inhibición de la vía del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*) (Weber y col., 2000) y a la inducción de apoptosis en linfocitos T (Liptay y col., 1999).

1.1.2.- Corticoides

Los corticoides, tales como **prednisona**, **prednisolona** o **metilprednisolona**, constituyen el tratamiento de elección de los brotes moderados y graves de la enfermedad y en los casos de falta de respuesta a los salicilatos (Hanauer y Sandbord, 2001). La principal limitación de la utilización de estos fármacos es el elevado riesgo de reacciones adversas de tipo sistémico en tratamientos prolongados, y por este motivo, se han desarrollado corticoides de administración oral o rectal de actuación local, efectivos en EII y a la vez con menor número de reacciones adversas sistémicas. Éste es el caso de la **budesonida**, indicada en la EC ileal o ileocecal, de intensidad leve o leve-moderada (Kozuch y Hanauer, 2008), y en la CU activa (Kolkman y col., 2004). Sin embargo, hay que destacar que en un 20-30% de los casos o bien no hay respuesta (corticorrefractoriedad) o bien se produce una reactivación de la enfermedad cuando se suspende el tratamiento con el glucocorticoide (corticoddependencia), por lo que es necesario aplicar otros tratamientos (Ho y col., 2006).

En general, los corticoides poseen un espectro amplio de actuación sobre el sistema inmunitario, incluyendo la inhibición de la transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12, IL-8, etc., la inhibición del reclutamiento y la proliferación de linfocitos, monocitos y macrófagos, la disminución de la migración de neutrófilos hacia los lugares de inflamación, junto con la supresión del metabolismo del ácido araquidónico, y la estimulación de la apoptosis de linfocitos de la lámina propia del intestino (Franchimont, 2004; Katz, 2004). Todas estas propiedades hacen que los corticoides sean una terapia de elección en el tratamiento de la EII.

1.2.- Inmunosupresores

Entre los fármacos inmunosupresores se encuentran: azatioprina y 6-mercaptopurina, metotrexato, y ciclosporina A (CsA).

La **azatioprina**, cuando se administra de forma oral, es metabolizada *in vivo* para dar el metabolito activo 6-mercaptopurina. Entonces, inhibe la síntesis celular de purinas, las interconversiones de nucleótidos, la síntesis de ARN y ADN, así como la replicación cromosómica (Wright y col., 2004). Todo este conjunto de procesos hacen que se inhiba la proliferación en linfocitos activados en la EII, y además, recientemente se ha mostrado que es capaz de inducir apoptosis en estas células (Schroll y col., 2005). Tanto la azatioprina como la 6-mercaptopurina son eficaces en la inducción de la remisión y en el mantenimiento de la misma, tanto en la CU como en la EC (Sandborn y col., 2000). La principal indicación de estos fármacos radica en los pacientes que necesitan una terapia esteroidea continuada, ya que son capaces de disminuir la necesidad de corticoesteroides (Chebli y col., 2007). Una de las principales reacciones adversas de estos fármacos y que impide su utilización en algunas ocasiones, es la posibilidad de generación de pancreatitis, aunque es reversible al suspender el tratamiento (Bermejo y col., 2008).

El **metotrexato** se utiliza, en administración intramuscular, en caso de intolerancia o falta de respuesta a la azatioprina o a la 6-mercaptopurina y es eficaz, tanto en la EC activa, como en el mantenimiento de la remisión (Feagan y col., 2000). En el caso de la CU, se necesitan estudios más amplios para comprobar sus efectos beneficiosos. El mecanismo de acción de metotrexato no se conoce del todo, pero parece ser que inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias y favorece la apoptosis de linfocitos (Gerards y col., 2003; Kozuch y Hanauer, 2008).

La **CsA** se ha utilizado principalmente en los brotes corticorretractarios de la CU (Lichtiger y col., 1994) y en la EC fistulizante (Present y Lichtiger, 1994). Este fármaco provoca una disminución de la activación y la proliferación de linfocitos, por bloqueo de la síntesis de IL-2 a través de la vía de la calcineurina (Sandborn y Tremaine, 1992). La molécula forma un complejo con ciclofilina, uniéndose después a calcineurina e impidiendo la activación del factor de transcripción nuclear de linfocitos T activados (NFAT, *nuclear factor of activated T-lymphocytes*). Entonces, el NFAT es incapaz de entrar en el núcleo para unirse al ADN y provocar la transcripción de citocinas como IL-2 o IFN γ (Sandborn y Tremaine, 1992), alterando así la función de las células T y B. También, ejerce acciones adicionales en otros componentes como en neutrófilos y en mastocitos, inhibiendo la infiltración y la permeabilidad vascular (Thomson, 1992). La CsA, además, induce apoptosis en linfocitos T por reducción del número de células Bcl-2 positivas (Ying y col., 2003), por lo que se puede utilizar sola o en combinación con otros agentes, como rapamicina, en pacientes con EII que pueden desarrollar un cáncer asociado a la enfermedad (Kountouras y col., 2004). En el tratamiento con CsA se debe tener especial cuidado, ya que presenta problemas de toxicidad renal y neurológica, y pueden producirse infecciones oportunistas (Rayner y col., 2003).

1.3.- *Terapias biológicas*

Se incluyen en este grupo diferentes estrategias, por un lado el bloqueo de la acción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-6 o IL-12 y por otro lado, la interferencia en el reclutamiento de células inflamatorias mediante anticuerpos frente a moléculas de adhesión.

Dado el importante papel del TNF α en el desarrollo de la EII, esta citocina constituye una diana clave en el tratamiento de estos procesos crónicos. El **infliximab** es un anticuerpo monoclonal anti-TNF α quimérico (ratón-hombre), y el **CDP571** y el **adalimumab** son anticuerpos monoclonales con mayor proporción humanizada. Además del bloqueo del TNF α , estos tres fármacos son capaces de inducir apoptosis en monocitos y linfocitos (Lügering y col., 2006), propiedades que los convierte en compuestos útiles para la inducción de la remisión de la EC y la CU activa (Targan y col., 1997; Rutgeerts y col., 2005; Sandborn y col., 2007) y el infliximab también ha demostrado ser eficaz en el mantenimiento de remisión a corto plazo (Hanauer y col., 2002). Sin embargo, la principal limitación de infliximab la constituye el desarrollo de anticuerpos anti-quiméricos (Kuhbacher y Fölsch, 2007). Por eso, se espera que los otros dos compuestos tengan menos problemas por encontrarse humanizados, pero se necesitan más estudios para confirmarlo. Lo más apropiado es reservar infliximab como tratamiento para individuos que no toleren o no hayan respondido a otros tratamientos farmacológicos convencionales (Kuhbacher y Fölsch, 2007).

Igualmente se están desarrollando anticuerpos frente a otras citocinas proinflamatorias, como por ejemplo el **MRA**, un anticuerpo monoclonal humanizado frente al receptor soluble de IL-6 (IL-6R). Se ha encontrado una elevada concentración de IL-6R en pacientes con EC (Reinecker y col., 1993), y el tratamiento con MRA ha sido ensayado en la EC con buenos resultados (Ito y col., 2004). Además, tanto **fontolizumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado frente al IFN γ (Hommes y col., 2006), como **J695** (ABT-874) un anticuerpo monoclonal humano frente a IL-12 (Mannon y col., 2004), han mostrado ser efectivos en la EC. Por otro lado, la terapia antiCD4 con el uso de anticuerpos monoclonales como **cM-T412**, **MAX.16H5** y **BF-5** que actúan sobre linfocitos T CD4⁺, ha inducido remisión en pacientes tanto con EC como con CU (Ardizzone y Porro, 2002). Con el objeto de inhibir la proliferación de células T se han desarrollado anticuerpos frente al receptor de IL-2, **daclizumab** o **basiliximab**, obteniendo buenos resultados en la CU (Van Assche y col., 2003; Creed y col., 2003). Por último, **natalizumab** es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado frente a α 4-integrina, que inhibe la migración transendotelial, y que ha demostrado ser eficaz en la remisión, tanto en pacientes de EC (Gordon y col., 2001) como de CU (Sandborn y Yednock, 2003).

2.- Terapia en la enfermedad inflamatoria intestinal

Como resumen del protocolo de administración en la EII (Figuras 1 y 2), podemos considerar que sólo una minoría de los pacientes con enfermedad activa son candidatos adecuados a tratamiento con 5-ASA, en concreto, los que presentan una enfermedad leve localizada en el colon. Cuando los pacientes presentan una patología de intensidad moderada deben pasar a tratarse con corticoides orales o en enemas como budesonida, y cuando la afectación colónica es más extensa, los pacientes no responden a budesonida o 5-ASA o presentan una enfermedad muy activa, deben recibir prednisona o esteroides parenterales. Entonces, si no se consigue controlar la actividad de la enfermedad con estos fármacos, está indicada la adición de azatioprina, metotrexato, infliximab o existe la necesidad de cirugía.

Los individuos que responden a terapia glucocorticoidea deben dejar los esteroides en un plazo de 12-16 semanas, y si no se logra interrumpir el tratamiento satisfactoriamente sin reactivación de la enfermedad (enfermedad dependiente de esteroides), está justificada la introducción de azatioprina (o 6-mercaptopurina) o metotrexato, para disminuir la necesidad de glucocorticoides. Por otra parte, los individuos con recidivas frecuentes son candidatos a terapia a largo plazo con uno de los antimetabolitos de purina o metotrexato. La cirugía sigue siendo el tratamiento más eficaz.

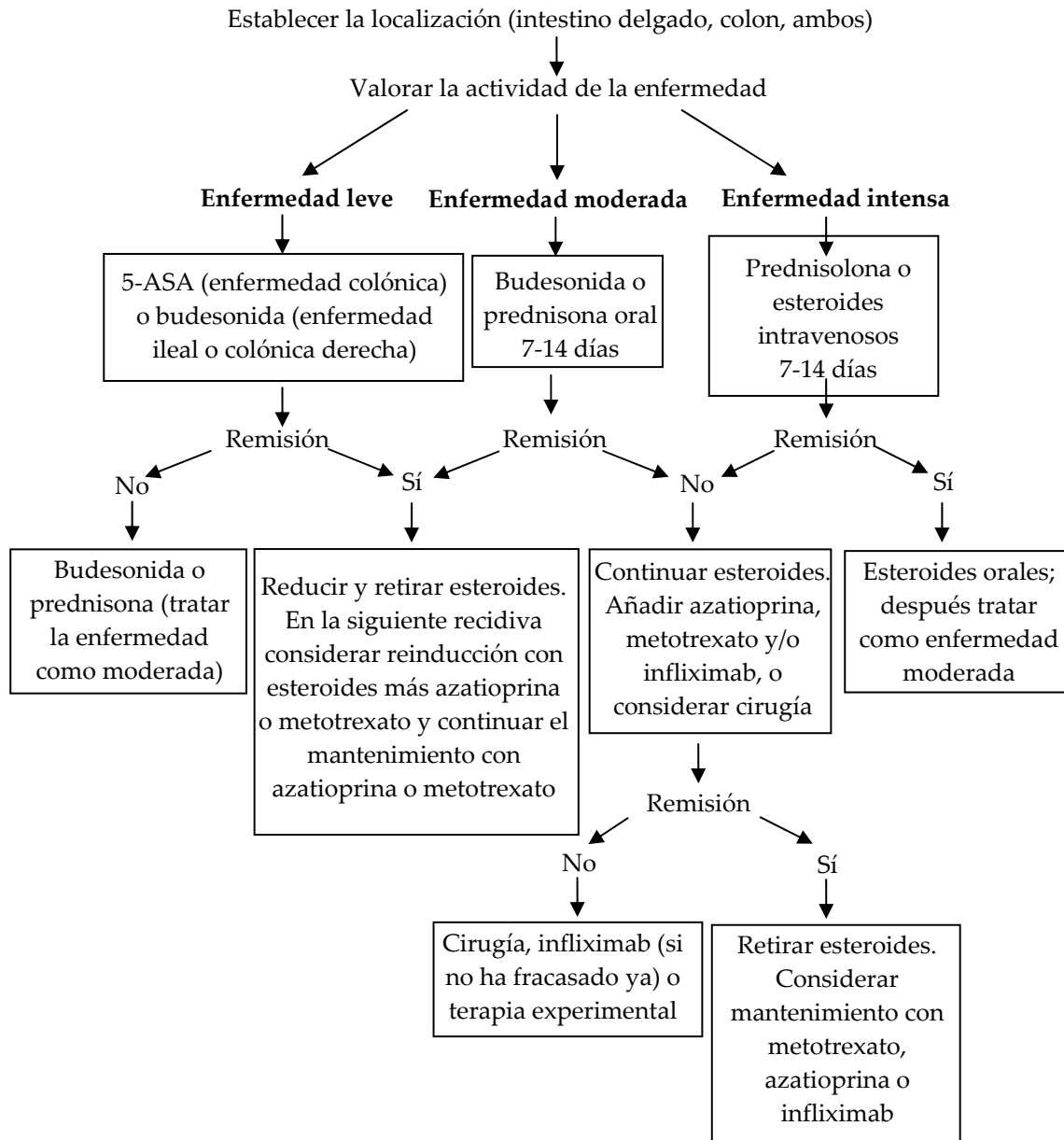


Figura 1: Propuesta de tratamiento para la EC.

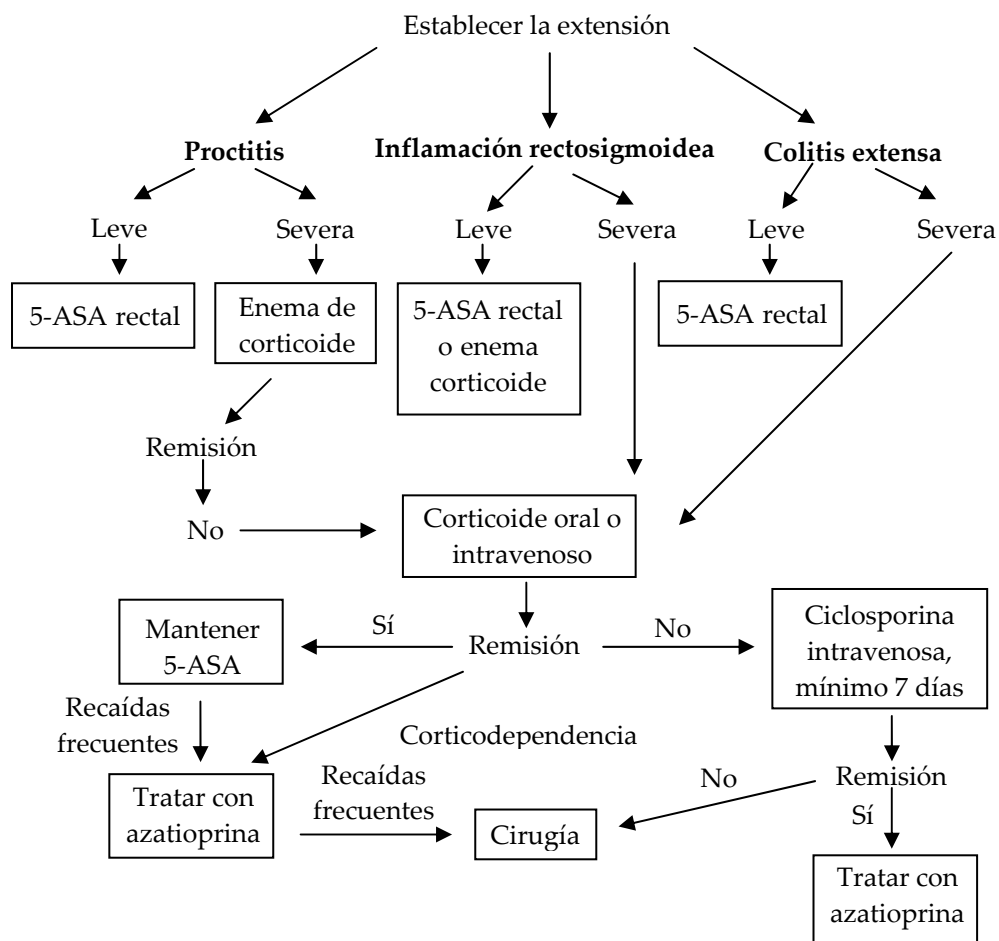


Figura 2: Propuesta de tratamiento para la CU.

Referencias

- Ardizzone S**, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* **2002**; 252:475-496.
- Bernejo F**, Lopez-Sanroman A, Taxonera C, Gisbert JP, Pérez-Calle JL, Vera I, Menchén L, Martín-Arranz MD, Opio V, Carneros JA, Van-Domselaar M, Mendoza JL, Luna M, López P, Calvo M, Algaba A. Acute pancreatitis in inflammatory bowel disease, with special reference to azathioprine-induced pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**; 28:623-628.
- Chebli JM**, Gaburri PD, De Souza AF, Pinto AL, Chebli LA, Felga GE, Forn CG, Pimentel CF. Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. *J Gastroenterol Hepatol* **2007**; 22:268-274.
- Creed TJ**, Norman MR, Probert CS, Harvey RF, Shaw IS, Smithson J, Anderson J, Moorghen M, Gupta J, Shepherd NA, Dayan CM, Hearing SD. Basiliximab (anti-CD25) in combination with steroids may be an effective new treatment for steroid-resistant ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**; 18:65-75.
- Desreumaux P**, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. *Aliment Pharmacol Ther* **2006**; 24 Suppl 1:2-9.
- Feagan BG**, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Koval J, Wong CJ. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's study group investigators. *N Engl J Med* **2000**; 342:1627-1632.
- Franchimont D**. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* **2004**; 1024:124-137.
- Gerards AH**, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **2003**; 42:1189-1196.
- Gordon FH**, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, Donoghue S, Greenlees C, Subhani J, Amlot PL, Pounder RE. A randomized placebo-controlled trial of humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **2001**; 121:268-274.
- Hanauer SB**, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P; ACCENT I study group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **2002**; 359:1541-1549.
- Hanauer SB**, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* **2001**; 96:635-643.
- Ho GT**, Chiam P, Drummond H, Loane J, et al. The efficacy of corticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: analysis of a 5-year UK inception cohort. *Aliment Pharmacol Ther* **2006**; 24:319-330.
- Hommes DW**, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zákuciová M, D'Haens G, Van Assche G, Ba S, Lee S, Pearce T. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **2006**; 55:1131-1137.
- Klotz U**. The role of aminosalicylates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Pharmacol* **2000**; 56:353-362.
- Kolkman JJ**, Möllmann HW, Möllmann AC, Pena AS, Greinwald R, Tauschel HD, Hochhaus G. Evaluation of oral budesonide in the treatment of active distal ulcerative colitis. *Drugs*

Today (Barc) **2004**; 40:589-601.

Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Immunomodulatory benefits of cyclosporine A in inflammatory bowel disease. *J Cell Mol Med* **2004**; 8:317-328.

Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol* **2008**; 14:354-377.

Kuhbacher T, Fölsch UR. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2007**; 13:1149-1155.

Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, Michelassi F, Hanauer S. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* **1994**; 330:1841-1845.

Liptay S, Bachem M, Hacker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol* **1999**; 128:1361-1369.

Lügering A, Lebiez P, Koch S, Kucharzik T. Apoptosis as a therapeutic tool in IBD? *Ann N Y Acad Sci* **2006**; 1072:62-77.

MacDermott RP. Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95:3343-3345.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's disease study group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **2004**; 351:2069-2079.

Present DH, Lichtiger S. Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **1994**; 39:374-380.

Rayner CK, McCormack G, Emmanuel AV,

Kamm MA. Longterm results of low-dose intravenous cyclosporine for acute severe ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**; 18:303-308.

Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* **1993**; 94:174-181.

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* **2005**; 53:2462-24.

Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, Rosenfeld MR, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* **2007**; 146:829-838.

Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**; CD000545.

Sandborn WJ, Tremaine WJ. Cyclosporine treatment of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* **1992**; 67:981-990.

Sandborn WJ, Yednock TA. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. *Am J Gastroenterol* **2003**; 98:2372-2382.

Schroll S, Sarlette A, Ahrens K, Manns MP, Goke M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium in vitro. *Regul Pept* **2005**; 131:1-11.

Small RE, Schraa CC. Chemistry, pharmacology,

pharmacokinetics, and clinical applications of mesalamine for the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacotherapy* **1994**; 14:385-398.

Sutherland L, Roth D, Beck P, May G, Makiyama K. Oral 5-aminosalicylic acid for maintaining remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* **2000**; CD000544.

Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* **2000**; 23:429-448.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **1997**; 337:1029-1035.

Thomson AW. The effects of cyclosporin A on non-T cell components of the immune system. *J Autoimmun* **1992**; 5:167-176.

Tromm A, Griga T, May B. Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties. *Hepatogastroenterology* **1999**; 46:3124-3135.

Van Asshe G, Dalle I, Noman M, Aerden I, Swijsen C, Asnong K, Maes B, Ceuppens J, Geboes K, Rutgeerts P. A pilot Study on the use of the humanized anti-interleukin-2 receptor antibody daclizumab in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **2003**; 98:369-376.

Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* **2000**; 119:1209-1218.

Wright S, Sanders DS, Lobo AJ, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* **2004**; 53:1123-1128.

Ying S, Khan LN, Meng Q, Barnes NC, Kay AB. Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and

expression of Bcl-2 in asthmatics. *Eur Respir J* **2003**; 22:207-212.



Capítulo 4

*Posibles estrategias farmacológicas en
la enfermedad inflamatoria intestinal*
Objetivos

A pesar del amplio abanico de posibilidades terapéuticas, aún no existe un tratamiento ideal para la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), con un perfil adecuado de eficacia y seguridad, y, por esta razón, existe una necesidad de desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos eficaces y exentos de reacciones adversas como terapia para la EII. Un tratamiento eficaz será aquel que restablezca algunas de las alteraciones que tienen lugar en la EII, tanto a nivel de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa (capítulo 1). Por eso, se intentan desarrollar compuestos que sean capaces de disminuir la actividad de las células epiteliales, los macrófagos y/o los linfocitos, inhibiendo la producción y liberación de citocinas (factor de necrosis tumoral (TNF α , *tumor necrosis factor α*), IL-12, IL-2, IL-6) y de otros mediadores proinflamatorios (óxido nítrico (NO, *nitric oxide*), prostaglandinas (PG)).

Los fármacos antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs), como la aspirina, el ibuprofeno, o el celecoxib, provocan una inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), sobre todo en sus principales dianas, macrófagos y neutrófilos, disminuyendo así la producción de PG y tromboxanos (TX). Además, se ha observado que estos fármacos poseen acciones adicionales como suprimir la proliferación, la expresión de marcadores de superficie como CD25 y CD71 y la producción de citocinas como IL-2, IFN γ y TNF α en linfocitos T (Iñiguez y col., 1999). Todas estas actividades se correlacionan con la capacidad de algunos AINEs como la aspirina, el ibuprofeno, o el celecoxib, para bloquear los factores de transcripción requeridos para la expresión de genes inducibles después de la estimulación del receptor de células T (TCR, *T cells receptor*) por antígenos, es el caso de la inhibición del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*), el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT, *nuclear factor of activated T-lymphocytes*), la proteína activadora 1 (AP-1, *activator protein 1*) y la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) (Aceves y col., 2004; Dong y col., 1997; Iñiguez y col., 1999; Kopp y Ghosh, 1994; Paccani y col., 2002). Todas estas acciones harían de los AINEs buenos candidatos para disminuir la respuesta exacerbada que tiene lugar en la EII, pero, sin embargo, estos fármacos se han asociado con exacerbaciones en la CU y la EC (Thiéfin y Beaugerie, 2005). El mecanismo no está claro, pero parece ser que están implicadas las PG, ya que tienen como función proteger al intestino y los AINEs inhiben su formación (Felder y col., 2000).

Otro fármaco del grupo de los AINEs es el triflusal, un antiagregante plaquetario relacionado estructuralmente con los salicilatos. Tanto triflusal como su metabolito activo, el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico (HTB), poseen propiedades antioxidantes (González-Correa y col., 2004), disminuyen la síntesis de PG por la inhibición de la expresión de la COX-2 (Fernández de Arriba y col., 1999), provocan una inhibición del factor de transcripción NF κ B y de mediadores inflamatorios inducidos por éste, como IL-1 β y TNF α (Bayón y col., 1999). Sin embargo, no se han realizado estudios en EII.

Con el fin de solventar los diferentes problemas de eficacia y seguridad de todos estos fármacos antiinflamatorios, y teniendo en cuenta que los diferentes AINEs y

salicilatos son capaces de inhibir la respuesta inmunitaria de las diversas células que participan en los procesos inflamatorios, se pensó en obtener un derivado de estos compuestos para evaluar su posible actividad antiinflamatoria intestinal. Se trata del **UR-1505**, el ácido 2-hidroxi-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)-benzoico, químicamente relacionado con el ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) y el HTB (ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico) (Figura 1), y que ha sido sintetizado y desarrollado por la empresa farmacéutica Palau Pharma S. A.

Los estudios previos realizados con el UR-1505 demostraron su actividad inhibidora de la proliferación de linfocitos T (Fernández de Arriba y col., 2005), lo que permitió considerarlo un buen candidato para comprobar su posible acción antiinflamatoria intestinal. Igualmente, se demostró, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el compuesto es absorbido en el intestino, siendo su biodisponibilidad en ratas aproximadamente del 100%, así el 96,9% de la dosis administrada (en el rango de 10 a 50 mg/kg), es absorbida en el intestino delgado, obteniendo concentraciones plasmáticas bastante elevadas (100-300 μM). Además, su vida media es relativamente larga, del rango de 6 a 9 horas.

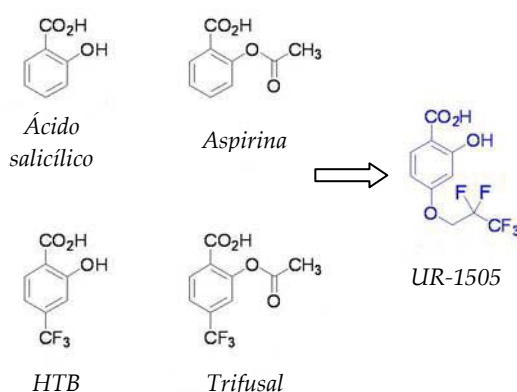


Figura 1: El UR-1505, un salicilato derivado del ácido salicílico y del HTB.

Objetivos

En esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto abordar el estudio de este nuevo compuesto, el UR-1505, como agente modulador de la respuesta inflamatoria. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

- 1.- Evaluar las propiedades inmunomoduladoras que el UR-1505 puede ejercer a nivel *in vitro* en las distintas células del sistema inmunitario que participan en la respuesta inflamatoria intestinal (células epiteliales intestinales, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B), lo que nos permitirá determinar la especificidad

celular del compuesto. Además, se observará el mecanismo de acción responsable de las acciones inmunomoduladoras, mediante el estudio de las distintas vías de señalización que puedan estar implicadas.

2.- Comprobar la actividad antiinflamatoria intestinal del UR-1505 en diferentes modelos experimentales de colitis en rata, permitiendo así profundizar en el mecanismo de acción *in vivo*. Los modelos utilizados han sido los siguientes:

a.- Fase aguda y crónica de colitis experimental inducida en ratas por administración del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS).

b.- Fase aguda y establecida de colitis experimental inducida en ratas mediante la ingesta de sulfato de dextrano sódico (DSS).

Estos modelos producen un proceso inflamatorio que se asemeja tanto bioquímica como histológicamente a la EII en humanos, siendo aceptados para la valoración de fármacos potencialmente útiles en esta enfermedad (capítulo 2, apartado 1, Modelos de colitis inducidos químicamente).

Referencias

Aceves M, Dueñas A, Gómez C, San Vicente E, Crespo MS, García-Rodríguez C. A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *J Immunol* **2004**; 173:5721-5729.

Bayón Y, Alonso A, Sánchez Crespo M. 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor κ B activation. *Br J Pharmacol* **1999**; 126:1359-1366.

Dong Z, Huang C, Brown RE, Ma WY. Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin. *J Biol Chem* **1997**; 272:9962-9970.

Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis AP, Gleim G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95:1949-1954.

Fernández de Arriba A, Ramis I, Bailón E, Comalada M, Gálvez J, Zarzuelo A, Merlos M. UR-1505, a new immunomodulator, inhibits lymphocyte proliferation and cytokine production. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **2005**; 27:151.

González-Correa JA, Arrebola MM, Ureña MI, et al. Effects of triflusal on oxidative stress, prostaglandin production and nitric oxide pathway in a model of anoxia-reoxygenation in rat brain slices. *Brain Res* **2004**; 102:148-155.

Iñiguez MA, Punzón C, Fresno M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol* **1999**; 163:111-119.

Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **1994**; 265:956-959.

Paccani SR, Boncristiano M, Olivieri C, D'Elis

MM, Del Prete G, Baldari CT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem* **2002**; 277:1509-1513.

Thiéfin G, Beaugerie L. Toxic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint Bone Spine* **2005**; 72:286-294.



Capítulo 5

UR-1505, a New Salicylate, Blocks T cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells

Mol Pharmacol. 72: 269-279. 2007

UR-1505, un nuevo salicilato, bloquea la activación de linfocitos T a través del factor nuclear de linfocitos T activados

Objetivos:

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el mecanismo de acción específico por el cual el UR-1505 (ácido 2-hidroxi-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxi)-benzoico) inhibe la proliferación y activación de los linfocitos T. El UR-1505 es una nueva molécula sintetizada por Palau Pharma S.A. y químicamente relacionada con el ácido salicílico.

Resultados:

Para determinar el mecanismo de acción del compuesto sobre los linfocitos T se realizaron estudios *in vitro* en cultivos primarios de linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana, estimulados con anti-CD3 y anti-CD28, provocando así la activación y proliferación de estas células a través de la unión al receptor específico de células T (TCR, *T cells receptor*). Paralelamente, se utilizaron las líneas celulares Jurkat T, linfocitos T humanos leucémicos, estimulados con PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) y el ionóforo de calcio, Ionomicina (Io), y las células HeLa, células epiteliales humanas procedentes de carcinoma cervical, estimuladas con Io, que permiten evaluar los distintos factores de transcripción implicados en la activación de linfocitos.

Para completar nuestros resultados, decidimos comparar los efectos del UR-1505 con otras moléculas relacionadas como la ciclosporina A (CsA), inmunosupresor e inhibidor selectivo de la calcineurina que bloquea la activación del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT, *nuclear factor of activated T-lymphocytes*), y con el ácido salicílico (AS), compuesto del cual deriva el UR-1505.

Los resultados obtenidos demostraron que el UR-1505 inhibe la proliferación y la producción de citocinas en los linfocitos T humanos de sangre periférica y en Jurkat T, estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 y PMA/Io respectivamente, mediante el bloqueo de la unión al ADN del NFAT. El efecto del UR-1505 (100-300 μ M) sobre la proliferación de linfocitos T es dependiente del estímulo, ya que el compuesto inhibe la proliferación inducida por anti-CD3/anti-CD28, incrementando los niveles de p27^{KIP}, e induce una parada celular en G1/S. Sin embargo, es incapaz de inhibir la proliferación inducida por la vía JAK/STAT (JAK, Janus tirosina kinasa, *Janus tyrosine kinase*/STAT, transductor de señal y activador de la transcripción, *signal transducers and activator of transcription*), por lo que podemos sugerir que el UR-1505 actúa con un mecanismo específico inhibiendo la activación de células T dependiente del TCR.

La inhibición de la proliferación celular producida por el UR-1505 en linfocitos T activados, también se correspondió con una disminución de la producción de citocinas, tanto Th1 como Th2. El efecto más importante observado en linfocitos T humanos de sangre periférica fue la disminución de IL-5 e IFN γ a partir de las 24 horas, efecto producido a nivel transcripcional; sin embargo, la producción de IL-4 y TNF α sólo se vio modificada a la concentración de 300 μ M, y la disminución no llegó a ser significativa hasta las 72 horas de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28.

El siguiente paso fue estudiar la acción del UR-1505 sobre los principales factores de transcripción involucrados en la activación de linfocitos T, como son el NFAT, el factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B, *nuclear factor κ B*) y la proteína activadora-1 (AP-1, *activator protein 1*), responsables de la expresión de la mayoría de citocinas analizadas. Se comprobó que el producto específicamente inhibió la unión al ADN del NFAT en linfocitos T humanos de sangre periférica y Jurkat T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y PMA/Io, respectivamente, sin afectar la actividad del NF κ B ni de AP-1. El efecto del UR-1505 sobre este factor de transcripción no se atribuyó al bloqueo de la importación ni de la exportación nuclear, ya que no se modificó la translocación del NFAT hacia el núcleo en las células HeLa por estimulación con Io, ni la unión al ADN en Jurkat T cuando se incorporó el inhibidor de la exportina, la leptomicina B. Además, no se afectó la actividad de las quinasas p38, la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase*) y la caseína quinasa-1 (CK-1, *casein kinase 1*), que son las principales proteínas implicadas en la exportación del NFAT.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que la CsA (1 μ M) inhibió la proliferación y la producción de IL-5 e IFN γ en linfocitos T activados, como lo hizo también el UR-1505, y aunque los dos compuestos inhibieron el NFAT, la CsA también provocó un efecto de inhibición parcial del NF κ B. El AS (300-500 μ M) no mostró actividad antiproliferativa en linfocitos T humanos de sangre periférica.

Conclusión:

El UR-1505 es una nueva molécula inmunosupresora con un mecanismo de acción diferente a CsA y AS, que inhibe específicamente la activación del NFAT en linfocitos T humanos de sangre periférica y Jurkat T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y PMA/Io, respectivamente, mediante un bloqueo de la unión del factor de transcripción al ADN, y esto provoca una disminución de la proliferación y de la producción de citocinas en estas células.

UR-1505, a New Salicylate, Blocks T Cell Activation through Nuclear Factor of Activated T Cells

Juan Román, Alberto Fernández de Arriba, Sonia Barrón, Pedro Michelena, Marta Giral, Manuel Merlos, Elvira Bailón, Mònica Comalada, Julio Gálvez, Antonio Zarzuelo, and Isabel Ramis

Palau Pharma, S.A., Pharmacology & Toxicology, Palau-solità i Plegamans, Barcelona, Spain (J.R., A.F.A., S.B., P.M., M.G., M.M., I.R.); and Department of Pharmacology, Centro de Investigación Biomédica en Red-Enfermedades Hepáticas y Digestivas, School of Pharmacy, University of Granada, Spain (E.B., M.C., J.G., A.Z.)

Received February 14, 2007; accepted May 2, 2007

ABSTRACT

2-Hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)-benzoic acid (UR-1505), a new molecule chemically related to salicylic acid, has immunomodulator properties and is currently under clinical development for treatment of atopic dermatitis. The present work describes the immunomodulatory profile of UR-1505. UR-1505 targets T cells, inhibiting their proliferation and cytokine production by blocking nuclear factor of activated T cells (NF-AT) DNA-binding activity. The effects of UR-1505 (100–300 μ M) on T cell proliferation seems to be dependent on the stimulus, because UR-1505 inhibited CD3/CD28-induced T-cell proliferation, increased p27^{KIP} levels, and induced G₁/S cell arrest but, interestingly, did not inhibit the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription-induced T-cell proliferation. These data suggest that UR-1505 acts by means of a specific mechanism inhibiting T cell activation depending on T cell receptor signaling pathway. Furthermore, the

antiproliferative effects of UR-1505 are not a consequence of decreased cell viability. In addition to the inhibition of T-cell proliferation, UR-1505 decreased, in a dose-dependent manner, the production of interleukin (IL)-5 and interferon (IFN)- γ in activated T cells, and this effect was produced at the transcriptional level. Because T-cell proliferation and cytokine production were regulated through NF-AT, we examined the effect of UR-1505 on this transcription factor. According to its effect on IL-5 and IFN- γ mRNA expression, UR-1505 specifically inhibited NF-AT DNA binding without effect on nuclear factor- κ B and activator protein-1 activities. The effect of UR-1505 on NF-AT is not attributable to a blockade of nuclear import. In conclusion, UR-1505 is a new immunomodulator agent that specifically inhibits NF-AT activation. Because NF-AT regulates the transcription of most genes involved in lymphocyte activation, its selective inactivation results in both decreased T-cell proliferation and cytokine production.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used. It has only recently been accepted that the therapeutic effects of NSAIDs, salicylates included, were a consequence of the inhibition of cyclooxygenase (COX) activity, preventing the production of prostaglandins. However, evidence has begun to show that additional mechanisms, independent of COX inhibition, are involved in the anti-inflammatory properties of salicylates (Tegeger et al., 2001).

These additional and COX-independent, effects of salicylates mainly lead to an attenuation of pro-inflammatory gene expression by inhibiting different signal pathways (Tegeger et al., 2001). In that sense, the most well known is the inhibition of NF- κ B activation (Kopp and Ghosh, 1994). Another effect of salicylates on transcription factor activity is the inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein β and STAT-6 transcription factors (Perez-G et al., 2002). In addition to their effects on gene expression, acetylsalicylic acid is reported to block T-cell activation (Paccani et al., 2002), which plays a key and central role in autoimmune diseases. However, this effect was observed at supraphysiological concentrations. Knowing the key role of T-cell activation in autoimmune diseases, the blockade of T cell activation and

This study was funded by J Uriach y Compañía SA. M.C. is a recipient of Juan de la Cierva Program from Spanish Ministry of Science and Technology. E.B. is a recipient of a fellowship from the Ministry of Science and Technology, Spain.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
 doi:10.1124/mol.107.035212.

ABBREVIATIONS: NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; COX, cyclooxygenase; NF- κ B, nuclear factor- κ B; STAT, signal transducer and activator of transcription; CsA, cyclosporin A; UR-1505, 2-hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)benzoic acid; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; AP-1, activator protein 1; IL, interleukin; IFN, interferon; FBS, fetal bovine serum; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; FACS, fluorescence-activated cell sorting; JAK, Janus tyrosine kinase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Cdk, cyclin-dependent kinase; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; TCR, T cell receptor; rh, recombinant human.

270 Roman et al.

subsequent cytokine production may be a useful treatment for autoimmune diseases. In fact, several immunosuppressive agents, such as methotrexate, cyclosporin A (CsA), or tacrolimus, are used for the treatment of autoimmune diseases (Saxne and Wollheim, 2003; Gremese and Ferraccioli, 2004; Pacor et al., 2004).

UR-1505 (Fig. 1) is a novel pentafluoropropoxy derivative of salicylic acid that has been selected from a series of salicylate derivatives, according to their activity as inhibitors of lymphocyte activation. These effects may be mediated through the nuclear factor of activated T cells (NF-AT) because this transcription factor is known to mediate the expression of the majority of genes expressed in lymphocytes as well as lymphocyte proliferation. The anti-inflammatory properties of UR-1505 in the trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis model will be reported elsewhere (E. Bailón, D. Camuesco, A. Nieto, Á. Concha, A. Fernandez de Arriba, J. Roman, I. Ramis, M. Merlos, A. Zarzuelo, J. Galvez, et al., manuscript in preparation), and it is suggested that the anti-inflammatory effect was mediated by blocking of Th1-cell activation.

The NF-AT family of transcription factors comprises five proteins evolutionary related to Rel/NF- κ B family. Four proteins NF-ATc2 (NF-AT1), NF-ATc1 (NF-AT2), NF-ATc3 (NF-AT4), and NF-ATc4 (NF-AT3) are dependent on Ca^{2+} /calmodulin-dependent serine phosphatase calcineurin (Rao et al., 1997; Hogan et al., 2006), whereas the fifth (NF-AT5) is not regulated by calcineurin. Among these, NF-AT1 and NF-AT2 are the most expressed NF-AT proteins in mature T cells, regulating the expression of most, if not all, cytokines expressed by T cells. Activation of these members is regulated by their subcellular localization. In resting T cells, without Ca^{2+} signaling, NF-AT proteins are highly phosphorylated, remaining in the cytoplasm. Once activated, cytoplasmic Ca^{2+} levels increase, and calcineurin becomes activated and dephosphorylates NF-AT proteins, which exposes the nuclear localization signal and masks the nuclear export signal, with the consequent nuclear import of NF-AT. In the nucleus, NF-AT proteins bind to the DNA and regulate the gene transcription in cooperation with other transcription factors, such as AP-1 (Rao et al., 1997; Serfling et al., 2000; Macian, 2005). Once in the nucleus, NF-AT activity is down-regulated by means of serine/threonine kinases that phosphorylate NF-AT proteins, promoting their export to the cytoplasm.

NF-AT proteins are expressed not only in T cells but also in other immune cell types, such as B cells (Choi et al., 1994), mast cells (Prieschl et al., 1995), and natural killer cells (Aramburu et al., 1995). NF-AT is essential for T-cell activation and regulates cell-cycle control (Macian, 2005) and the production and expression of cytokines involved in the immune response (IL-2, IL-5, IL-4, IFN- γ , and others) (Serfling et al., 2000).

The aim of this study was to determine the effects of

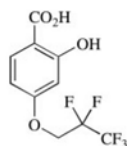


Fig. 1. Chemical structure of UR-1505.

UR-1505 on T-cell activation in both T cell proliferation and cytokine production.

Materials and Methods

Reagents. RPMI 1640 and other cellular culture products were obtained from Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). All chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO) unless otherwise indicated. UR-1505 was synthesized at J. Uriach y Compañía, S.A (Barcelona, Spain).

ELISA kits for IL-5, CycleTEST Plus DNA reagent kit, Transfactor kits for p65, and NF-ATc1 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA). The WST-1 kit was obtained from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain). The NF-AT activation kit was obtained from Cellomics (Pittsburgh, PA). Cell Proliferation Biotrak ELISA System was from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK). Bradford reagent was from Bio-Rad Laboratories (Munich, Germany). TRIzol reagent was from Invitrogen. Anti CD28 and anti CD3 were from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Cell Culture and Treatment. Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C. Experiments with Jurkat cells were performed in RPMI 1640 medium and 2% FBS. Jurkat cells were stimulated with PMA (50 nM) and ionomycin (3 μ M) in the presence or absence of UR-1505 (100–300 μ M) or CsA (1 μ M). Human T cells were isolated from peripheral blood by means of a Ficoll gradient (GE Healthcare), followed by a negative selection using MACS immunogenetic beads [Pan T Cell Isolation kit human; Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA)]. A highly pure population of T cells was obtained [$>98\%$, as determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis]. Human isolated T cells were either frozen for further studies or cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS. T cells were stimulated with plate-coated anti-CD3 (1 μ g/ml), anti-CD28 (1 μ g/ml) plus rhIL-2 (25 ng/ml) (R&D Systems) in the presence or absence of UR-1505 or CsA. HeLa cells were cultured in minimal essential medium supplemented with 20% fetal bovine serum.

T Cell Proliferation Assays. We have studied the effect of UR-1505 on two different models of T cell proliferation, depending on the proliferative stimulus. First, human isolated T cells were cultured in 96-well plates (100,000 cells/well) in 100 μ l of RPMI/10% FBS and were stimulated with coated anti-CD3 (1 μ g/ml) plus anti-CD28 (1 μ g/ml) plus rhIL-2 (25 ng/ml) for up to 96 h; this proliferation was dependent on TCR engagement and the cosignal provided by CD28.

Second, JAK/STAT-dependent proliferation was studied in human isolated T cells that had been growing in medium containing IL-2 (10 ng/ml) for 7 days to overexpress IL2 receptors. At day 7, human isolated T cells were plated on 96-well microplates and stimulated with IL-2 (1 ng/ml) for another 96 h, so as to detect the proliferation exclusively caused by 10 ng/ml IL-2 through its overexpressed receptor and JAK/STAT.

BrdU was added in both cases approximately 15 h before T cells reached 24, 48, 72, and 96 h of incubation, at a final concentration of 10 μ M. During this labeling period, BrdU instead of thymidine was incorporated into the DNA of growing cells. Quantification of BrdU incorporation to DNA in growing cells is used as a measure of cell proliferation. BrdU was determined by ELISA according to manufacturer instructions.

Jurkat Cell Cycle Assay. Jurkat cells in log-phase growth were treated with UR-1505 (10–500 μ M). After 24 h, cells were pulsed with BrdU (10 μ M, 1 h), harvested by centrifugation, resuspended (1×10^6 cells/ml) in PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol, and further processed and stained with 20 μ l of anti-BrdU-fluorescein isothiocyanate according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences) and with 5 μ g/ml propidium iodide. Within 3 h after staining, the fractions of cells in G_0/G_1 , S, and G_2/M phases of the cell

cycle were quantified by FACS analysis performed with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

p27^{KIP1} Levels in Jurkat Cells. Accumulation of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27 was analyzed in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h with 0.1% FBS (quiescent cells) or with 10% FBS (proliferating cells) plus vehicle or UR-1505 (3–30 μ M). p27 levels were determined by immunoblot or flow cytometry after cell staining with phycoerythrin conjugate p27 monoclonal antibody according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Viability Assays. Human isolated T cell viability was determined using the Reagent WST-1 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Cytokine Production. Human isolated T cells (1×10^6) were stimulated with anti-CD3, anti-CD28, and rIL-2 for up to 96 h in the presence or absence of UR-1505 (30–300 μ M). Every 24 h, supernatants were obtained and immediately frozen until cytokine determination. Cytokine concentration in the supernatants was determined by flow cytometry (cytometric bead array; BD Biosciences).

Real-Time RT-PCR. Total RNA was obtained from human isolated T cells (4×10^6 cells) and Jurkat cells (5×10^6 cells) using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. cDNA was generated using TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) from 1 μ g of total RNA. The reaction mix contained $1 \times$ RT buffer, 5.5 mM MgCl₂, 500 μ M deoxyNTP mixtures, 2.5 μ M random hexamers, 0.4 U/ μ l RNase inhibitor, and 1.25 U/ μ l Multiscribe Reverse Transcriptase. PCR was performed in a 20- μ l reaction mixture that contained 40 ng of reverse-transcribed cDNA, PCR master mix, and the needed amounts of primers and probe included in IL-5 and IFN- γ TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). The PCR and subsequent analysis were done with the ABI PRISM 7700 apparatus (Applied Biosystems).

Cycle threshold (C_T) values were calculated for IL-5, IFN- γ and 18S rRNA. The relative IL-5 and IFN- γ transcripts in treated (T) and control samples (C) were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$, in that $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(T) - \Delta C_T(C)$ and $\Delta C_T = C_T(\text{IL5 or IFN-}\gamma) - C_T(18S \text{ rRNA})$.

Nuclear Extract Preparation. Nuclear extracts from Jurkat cells (4×10^6) and human isolated T cells ($4-6 \times 10^6$) were prepared by lysing cells with Nonidet P-40 followed by differential centrifugation. In brief, at the end of incubations, cells were collected by centrifugation at 1200 rpm for 10 min at room temperature and washed with ice-cold PBS. Then, cells were resuspended in buffer consisting of 10 mM HEPES, pH 7.8, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml aprotinin and kept on ice for 15 min. Cells were then lysed with Nonidet P-40 (10%), and the nuclear pellet was recovered after centrifugation at 13,000g at 4°C for 30 s. The nuclear pellet was resuspended in ice-cold buffer containing 20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, and 10 μ g/ml aprotinin and stored at -80°C. Protein concentration was determined by Bradford assay.

AP-1 DNA-Binding Activity. Activation of transcription factor AP-1 was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a consensus oligonucleotide of AP-1 (5'-CGCTTGATGAGT-CAGCCGGAA-3') (Promega). Probes were labeled with T4 polynucleotide kinase (Promega, Madison, WI) with [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol, 250 μ Ci) (GE Healthcare). In brief, 3 μ l of H₂O, 2 μ l of consensus sequence of oligonucleotide (~20 ng), 1 μ l of 10 \times buffer enzyme, 1 μ l of T4 enzyme (5 U/ μ l) and 3 μ l of [γ -³²P]ATP were mixed in an Eppendorf tube and incubated at 37°C for 1 h. Oligonucleotides labeled were purified using NICK columns (GE Healthcare) and stored at -20°C.

Binding reactions included 10 μ g of nuclear extracts in incubation buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 4%

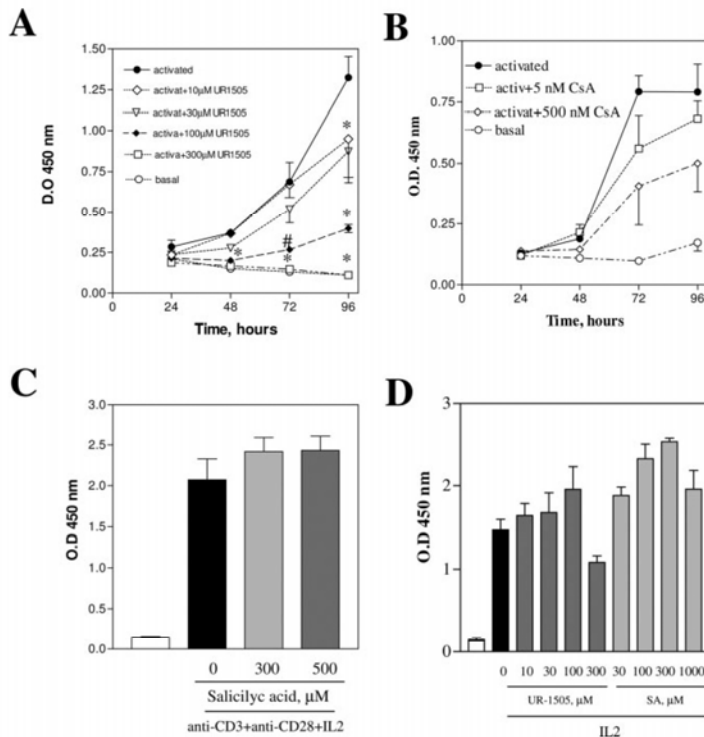


Fig. 2. UR-1505 specifically inhibited TCR-induced T-cell proliferation, having a minor effect on JAK/STAT-induced T-cell proliferation. A, human isolated T cells were stimulated with coated anti-CD3 (1 μ g/ml) plus anti-CD28 (1 μ g/ml) plus rIL-2 (25 ng/ml) for up to 96 h, and the effect of increasing concentrations of UR-1505 (10–300 μ M) on T-cell proliferation was assayed. B and C, effect of CsA for up to 96 h (5 and 500 nM) and salicylic acid after 96 h (300–500 μ M) on TCR induced T-cell proliferation. Finally, the effect of UR-1505 (10–300 μ M) and salicylic acid (30–1000 μ M) after 96 h on JAK/STAT-dependent T-cell proliferation was assayed in human isolated T cells, as detailed in *Materials and Methods*. D, data shown are the mean \pm S.E.M. of three different experiments done in triplicate. *, $p < 0.001$ versus activated T cells; #, $p < 0.01$ versus activated T cells

272 Roman et al.

glycerol), 1 μg of poly(dI-dC) (GE Healthcare), and labeled oligonucleotide ($\sim 30,000$ cpm). The mixture was electrophoresed in a 6% nondenaturing polyacrylamide gel for 2 to 3 h at 175 V, and the gel was autoradiographed using Hyperfilm MP (GE Healthcare) at -20°C overnight.

NF-AT and NF- κB Activities. NF-AT and NF- κB activities were analyzed with the commercially available ELISA kits TransFactor NF-ATc1 colorimetric kit and TransFactor NF κB p65 colorimetric kit (BD Biosciences). In brief, nuclear extracts (10 μg of protein) from Jurkat cells or human isolated T cells were introduced into the wells of 96-well microtitre plates precoated with oligonucleotide containing the NF-AT and NF- κB consensus sequence (5'-GAGGAAAATTTG-3', 5'-GGGG-TATTTCC-3') in a volume of 50 μl for 1 h at room temperature. After washing three times, 100 μl of monoclonal antibody against NF-ATc1 or

p65 was added to the appropriate wells and incubated for a further 1 h at room temperature. Anti-IgG horseradish peroxidase-conjugate in a volume of 100 μl was then added and incubated for another 1 h at room temperature. Absorbance at 450 nm was measured after the addition of 1 M sulfuric acid. Specificity was verified by competition assays and by mutated oligonucleotides.

Immunocytochemistry. HeLa cells (1×10^4) were plated on eight-well culture coverslips (BD Biosciences) and cultured overnight. Then, cells were preincubated with UR-1505 (300 μM) or CsA (1 μM) for 30 min at 37°C and stimulated or not with ionomycin (1 μM) for another 40 min. Cells were immediately fixed with 3% paraformaldehyde (prewarmed at 37°C) for 20 min at room temperature. Immunocytochemistry was performed according to the manufacturer's instructions.

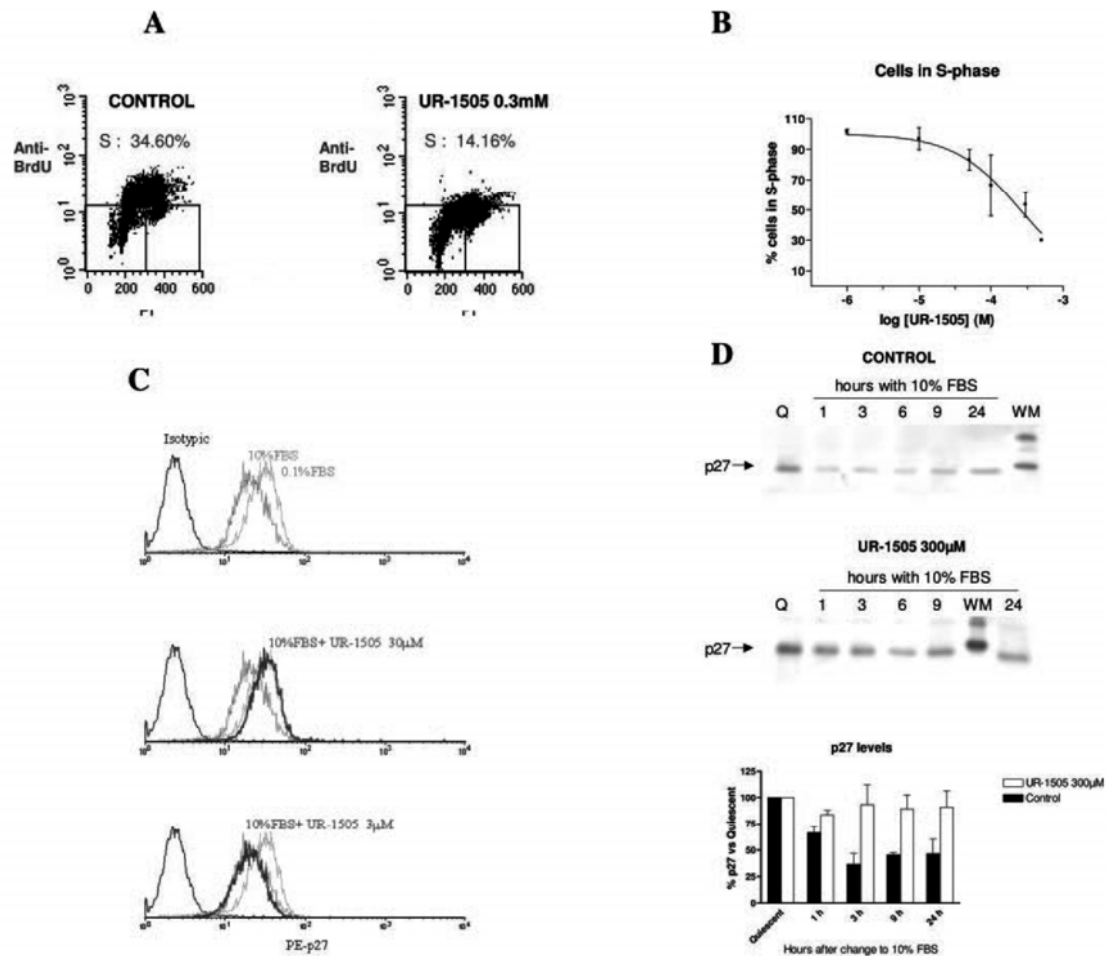


Fig. 3. Effect of UR-1505 on cell cycle and p27^{KIP1} levels. A, percentage of cells in the S phase of cell cycle in asynchronously growing Jurkat cells treated with UR-1505 (0.3 mM) or vehicle for 24 h. After incubation, cells were pulsed with BrdU (1 h) and then stained with anti-BrdU-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide followed by FACS analysis. B, effect of UR-1505 in the percentage of Jurkat cells in the S phase of cell cycle. Experimental details as above. C, representative histograms showing the effects of UR-1505 on p27 levels in Jurkat cells. Cells were incubated for 24 h with 0.1% FBS (quiescent cells), 10% FBS (proliferating cells), or 10% FBS plus UR-1505. After 24 h, cells were stained with phycoerythrin-conjugated p27 monoclonal antibody or with an isotypic control followed by FACS analysis. D, immunoblots showing the inhibition of p27 degradation by UR-1505 in HeLa cells. Cells were changed from a quiescent environment (0.1% FBS, 48 h) to a proliferating one (10% FBS) in presence of UR-1505 (0.3 mM) or vehicle. At different times, cells were harvested and immunoblots were performed with antibodies against p27. Column graph shows the quantification of two independent experiments (mean \pm S.D.).

Results

UR-1505 Inhibited TCR-Induced T-Cell Proliferation. To investigate the effect of UR-1505 on T-cell activation, we first evaluated the effect of UR-1505 on TCR-induced human isolated T cell proliferation. TCR engagement by antigen and CD28 cosignal allow T cells to proliferate through TCR signaling pathway. Therefore, to induce cellular proliferation, human isolated T cells were stimulated through T cell receptor with coated anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + IL-2 (25 ng/ml) for up to 96 h in the presence or absence of UR-1505. Under these conditions, human isolated T cells clearly proliferated, as shown in Fig. 2, A–C. UR-1505 (10–300 μM) inhibited the CD3/CD28 induced human isolated T cell proliferation in a dose-dependent manner, whereas salicylic acid treatment for 96 h (300–500 μM) did not (Fig. 2, A and C). The inhibition achieved by 300 μM UR-1505 was 100%. In addition, we used CsA as a positive control of T-cell proliferation inhibition because it is known that the inhibitory effect of CsA on T-cell proliferation is due to calcineurin inhibition. Therefore, CsA (5–500 nM) blocked TCR signaling cascade inhibiting T-cell proliferation (Fig. 2B).

UR-1505 Did Not Inhibit JAK/STAT-Induced T-Cell Proliferation. To assess whether the inhibition of T-cell proliferation was due to an interference of UR-1505 with TCR and CD28 receptor engagement, we examined the effect of UR-1505 on JAK/STAT-dependent T cell proliferation. To induce cell proliferation, human isolated T cells were exclusively incubated with IL-2, as detailed under *Materials and Methods*. Under these conditions, T cell proliferation was not dependent on TCR signaling pathway but was controlled through the JAK/STAT signaling pathway. JAK/STAT-dependent T cell proliferation was not affected by UR-1505, because 100 μM failed to inhibit human isolated T cell proliferation, and the highest concentration of UR-1505 assayed (300 μM) had only a minor effect on cell proliferation after 96 h (Fig. 2D). It has to be mentioned that 300 μM UR-1505 absolutely abrogated the TCR-dependent T-cell proliferation after 24 h (Fig. 2A). CsA also failed to inhibit T-cell proliferation under these conditions; however, a JAK inhibitor reduced IL-2 induced lymphocyte proliferation (data not shown).

UR-1505 Induces Cell Cycle Arrest through p27^{KIP1} Accumulation. Cosignaling with TCR/CD3 and CD28 promoted progression of T cells through the cell cycle. To this end, a decrease in the levels of Cdk inhibitor p27^{KIP1} was required to permit cell passage from the G₁ to the S phase of cell cycle.

UR-1505 induced G₁ arrest of growing Jurkat cells, inhibiting in a dose-dependent manner their progression into S phase of the cell cycle (Figs. 3, A and B). This G₁ arrest seems to be mediated by an UR-1505-promoted accumulation of p27^{KIP1}. As shown in Fig. 3C, UR-1505 concentration-dependently increased p27^{KIP1} levels in log-phase proliferating Jurkat cells. Levels of p27^{KIP1} in UR-1505 (30 μM)-treated cells were similar to those of arrested cells incubated in low (0.1%) FBS.

Moreover, the effects of UR-1505 on p27^{KIP1} concentration seem to be due to inhibition of degradation of this Cdk inhibitor. As shown in Fig. 3D, incubation of HeLa cells in 0.1% FBS (48 h) induced cell quiescence and a marked increased in

p27^{KIP1} levels. Changing these cells to a 10% FBS medium resulted in a time-dependent degradation of p27^{KIP1}, which correlated with the onset of cell proliferation. However, when 10% FBS medium was supplemented with UR-1505 (300 μM), p27^{KIP1} degradation was inhibited, leaving the cells in a quiescent mode.

UR-1505 Did Not Decrease T-Cell Viability. To discard the idea that the antiproliferative effect of UR-1505 was not due to an increase in cellular toxicity in human isolated T cells, we have examined the human isolated T cell viability by means of WST-1 assay. Starting from 48 h stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 + hrIL-2, we have observed a higher mitochondrial activity of human isolated T cells as a result of an increase in cell number caused by increased cell proliferation. It is noteworthy that UR-1505 did not reduce the human isolated T cell viability at concentrations up to 300 μM (Fig. 4), because the reduction of mitochondrial activity was always higher than basal values (nonstimulated lymphocytes) but not below that.

Effect of UR-1505 on Cytokine Production in Activated T Cells. Isolated human peripheral blood T cells were activated in the same way as for proliferation and viability studies [that is, by cross-linking the TCR with anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus a costimulation provided by anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) antibodies for up to 96 h in the presence or absence of UR-1505 (30–300 μM)]. Activation of human isolated T cells resulted in an increased production of IFN- γ , IL-5, IL-4, and tumor necrosis factor- α , whereas nonactivated T cells did not produce detectable levels of any cytokine (Fig. 5A). The increased secretion of cytokines was observed from 24 h (Fig. 5B), although it was more evident from 48 h (Fig. 5A).

Treatment with UR-1505 (30–300 μM) reduced the cytokine production by activated T cells (Fig. 5, A and B). The most important inhibitory effect was observed for IFN- γ and IL-5. It is noteworthy that the inhibition of IFN- γ and IL-5 production showed the same pattern than the inhibition of cell proliferation in human isolated T cells. In Fig. 5B, we

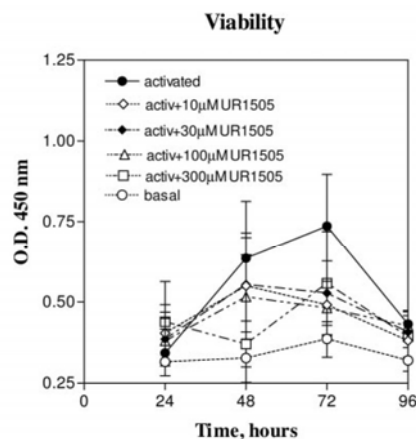


Fig. 4. UR-1505 did not decrease T cell viability. Human isolated T cells were stimulated with anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) plus IL-2 (25 ng/ml) for up to 96 h in the presence or not of UR-1505 (10–300 μM). Every 24 h, mitochondrial activity was measured by WST-1 Reagent (Roche). Results shown are a representative experiment performed in triplicate.

274 Roman et al.

focused on the inhibitory effect of UR-1505 on cytokine secretion at 24 h. At this early time point, there was already inhibition of IL-5 and IFN- γ by UR-1505 (100–300 μ M).

UR-1505 Decreased IL-5 and IFN- γ Gene Expression. Because IL-5 and IFN- γ were the cytokines most inhibited by UR-1505 and to determine whether the inhibition of IL-5 and IFN- γ production was consequence of a decreased gene expression, we analyzed the effect of UR-1505 on IL-5 and

IFN- γ mRNA levels in T cells. For this, T cells, human isolated T cells, and Jurkat cells were preincubated with UR-1505 (300 μ M), CsA (1 μ M), or tacrolimus (1 μ M) for 30 min and then both types of T cells were stimulated. The stimulus was different for each type of T cell; human isolated T cells were stimulated by cross-linking the TCR with anti-CD3 plus a costimulation provided by anti-CD28 antibodies, whereas Jurkat cells were stimulated pharmacologically for

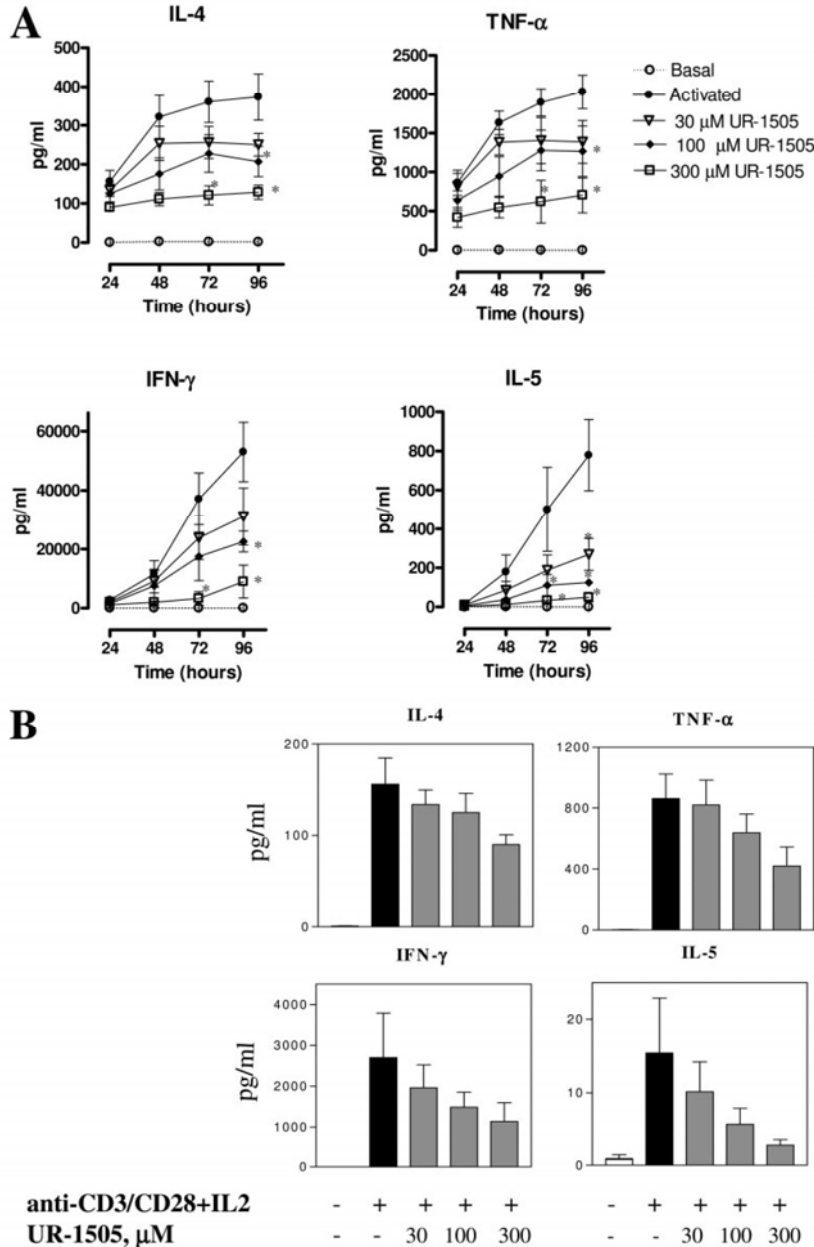


Fig. 5. UR-1505 reduced cytokine production in T cells. **A**, human isolated T-cells were stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml), anti-CD28 (1 μ g/ml) plus IL-2 (25 ng/ml) for up to 96 h in the presence or not of UR-1505 (30–300 μ M) and cultured supernatants collected every 24 h for IL-4, tumor necrosis factor- α , IL-5, and IFN- γ determination. **B**, effect of UR-1505 (30–300 μ M) on IFN- γ and IL-5 production by anti-CD3/anti-CD28-stimulated human isolated T cells after 24 h. Results shown are a representative experiment performed in triplicate. *, $p < 0.05$ versus activated T cells.

24 h with PMA (50 nM) plus ionomycin (3 μ M), which mimics the engagement of TCR with anti-CD3 and anti-CD28. The stimuli are equivalent because ionomycin increases intracellular Ca^{2+} levels and PMA activates mitogen-activated protein kinase, the same signaling pathways that are activated after TCR engagement with anti-CD3 and the cosignal allowed by anti-CD28. At the end of experiments, total RNA was obtained and reverse-transcribed to cDNA, and IFN- γ and IL-5 gene expression was quantified by real-time PCR. As shown in Fig. 6, A and B, UR-1505 (300 μ M) reduced the gene expression of both genes in activated T cells. The inhibition on IL-5 and IFN- γ was observed both in Jurkat (Fig. 6A) and human isolated T cells (Fig. 6B). As expected, CsA (1 μ M) and tacrolimus (1 μ M) inhibited the expression of the genes in Jurkat cells and in human isolated T cells, respectively.

UR-1505 Specifically Inhibited NF-AT DNA-Binding Activity in Both Human Isolated T Cells and Jurkat Cells. Most of the genes involved in the immune response, including IL-5 and IFN- γ , are transcriptionally regulated by NF-AT, AP-1, and NF- κ B binding sites located in their promoter regions. Furthermore, these transcription factors, especially NF-AT, play a key role during T-cell activation. Thus, we have studied the effect of UR-1505 on NF-AT, AP-1, and NF- κ B DNA-binding in T cells. For this, we used two cellular models: human isolated T cells activated with anti-CD3/anti-CD28 (both at 1 μ g/ml) for 6 h and Jurkat cells

pharmacologically stimulated for 4 h with PMA (50 nM) plus ionomycin (3 μ M). T cells have been preincubated or not with UR-1505 (100–300 μ M) or CsA (1 μ M) 30 min before stimulation. Activated human isolated T cells and pharmacologically stimulated Jurkat cells showed increased DNA binding for all three transcription factors (NF-AT, AP-1, and NF- κ B) (Fig. 7, A and B).

UR-1505 (100–300 μ M) reduced NF-AT DNA binding, whereas NF- κ B and AP-1 DNA-binding activities remained unaffected in both Jurkat cells and human isolated T cells (Fig. 7, A and B). CsA is a well known immunosuppressive drug that targets NF-AT activity through calcineurin inhibition. In our model, CsA (1 μ M) strongly inhibited NF-AT DNA binding and, in addition, reduced partially NF- κ B DNA-binding.

UR-1505 Had No Effect on Ionomycin Induced-NF-AT Translocation to the Nucleus. The finding of a diminished NF-AT DNA-binding does not allow us to distinguish between a block of NF-AT import (as CsA does) or an enhanced export. To ascertain whether UR-1505 modulated NF-AT import, we performed immunocytochemistry experiments with HeLa cells. This human cell line has been widely used for NF-AT translocation experiments. As shown in Fig. 8, NF-AT localization was cytosolic in nonstimulated HeLa cells, whereas an important NF-AT translocation to the nucleus was observed after stimulation with ionomycin (1 μ M). As expected, the calcineurin inhibitor CsA (1 μ M) prevented

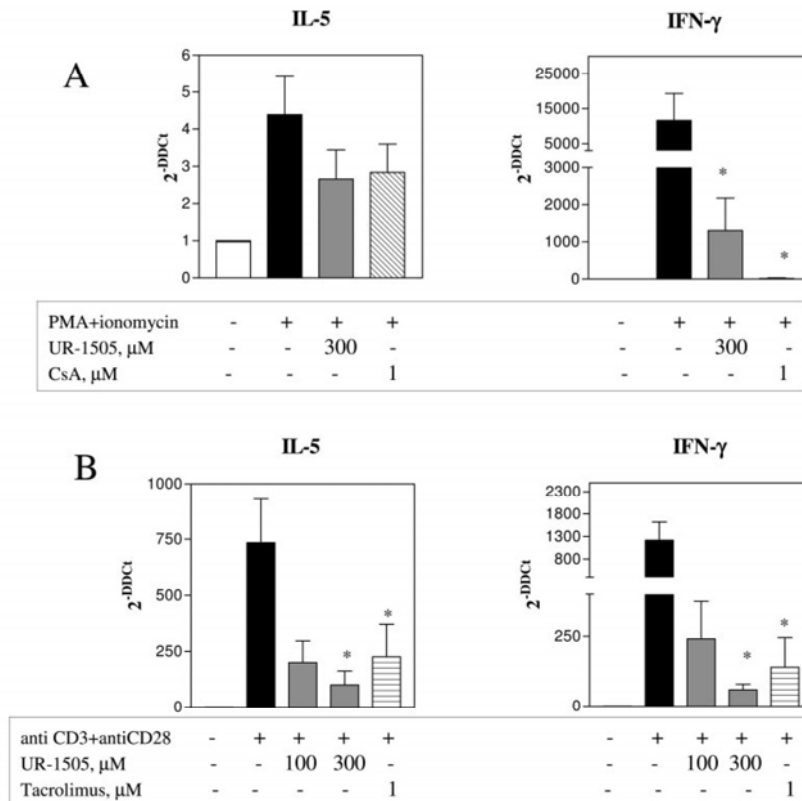


Fig. 6. Inhibition of IL-5 and IFN- γ gene expression by UR-1505. IL-5 and IFN- γ gene expression were determined by real-time RT-PCR analysis in Jurkat cells stimulated pharmacologically with PMA (50 nM) + ionomycin (3 μ M) for 24 h (A) and in human isolated T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 both at 1 μ g/ml for 24 h (B). In both cases, T cells were pretreated with UR-1505 (300 μ M) or CsA (1 μ M) in the case of Jurkat or tacrolimus (1 μ M) in the case of human isolated T cells 30 min before stimulation. Relative amounts of IL-5 and IFN- γ mRNA were calculated and normalized with the endogenous control 18S rRNA. Data shown ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) are the mean \pm S.E.M. of three different experiments done in duplicate. *, $p < 0.05$ versus activated T cells.

276 Roman et al.

the ionomycin-induced NF-AT translocation into the nucleus. However, UR-1505 (300 μ M) failed to inhibit NF-AT nuclear translocation, because the fluorescence had been detected principally in the nucleus (Fig. 8). Indeed, salicylates are known to not inhibit NF-AT translocation to the nucleus (Aceves et al., 2004).

Nuclear Export Blockade Had No Effect on UR-1505-Induced NF-AT Inhibition. To determine whether the inhibitory effect of UR-1505 on NF-AT DNA-binding was the consequence of an increased export, we used leptomycin B as a general inhibitor of exportin (CRM1)-dependent export. As shown in Fig. 9, treatment with leptomycin B did not abolish the inhibitory effect of UR-1505 on NF-AT DNA binding,

suggesting that UR-1505 did not increase NF-AT nuclear export.

Effect of UR-1505 on p38, GSK, and CK1 Activities. The effect of UR-1505 on the kinases involved in nuclear export of NF-AT was evaluated (Upstate Discovery, Dundee, UK). As shown in Table 1, UR-1505 (300 μ M) did not affect p38, GSK, or CK1 activities.

Discussion

In this study, we have shown that UR-1505, a new immunomodulator agent chemically related to salicylic acid, blocked T-cell activation, which might be a useful strategy for

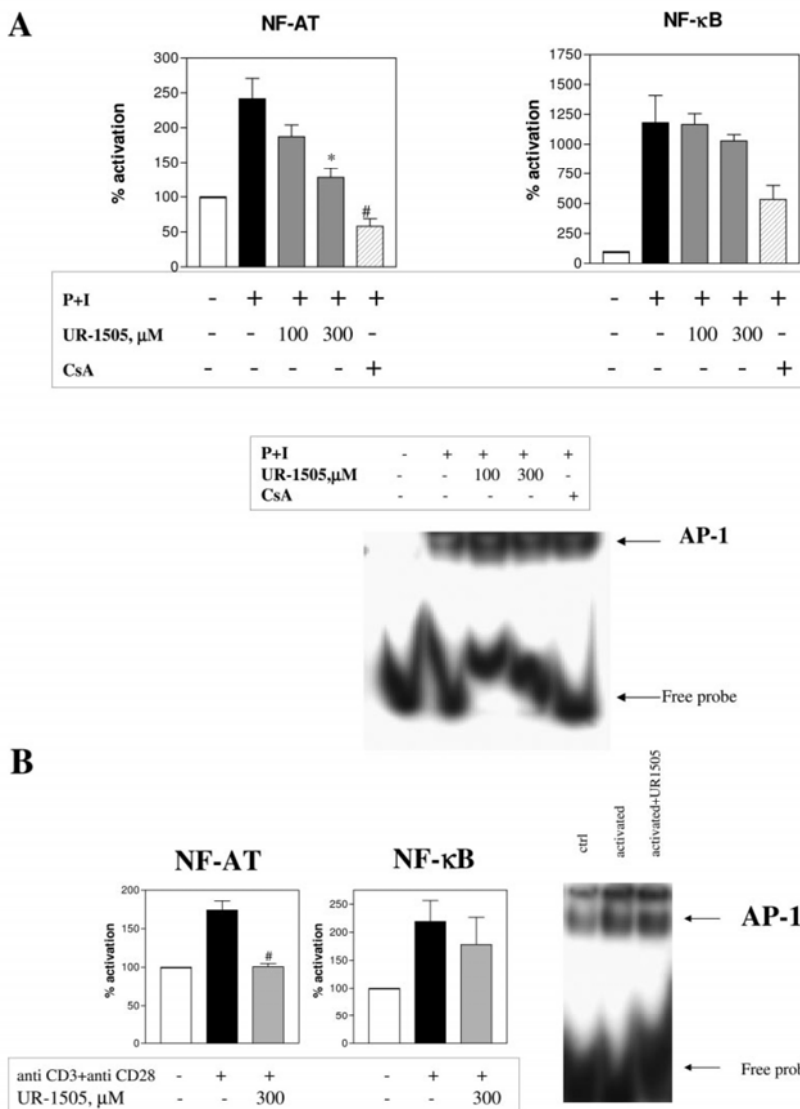


Fig. 7. UR-1505 decreased NF-AT DNA binding without effect on NF- κ B and AP-1 in T cells. A, Jurkat cells were incubated with the indicated concentrations of UR-1505 and CsA (1 μ M) for 30 min and then stimulated pharmacologically with PMA (50 nM) plus ionomycin (3 μ M) for 4 h. B, human isolated T cells were stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml), anti-CD28 (1 μ g/ml) plus IL2 (25 ng/ml) for 6 h and incubated in the presence or absence of 300 μ M UR-1505. The nuclear NF-AT and NF- κ B DNA binding were detected by ELISA assays, and AP-1 was examined by EMSA. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five different experiments. For AP-1 experiments, a representative EMSA is shown. *, $p < 0.01$; #, $p < 0.001$ versus activated T cells.

the treatment of autoimmune diseases, given the key role of T-cell activation in the onset of these diseases (Chow et al., 2005; Goudy and Tisch, 2005; Howard et al., 2005; Walter and Santamaría, 2005). It is important that the prevention of T-cell activation produced by UR-1505 was done in a lower range of concentrations (0.1–0.3 mM) than those reported previously for acetylsalicylic acid (2–4 mM) (Paccani et al.,

2002). Our results indicate that blockade of T-cell activation by UR-1505 results in the inhibition of both T-cell proliferation and cytokine production, and both effects seem to be mediated through the TCR/NFAT signaling pathway.

UR-1505 inhibits T-cell proliferation acting on some point(s) of the TCR signaling cascade because UR-1505 inhibits in a dose-dependent manner the T cell proliferation induced by TCR activation with anti-CD3 and anti-CD28 but does not inhibit the proliferation induced by JAK-STAT (IL-2-dependent cell proliferation). More important is the fact that UR-1505 does not inhibit cell proliferation in macrophages (Fernández de Arriba et al., 2005). On the other hand, salicylic acid was unable to inhibit T cell proliferation independently of the stimulus at any concentration assayed.

It has been reported that tacrolimus, another well known inhibitor of the TCR signaling cascade, blocks proliferation of endothelial cells through up-regulation of p27 (Matter et al., 2006). In that sense, our data shown that UR-1505 induces cell cycle arrest at G₁/S, increasing p27^{KIP1} levels in proliferating Jurkat cells, and the accumulation of p27 produces arrest in the G₁ phase (Mohapatra et al., 2001). It should be emphasized that the antiproliferative effect of UR-1505 is not a consequence of decreased T cell viability.

Activated T cells, in addition to proliferating, produce a great array of cytokines. The enhanced production of cytokines is reduced by pretreatment with UR-1505, which is the most important inhibitory effect observed on IL-5 and IFN- γ production, each with a key role in the immune response. This inhibition is produced at transcriptional level because the mRNAs of both genes are reduced after pretreatment with UR-1505.

To understand the mechanisms involved in the inhibition of cytokine gene expression, we have studied the effect of UR-1505 on NF-AT, NF- κ B, and AP-1 DNA-binding activities in T cells. Our results revealed that UR-1505 specifically inhibits NF-AT DNA-binding in T cells without effect on other transcription factors such as NF- κ B and AP-1. The selective NF-AT inhibition explains the decreased expression of IL-5 and IFN- γ , because their expression is modulated through NF-AT sites in their promoter regions (Lee et al., 1995; Hogan et al., 2006). Indeed, two NF-AT inhibitors as CsA and tacrolimus completely abrogate IL-5 and IFN- γ gene expression.

Inhibition of NF-AT seems to be a common point in the prevention of both T-cell proliferation and cytokine gene expression by UR-1505 because NF-AT is known to modulate the expression of hundreds of genes in T cells (Peng et al., 2001; Macian, 2005) and to promote the transition from G₁ to S phase once TCR is engaged (Feske et al., 2001; Appleman et al., 2002; Caetano et al., 2002; Lipskaia and Lompre, 2004). In addition, UR-1505 inhibits T cell proliferation and cytokine expression in a range of concentrations similar to that needed to prevent NF-AT activation. Indeed, UR-1505 follows a pattern similar to that of CsA, because it inhibits only TCR-dependent cell proliferation (and does not inhibit JAK/STAT-dependent proliferation) and prevents NF-AT DNA binding, without effect on AP-1 DNA binding activity. UR-1505 does not inhibit NF- κ B, although our results shown that CsA has a partial inhibitory effect on NF- κ B DNA-binding, according to previous reports that CsA inhibits NF- κ B by inhibition of proteasome activity (Meyer et al., 1997).

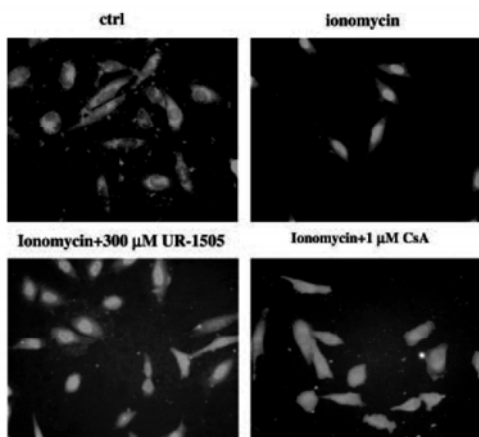


Fig. 8. UR-1505 has no effect on ionomycin-induced NF-AT nuclear import in HeLa cells. HeLa cells were attached overnight and were then preincubated with 300 μ M UR-1505 or 1 μ M CsA for 30 min, then stimulated with 1 μ M ionomycin for 40 min. NF-AT localization was studied by immunocytochemistry. The images shown are representative of three separate experiments.

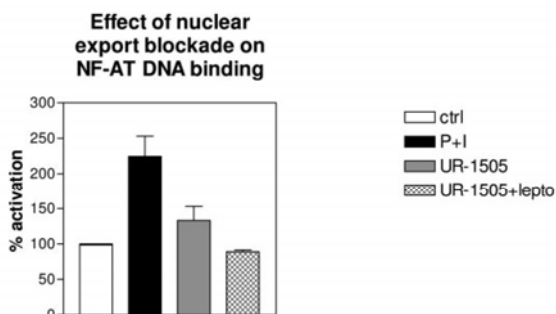


Fig. 9. Nuclear export blockade had no effect on UR-1505 inhibition of NF-AT DNA-binding. Jurkat cells were treated in the presence or absence of leptomycin B (20 ng/ml), with UR-1505 (300 μ M) for 30 min and then stimulated with PMA + ionomycin for 4 h. At the end, nuclear extracts were obtained and NF-AT DNA binding determined. Results are the mean \pm S.E.M. of three separate experiments.

TABLE 1

Effect of UR-1505 on the activity of p38, GSK, and CK1 kinases

The effect of UR-1505 at 300 μ M, expressed as a percentage of activity compared with that of control incubations (100%) was measured. ATP was used at 100 μ M in all assays.

Kinase	% Control
GSK	81
p38 α	90
p38 β	120
p38 γ	100
p38 δ	95
CK1	92

278 Roman et al.

Our results are in agreement with previous data reporting that salicylates inhibit cell proliferation through inhibition of Ca^{2+} /calcineurin/NFAT pathway (Núñez et al., 2006) because this pathway is activated after TCR engagement. On the other hand, Aceves et al. (2004) have shown that salicylates prevent NF-AT-dependent gene expression. Therefore, NF-AT is a target for salicylates and inhibition of NF-AT results in decreased cell proliferation and cytokine production.

The inhibition of NF-AT produced by UR-1505 may also explain the previously reported specificity of UR-1505 inhibiting splenocyte proliferation without effect on murine bone marrow-derived macrophage proliferation (Fernández de Arriba et al., 2005), because NF-AT plays a central role in T lymphocytes, whereas NF- κ B seems to be more relevant in macrophages.

The precise mechanism through which UR-1505 inhibits NF-AT activation is not completely known. NF-AT may be regulated at different levels: phosphorylation/dephosphorylation, subcellular localization, DNA binding activity, and transactivation (Rao et al., 1997; Aceves et al., 2004). Among these possibilities, our data indicate that UR-1505 acts at the level of DNA binding and/or transactivation, because UR-1505 failed to inhibit NF-AT translocation into the nucleus in response to ionomycin stimulation of HeLa cells. This precludes an inhibitory effect of UR-1505 on calcineurin activity. By contrast, CsA, a genuine calcineurin inhibitor, blocks ionomycin-induced NF-AT nuclear translocation in HeLa cells. Therefore, although the pattern of UR-1505 and CsA as inhibitors of T cell activation is similar, the mechanisms involved are different. Furthermore, these results are in agreement with those of Aceves et al. (2004), who reported that salicylates inhibit NF-AT-dependent transcription without effect on ionomycin-induced NF-AT nuclear localization. Besides nuclear import, another important point of regulation of NF-AT is the reversible phosphorylation of NF-AT proteins by specific kinases affecting its nuclear export rates. In that sense, phosphorylation of NF-AT by p38, GSK, and CK1 in some residues is known to lead to NF-AT export to cytoplasm and decreased NF-AT DNA binding (Beals et al., 1997; Chow et al., 1997; Kiani et al., 2000). Therefore, inhibition of NF-AT DNA binding by UR-1505 may be the consequence of increased kinase activity that enhanced NF-AT nuclear export.

In that sense, we have determined that UR-1505 has no effect on in vitro kinase activity of p38, GSK-3 and CK1. Indeed, blockade of nuclear export by leptomycin B has no consequence on decreased NF-AT DNA binding, suggesting that the mechanism of UR-1505 is not mediated by an increase of NF-AT export.

Although in most cases NF-AT rephosphorylation induces its inactivation through nuclear export, there are increasing data showing that phosphorylation in specific residues belonging to the NF-AT regulatory domain increases its transcriptional activity, improving their DNA binding by means of conformational changes and/or by recruiting cofactors as p300. In that sense, Okamura et al. (2000) have reported an inducible phosphorylation in the transactivation domain of NF-ATc2 after stimulation of T cells with PMA plus ionomycin, which enhances its transcriptional activity (Okamura et al., 2000). Furthermore, Pim kinase I (Rainio et al., 2002), JNK (Ortega-Pérez et al., 2005), and Cot kinase (de Gregorio

et al., 2001) phosphorylate NF-ATc1 and NF-ATc2, increasing their transcriptional activities. Therefore, a reasonable possibility is that UR-1505 may inhibit NF-AT DNA binding, reducing the activity of the inducible kinase that increases NF-AT transactivation (Okamura et al., 2000). Studies are in progress to further identify the kinases targeted by UR-1505.

In conclusion, our results showed that UR-1505 inhibits T-cell activation, a phenomenon characterized by inhibition of both T-cell proliferation and cytokine production, and both effects seem to be the consequence of NF-AT inhibition. Furthermore, our data indicate that the mechanism of action of UR-1505 is different from typical calcineurin inhibitors. Because the adverse effects of CsA and tacrolimus (nephrotoxicity, neurotoxicity, diabetogenicity, and gastrointestinal toxicity) are due to the calcineurin inhibition in cells outside the immune system (Fung et al., 1991; Dumont et al., 1992; Ho et al., 1996), UR-1505 may be safer than calcineurin inhibitors. UR-1505 clinical development is in progress for atopic dermatitis. Clinical results in this indication and others will show whether UR-1505 could be a safer and effective alternative to calcineurin inhibitors.

Acknowledgments

We acknowledge the excellent technical help of Adoración Rodríguez, Josep Moreno, Cristina Gerbolés, and Assumpta Oliveras. We are grateful to Dr. J. Serratos for assistance with NF-AT translocation experiments.

References

- Aceves M, Dueñas A, Gomez C, San Vicente E, Crespo MS, and Garcia-Rodriguez C (2004) A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *J Immunol* **173**:5721–5729.
- Appleman LJ, van Puijenbroek AA, Shu KM, Nadler LM, and Boussiotis VA (2002) CD28 costimulation mediates down regulation of p27^{KIP1} and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signalling pathway in primary human T cells. *J Immunol* **168**:2729–2736.
- Aramburu JL, Azzoni A, Rao A, and Perussia B (1995) Activation and expression of the nuclear factors of activated T-cells, NFATp and NFATc in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med* **182**:801–810.
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, and Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **275**:1930–1934.
- Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, and Viola JP (2002) NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* **16**:1940–1942.
- Choi M, Brines RD, Holman MJ, and Klaus GGB (1994) Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL4. *Immunity* **1**:179–187.
- Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, and Davis RJ (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**:1638–1641.
- Chow S, Rizzo C, Ravitsky L, and Sinha AA (2005) The role of T cells in cutaneous autoimmune disease. *Autoimmunity* **38**:303–317.
- de Gregorio R, Iñiguez MA, Fresno M, and Alemany S (2001) Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T-cells through activation of the nuclear factor of activated T-cells. *J Biol Chem* **276**:27003–27009.
- Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyvrat M, et al. (1992) The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J Exp Med* **176**:751–760.
- Fernández de Arriba A, Ramis I, Bailón E, Comalada M, Gálvez J, Zarzuelo A, and Merlos M (2005) UR-1505, a new immunomodulator, inhibits lymphocyte proliferation and cytokine production. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **27** (Suppl 2):151.
- Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, and Rao A (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2**:316–324.
- Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Van Thiel D, Armitage J, McCauley J, Selby R, et al. (1991) Adverse effects associated with the use of FK 506. *Transplant Proc* **23**:3105–3108.
- Goudy KS and Tisch R (2005) Immunotherapy for the prevention and treatment of type 1 diabetes. *Int Rev Immunol* **24**:307–326.
- Gremese E and Ferraccioli GF (2004) Benefit/Risk of cyclosporine in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **22**:S101–S107.
- Ho S, Clipstone N, Timmerman L, Northrup J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, and Crabtree GR (1996) The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* **80**:S40–S45.

UR-1505, a New Salicylate, Blocks T Cell Activation 279

- Hogan PG, Chen L, Nardone J, and Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **17**:2205–2232.
- Howard LM, Kohm AP, Castaneda CL, and Miller SD (2005) Therapeutic blockade of TCR signal transduction and costimulation in autoimmune disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**:205–216.
- Kiani A, Rao A, and Aramburu J (2000) Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* **12**:359–372.
- Kopp E and Ghosh S (1994) Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **265**:956–959.
- Lee HJ, Masuda ES, Arai N, Arai K, and Yolota T (1995) Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J Biol Chem* **270**:17541–17550.
- Lipskaia L and Lompre AM (2004) Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signalling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* **96**:55–68.
- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**:472–484.
- Matter C, Rozenberg I, Jaschko A, Greutert H, Kurz D, Wnendt S, Kuttler B, Joch H, Grunenfelder J, Zund G, et al. (2006) Effects of tacrolimus or sirolimus on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **48**:286–292.
- Meyer S, Kohler G, and Joly A (1997) Cyclosporin A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF- κ B activation. *FEBS Lett* **413**:354–358.
- Mohapatra S, Agrawal D, and Pledger WJ (2001) p27^{KIP1} regulates T cell proliferation. *J Biol Chem* **276**:21976–21983.
- Núñez L, Valero RA, Senovilla L, Sanz-Blasco S, García-Sancho J, and Villalobos C (2006) Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol* **571**:57–73.
- Okamura H, Aramburu J, García Rodríguez C, Viola JPB, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, and Rao A (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* **6**:539–550.
- Ortega-Pérez I, Cano E, Were F, Villar M, Vázquez J, and Redondo JM (2005) c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* **280**:20867–20878.
- Paccani SR, Boncristiano M, Ulivieri C, D'Ellos MM, Prete G, and Baldari C (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem* **277**:1509–1513.
- Pacor ML, Di Lorenzo G, Martinelli N, Mansueto P, Rini GB, and Corrocher R (2004) Comparing tacrolimus ointment and oral cyclosporine in adult patients affected by atopic dermatitis: a randomized study. *Clin Exp Allergy* **34**:639–645.
- Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, and Glimcher LH (2001) NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* **14**:13–20.
- Perez-G M, Melo M, Keegan AD, and Zamorano J (2002) Aspirin and salicylates inhibit the IL-4 and IL-13-induced activation of STAT6. *J Immunol* **168**:1428–1434.
- Prieschl EE, Gouilleux-Gruart V, Walker C, Harrer NE, and Baumruker T (1995) A nuclear factor of activated cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J Immunol* **154**:6112–6119.
- Rainio EM, Sandholm J, and Koskinen PJ (2002) Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol* **168**:1524–1527.
- Rao A, Luo C, and Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**:707–747.
- Saxne T and Wollheim FA (2003) Cyclosporin A in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **62**:1121–1122.
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, and Avots A (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1498**:1–18.
- Tegeder I, Pfeilschifter J, and Geisslinger G (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* **15**:2057–2072.
- Walter U and Santamaría P (2005) CD8⁺ T cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **17**:624–631.

Address correspondence to: Juan Román, Palau Pharma, S.A., Pharmacology and Toxicology, Polígono Industrial Riera de Caldes, Avinguda Camí Reial, 51-57, 08184 Palau-solità i Plegamans (Barcelona) Spain. E-mail: jroman@palaupharma.com



Capítulo 6

The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition

Biochem Pharmacol. 74: 1496-1506. 2007

El efecto antiinflamatorio intestinal del nuevo compuesto UR-1505 en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS está mediado por la inhibición de los linfocitos T

Objetivos:

El objetivo del siguiente trabajo consistió en estudiar la posible actividad antiinflamatoria intestinal del UR-1505 en un modelo experimental de colitis en rata inducido por la administración del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS), un modelo que se asemeja a la enfermedad de Crohn (EC). Además, se analizó la especificidad del compuesto con estudios *in vitro* sobre la activación de linfocitos T procedentes de bazo y de macrófagos procedentes de médula ósea de ratón (BMDM, *bone marrow-derived macrophage*).

Resultados:

El modelo de colitis se indujo mediante la administración intracolónica de 10 mg de TNBS disueltos en etanol al 50% con una cánula introducida 8 cm a través del ano a ratas Wistar hembras. La administración de TNBS provocó una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por pérdida de peso asociada a anorexia, diarrea y presencia de sangre rectal en los animales durante la administración del agente exógeno. Después del sacrificio de los animales a los 7 días, se pudo observar un engrosamiento de la pared intestinal con acortamiento del intestino, inflamación, edema, ulceraciones, y un incremento de la infiltración leucocitaria, que se puso de manifiesto por el aumento de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) colónica, y de mediadores quimiotácticos, como el leucotrieno B₄ (LTB₄). El proceso mostró una depleción del antioxidante glutation (GSH) y una activación de una respuesta inmunológica de tipo Th1, con liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF α , *tumor necrosis factor α*), la IL-1 β , o el interferón γ (IFN γ), y de otros mediadores proinflamatorios como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide sintase*) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). El tratamiento con el UR-1505 (10 y 30 mg/kg) dio lugar a un efecto antiinflamatorio intestinal, ya que el compuesto fue capaz de facilitar la recuperación del daño generado, como evidenció la disminución de la relación peso/longitud del colon, y la reducción significativa de la extensión del daño colónico. Además, el UR-1505 mejoró la citoarquitectura intestinal, restaurando las criptas y las células caliciformes, y disminuyendo las ulceraciones y la infiltración leucocitaria en las zonas dañadas. La administración del compuesto provocó una disminución de todos los parámetros proinflamatorios analizados en los homogenados colónicos (TNF α , IFN γ , MPO, LTB₄, iNOS) y un aumento de los niveles de GSH, mejorando así la inflamación intestinal.

Los ensayos *in vitro* se realizaron en linfocitos T procedentes de bazo de ratón estimulados con concanavalina A (ConA), un activador policlonal que induce la activación de todas las vías de señalización en estas células y presenta efectos similares a la activación por el receptor de células T (TCR, *T cells receptor*). Nuestros resultados mostraron que el UR-1505 inhibió la proliferación y la producción de IL-12 e IFN γ en estos linfocitos activados por ConA. La IL-12 y el IFN γ son dos de las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la patogénesis de la EC. Sin embargo, el UR-1505 fue incapaz de inhibir la producción de TNF α en estos linfocitos. Por otro lado, se analizó la acción del compuesto sobre los BMDM. Estas células se encuentran proliferando de forma basal gracias a la presencia del factor de crecimiento específico de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), pero si los BMDM son activados con el lipopolisacárido (LPS) o el IFN γ , dejan de proliferar y pasan a secretar diversos mediadores proinflamatorios, como las citocinas TNF α o IL-12; prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) a través de la expresión de la COX-2, y óxido nítrico (NO) mediante la expresión de la iNOS. El tratamiento con el UR-1505 no modificó la proliferación ni la activación de los BMDM, ya que no inhibió la producción de TNF α y de IL-12 por estimulación con LPS ni la expresión de iNOS y COX-2 inducida por LPS o por IFN γ . El TNF α y la iNOS son dos marcadores proinflamatorios claves producidos por los BMDM.

Conclusión:

El UR-1505 presenta una actividad antiinflamatoria intestinal en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas. Dicho efecto está mediado por una reducción del reclutamiento de células inmunológicas al foco inflamatorio, junto con una inhibición de la activación de linfocitos T, por lo que el UR-1505 podría ser un interesante candidato para el tratamiento de la EC. Por último, se ha comprobado que el UR-1505 específicamente afecta a las células T, ya que inhibe la proliferación y activación de los linfocitos T procedentes de bazo de ratón, sin embargo, no modifica la activación de los macrófagos.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition

Elvira Bailón^a, Desirée Camuesco^a, Ana Nieto^b, Angel Concha^c,
Alberto Fernández de Arriba^d, Juan Román^d, Isabel Ramis^d, Manuel Merlos^d,
Antonio Zarzuelo^a, Julio Gálvez^{a,1}, Mònica Comalada^{a,1,*}

^a Department of Pharmacology, CIBER-EHD, School of Pharmacy, University of Granada, Spain

^b Andalusian Stem Cell Bank, Health and Progress Foundation, Granada, Spain

^c Department of Pathology, Hospital Universitario "Virgen de las Nieves", Granada, Spain

^d Palau Pharma, S.A., Pharmacology & Toxicology, Palau-solità i Plegamans, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2007

Accepted 18 July 2007

Keywords:

Salicylates

Cyclosporine A

Th1 inflammation

Crohn's disease

Lymphocyte

Inflammatory bowel disease

ABSTRACT

UR-1505 is a novel pentafluoropropoxy derivative of salicylic acid, selected from a series of salicylate derivatives, according to their activity as inhibitors of T-lymphocyte activation. This study describes the anti-inflammatory activity of UR-1505 on trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis in rat, an experimental model that resembles to Crohn's disease (CD), as well as its *in vitro* effects on T-cells and bone marrow-derived macrophages (BMDM) activation. UR-1505 showed intestinal anti-inflammatory effect, associated with reduced colonic levels of TNF α and LTB $_4$, inhibition of the expression of IFN γ and iNOS, and lower colonic leukocyte infiltration. The *in vitro* assays revealed that UR-1505 also inhibited T-lymphocyte proliferation and IL-12/IFN γ production, two of the main pro-inflammatory cytokines involved in the pathogenesis of CD. However, UR-1505 did not modify LPS- nor IFN γ -induced activation in BMDM. Thus, UR-1505 specifically affects T-cells without modifying the activation of BMDM. In conclusion, the intestinal anti-inflammatory activity of UR-1505 seems to be mediated by a reduction in the recruitment of immune cells to the inflammatory foci, together with the inhibition of T-cell activation. These results suggest that UR-1505 may be an interesting candidate to be explored for the treatment of CD.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that comprises two

major conditions: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Although the pathogenesis of IBD remains elusive, an exacerbated chronic activation of the immune and inflammatory cascade in genetically susceptible individuals may

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Universitario 'La Cartuja' s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958243889; fax: +34 958248964.

E-mail address: comalada@ugr.es (M. Comalada).

¹ Both authors contributed equally to the supervision of this study.

Abbreviations: BMDM, bone marrow-derived macrophage; CsA, cyclosporine A; Con A, concanavalin A; COX, cyclooxygenase; CD, Crohn's disease; GSH, glutathione; IBD, inflammatory bowel disease; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LTB $_4$, leukotriene B $_4$; MPO, myeloperoxidase; SA, salicylic acid; TNBS, trinitrobenzenesulphonic acid; UC, ulcerative colitis.

0006-2952/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2007.07.026

play a key role [1]. This response is characterized by an up-regulation of the synthesis and release of a variety of proinflammatory mediators, including eicosanoids, platelet activating factor, reactive oxygen and nitrogen metabolites and cytokines, that hazard mucosal integrity and lead to excessive tissue injury [2,3]. This initial inflammation may lead to the activation of either a Th1 T-cell response, associated with excessive IL-12/IFN γ /TNF α secretion, or a Th2 T-cell response, associated with increased IL-4/IL-5 secretion [4], which will be responsible for the exacerbation or perpetuation of the inflammatory process.

To investigate IBD pathogenic mechanisms, several experimental models of gut inflammation have been described, being the majority of them characterized by the development of an increased Th1 response [5]. One of the most used is the TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid) model of rat colitis, which induces transmural cellular infiltration lesions similar to CD [4,5]. In fact, CD has been proposed to be mainly a Th1-mediated inflammation [6,7], and this has been supported by the increased production of IFN γ , IL-12 and TNF α observed in the inflamed intestinal tissue.

Nowadays, a specific causal treatment of CD is not available yet, since the predisposing and trigger factors have not been clearly identified. Therefore, therapeutic and preventive strategies for these disorders must rely on interrupting or inhibiting the immunopathogenic mechanisms that are involved. One of the strategies to effectively down-regulate the exacerbated immune response that characterizes this intestinal condition may be to interfere with the initial steps in this immune response by blocking T-cell activation and proliferation. In fact, several immunomodulator agents currently used for the management of human IBD, such as azathioprine, methotrexate, cyclosporin A or tacrolimus, act by inhibiting T-cell activation [8]. However, the administration of these drugs is limited either by inconstant efficacy, a relatively slow onset of action, inadequate selectivity or by substantial short- and long-term toxicity [8]. For this reason, the development of new drug treatments that combine efficacy and safety is an important goal in IBD therapy. In this sense, other biological therapies such as infliximab, a chimeric monoclonal anti-TNF α antibody, have been successfully developed for IBD treatment in CD patients [9,10]. In addition, anti-IL-12, anti-IFN γ , anti-IL-6 receptor, or toxin-conjugated anti-IL-7 receptor, are also currently being investigated [reviewed in 9].

Salicylates have been used for long time as a therapy for IBD, and they have been shown to be useful in managing mild-to-moderate active UC and mild active CD, as well as in maintaining remission [11]. These compounds are chemically related with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), whose effects have been entirely attributed to the inhibition of cyclooxygenase (COX) activity and thus, the synthesis of prostaglandins. However, it has been suggested that additional mechanisms underlie some of their anti-inflammatory actions; in fact, aspirin has been reported to block T-cell activation, although these effects were only observed at relatively high concentrations [12,13]. Furthermore, 5-aminosalicylic acid (5-ASA) is widely used in the treatment of the inflammatory bowel disease and is believed to act through the downregulation of the NF- κ B pathway [14].

The aim of this study was to test the intestinal anti-inflammatory properties of a new salicylate derivative, UR-1505 (2-hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)-benzoic acid). In this sense, our results show that UR-1505 has intestinal anti-inflammatory activity, mainly due to the inhibition of lymphocyte activity. In addition, the ability of UR-1505 to reduce several inflammatory colonic markers *in vivo*, such as TNF α and LTB $_4$ production as well as iNOS and IFN γ expression, seems to be a consequence of a reduced recruitment of immune cells to the inflammatory foci and/or to the inhibition of T cell activation thus interrupting the perpetuation of the inflammatory response involved in a colitic process.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain), unless otherwise stated. Glutathione reductase was provided by Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). UR-1505 (2-hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)-benzoic acid) was provided by J. Uriach y Compañía S.A. (Palau-solità i Plegamans, Barcelona, Spain).

2.2. Animals

Animals were obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Granada (Granada, Spain) and housed in a temperature (22 °C) and light-controlled (12 h) cycle. 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) in compliance with the Helsinki declaration.

2.3. Induction of colitis and assessment of colonic damage

After a 7-day acclimation period, 40 female Wistar rats (180–200 g) were weighed and randomly distributed in the different experimental groups ($n = 10$ per group). Rats were fasted overnight and those from the TNBS control and treated groups were rendered colitic by the method originally described by Morris et al. [15], with some modifications established by our group [16,17]. Briefly, they were anaesthetized with halothane and 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 from the non-colitic group were administered intracolonicly 0.25 mL of phosphate buffered saline instead of TNBS. Two of the colitic groups received by oral gavage 10 or 30 mg/kg/day of UR-1505 dissolved in a vehicle consisting of Tween 80 (1%, v/v) in distilled water, starting the same day of colitis induction. The other two groups, non-colitic and TNBS control, received daily the vehicle used to administer the test compound. All rats were sacrificed with an overdose of halothane 1 week after induction of colitis, and during the experiment, animal body weight, occurrence of diarrhea and food intake were recorded daily.

Once the rats were sacrificed, the 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). Afterwards, the colon was opened longitudinally and scored for macroscopically visible damage on a 0–10 scale according to the criteria described by Bell et al. [18]. Representative whole gut specimens were taken from a region of the inflamed colon corresponding to the segment adjacent to the gross macroscopic damage and were fixed in 4% buffered formaldehyde for the histological analysis. Equivalent colonic segments were also obtained from the non-colitic group. The colon samples were subsequently sectioned in different longitudinal fragments to be used for biochemical determinations and for RNA isolation.

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured according to the technique described by Krawisz et al. [19]; the results were expressed as MPO units per gram of wet tissue; one unit of MPO activity was defined as that degrading 1 μ mol hydrogen peroxide/min at 25 °C. Total glutathione content was quantified with the recycling assay described by Anderson [20], and the results were expressed as nmol/g wet tissue.

2.4. Immunohistological analysis

The immunolabelling was performed on formalin-fixed paraffin wax-embedded samples using the streptavidin-biotin peroxidase complex method and a high temperature pretreatment as antigen unmasking protocols. After pretreatment, sections were incubated 15 min with 1% hydrogen peroxidase to block endogenous peroxidase activity and were preincubated with protein blocking sera for 30 min to reduce non-specific reactions. The indirect immunofluorescence methods were performed according to established procedures. The primary mouse monoclonal antibodies used were anti-rat mononuclear phagocytes (BD Pharmingen, clone 1C7), anti-rat granulocytes (BD Pharmingen, clone RP-1) and anti-rat CD3 (BD Pharmingen, clone G4.18). Primary antibodies were diluted 1:40 in TBS (Tris buffered saline) and incubated in a humidity chamber overnight at 4 °C. Samples were later incubated with appropriate FITC-conjugated secondary antibodies (Dako Co. Inc.) diluted 1:30 at 37 °C. Sections were then mounted with Aquatex[®] (Merck and Co. Inc.).

2.5. Analysis of IFN γ expression in colonic samples by RT-PCR

The treatment of colonic samples was measured using minor modifications of a semiquantitative RT-PCR technique previously used in skin biopsies [21]. Total RNA from colonic samples was isolated using TRIzol[®] Reagent (Gibco-BRL, USA) following the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized using First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham, Biosciences). The primer sequences were: IFN γ (forward 5'-GCTTTGACGCTCTTCCTCAT-3', reverse 5'-GCTGATGGCCTGATTGTCTT-3'), β -actin (forward 5'-AATCGTGCCTGACATCAAAG-3', reverse 5'-ATGCCACAGGATTCATACC-3'). The polymerase chain reaction was performed as described previously [22] but in this case, the range of cycles were; 38 cycles for IFN γ and 23 cycles for β -actin.

2.6. Cell cultures

Spleens from Balb/C mice (20–24 g) were removed and homogenized in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus 1% penicillin/streptomycin. After centrifugation (1500 rpm, 5 min) erythrocytes were lysed with the buffer (NH₄Cl 1.7 mol/L, KHCO₃ 0.12 mol/L, ethylenediamine-tetraacetic 9 mmol/L) for 30 min at 4 °C. Resting cells were counted by using a hemacytometer and cultured to perform proliferation and stimulation assays in current culture medium containing DMEM plus 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from the same mice and cultured in DMEM which contained 20% FBS and 30% L-cell-conditioned media as a source of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) [23]. After 7 days of culture, a homogeneous population of adherent macrophages was obtained. To render cells quiescent, at 80% confluence macrophages were deprived of L-cell-conditioned media for 16–18 h before the distinct stimuli [23].

2.7. Proliferation assays

Spleen derived lymphocytes were cultured in 24-well plates (1.5 \times 10⁶ cells/well) in 0.5 mL of media and stimulated with concanavalin A (Con A) (5 μ g/mL). Bone marrow-derived macrophages were cultured in 24-well plates (1 \times 10⁵ cells/well) in 0.5 mL of media and stimulated with L-cell. Cell proliferation was measured by [³H] thymidine incorporation as previously described [23] in presence or absence of the indicated concentrations of different compounds.

2.8. Viability assay

The splenocyte viability was quantified using the WST-1 Reagent (Roche, Germany) following the manufacturer's protocol. Viability of macrophages was measured using a crystal violet technique as previously described by Comalada et al. [24] with minor modifications. Macrophages were plated in 24-well culture plates at a confluent condition and were treated with the indicated UR-1505 and salicylic acid (SA) concentrations. The treated cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h and then stained and fixed with 0.2% crystal violet in 2% ethanol during 30 min at room temperature. After four washes with PBS, the cells were scrapped with SDS 1% during 30 min and then collected and centrifuged at 3000 rpm during 5 min. Finally, the colour intensity was quantified using an ELISA reader at 540 nm. Each assay condition was performed in triplicate and the results were represented as the mean (% of cell viability) \pm S.D.

2.9. Determination of cytokine production

Splenocytes and macrophages were cultured in 24-well plates in the presence or absence of different UR-1505, SA and cyclosporine A (CsA) concentrations as indicated in figures for 1 h before the stimulation with Con A (5 μ g/mL) or LPS (10 ng/mL). Supernatants were obtained 24 h (BMDM) or 48 h (T-lymphocytes) after and frozen until ELISA analysis. Cytokine production was measured with murine ELISA kits

(Cytosets™, Biosource International, Nivelles, Belgium) following the manufacturer's protocol.

The TNF α and LTB $_4$ determinations in colonic samples were analyzed as previously described [25].

2.10. Western blot analysis

The iNOS and COX-2 Western blots from tissue and cells were performed as described elsewhere [26]. Equal amounts of protein from tissue samples (150 μ g) and cells (70 μ g) were separated on 7.5% SDS-PAGE. For iNOS (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Madrid, Spain) and COX-2 (Cayman Chemical Company, MI, USA) we used 1/3000 antibody dilution. A primary antibody against β -actin was used as loading control. Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG were used as secondary antibodies. Then, ECL (Perkin Elmer™, Life Sciences, Boston, USA) detection was performed. The quantification of bands was performed by densitometric analysis using Scion Image program.

2.11. Statistical analysis

In vivo results are expressed as mean \pm S.E.M., except for non-parametric data (score) that are expressed as median (range).

In vitro results are expressed as mean \pm S.D. Differences among means were tested for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc least significance tests. All statistical analyses were carried out with the Statgraphics 5.0 software package (STSC, Maryland), with statistical significance set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. The inhibitory effect of UR-1505 on cellular proliferation is specific for T-lymphocytes

The first aim of this study was to evaluate the specificity of UR-1505, a new salicylic acid derivative. Since it has been reported that acetylsalicylic acid blocks T-cell activation [13], we evaluated the effects of UR-1505 and salicylic acid (SA), which was used as a control, on the *in vitro* proliferation of murine splenocytes activated with concanavalin A (Con A). To determine the involvement of UR-1505 and SA in the proliferative response we used 3 H-thymidine incorporation as an indicator of cell proliferation [23]. Con A (5 μ g/mL) induced T-lymphocyte proliferation (Fig. 1A), and this was inhibited dose-dependently by UR-1505, achieving a complete

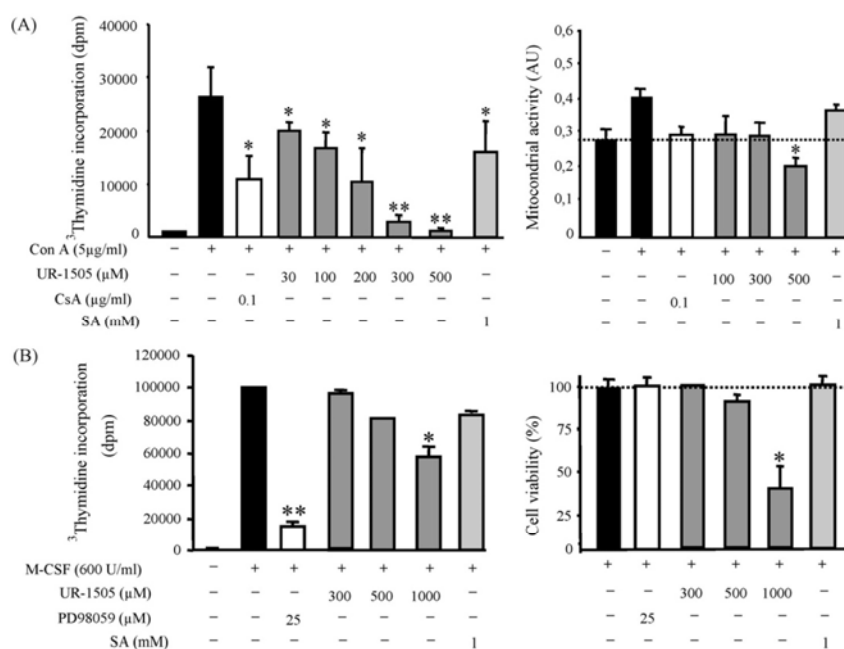


Fig. 1 – Effect of UR-1505 on cellular proliferation and viability on T-lymphocytes and macrophages. **(A)** UR-1505 inhibits the proliferation of Con A activated T-lymphocytes. Splenocytes were incubated in the presence of the indicated amounts of UR-1505, CsA and SA, and stimulated with Con A (5 μ g/mL) during 48 h. Proliferation was determined by 3 H-Thymidine incorporation and cellular viability by WST-1 reagent as indicated in Section 2 ($P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. Con A). **(B)** UR-1505 at physiologic concentrations does not inhibit the proliferation and viability in macrophages. BMDM were incubated with M-CSF in the presence or absence of indicated concentrations of UR-1505, SA and PD98059 for 24 h. Proliferation was determined by 3 H-Thymidine incorporation and cellular viability by Crystal violet technique ($P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs. M-CSF). Results are represented as means \pm S.D. of triplicates.

inhibition at the concentration of 300 μM (Fig. 1A). The inhibitory effect of SA on T-lymphocyte proliferation was only observed at the highest concentration tested (1 mM), as described by other authors [27] (Fig. 1A). Additionally, we used the cyclosporin A (CsA) (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as a control drug which is known that inhibits T-lymphocyte proliferation (Fig. 1A). We also examined the influence of UR-1505, SA and CsA on lymphocyte viability using the WST-1 mitochondrial assay. After 48 h of stimulation with Con A, a higher mitochondrial activity was observed in the culture, most probably due to an increase in the cell number as a consequence of the proliferation process rather than to a direct effect on cell viability (Fig. 1A). UR-1505 (100 and 300 μM) reduced mitochondrial activity to basal levels (Fig. 1A), suggesting that these concentrations did not affect T-lymphocyte viability and the observed reduction in this activity may be attributed to its antiproliferative effects. Similar results were obtained after CsA addition to the cell culture (Fig. 1A). On the contrary, SA did not affect the mitochondrial activity of Con A-activated lymphocytes, as it would be expected from its lack of any significant effect on T-cell proliferation.

In contrast to the effects on T-lymphocytes, UR-1505 had only a weak effect on M-CSF-induced macrophage proliferation, at concentrations ranging from 300 μM to 1 mM, since only a 30% inhibition was detected at the highest concentration (Fig. 1B). Similarly, SA (1 mM) did not affect this cell proliferation, but PD98059 (25 μM), a well known inhibitor of macrophage proliferation [23], showed a clear inhibitory activity (Fig. 1B). In addition, macrophage viability was assayed by crystal violet staining (Fig. 1B) and by Trypan Blue (data not shown). The viability was only affected by the highest concentration of UR-1505 assayed (1 mM), and not by lower concentrations, which showed no significant effect on macrophage proliferation although they effectively inhibited T-lymphocyte proliferation. Similarly, SA did not modify macrophage viability even at high concentrations (1 mM) (Fig. 1B).

3.2. Inhibitory effects of UR-1505 on cytokine secretion in activated T-lymphocytes and macrophages

Stimulation of splenocytes with Con A induces the secretion of different cytokines, including $\text{IFN}\gamma$ (Fig. 2A), IL-12 (Fig. 2B) and $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 2C). These cytokines are typically secreted after activation of Th1 lymphocytes. The TNBS experimental model of rat colitis is also characterized by an overproduction of these Th1 cytokines [6,7]. The pre-treatment with UR-1505 inhibited Con A-induced $\text{IFN}\gamma$ and IL-12 production, in a concentration-dependent manner, showing a 50 and 100% inhibition (Fig. 2A and B), respectively, at 300 μM . However, $\text{TNF}\alpha$ secretion was not significantly inhibited by UR-1505. CsA drastically downregulated both $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ secretions, whereas it slightly increased IL-12 secretion (Fig. 2A, B and C), as previously reported [28]. SA did not significantly modify $\text{IFN}\gamma$ or $\text{TNF}\alpha$ secretions in activated T-lymphocytes, although it was able to increase IL-12 production (Fig. 2B). These results were confirmed by RT-PCR for the different cytokines analyzed (data not shown).

UR-1505 and SA were also tested in LPS- or $\text{IFN}\gamma$ -activated bone marrow-derived macrophages (BMDM). LPS induced high

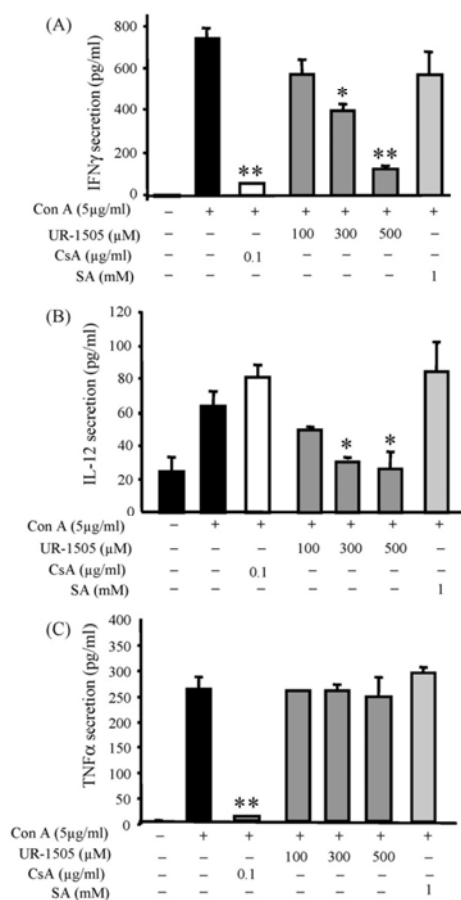


Fig. 2 - Effect of UR-1505 on Th1 cytokine secretion in activated T-lymphocytes. UR-1505 inhibits $\text{IFN}\gamma$ (A), IL-12 (B) but does not affect to $\text{TNF}\alpha$ (C) secretion in Con A-activated T-lymphocytes. Splenocytes were incubated with indicated concentrations of UR-1505, CsA and SA and activated with Con A during 48 h. The concentrations of cytokines in the culture supernatants were analyzed by ELISA. The results of a representative experiment of four independent experiments are shown as means \pm S.D. of triplicates ($P < 0.05$, $^{}P < 0.01$ vs. Con A).**

levels of $\text{TNF}\alpha$ and IL-12 after 24 h. In these cells, UR-1505 (500 μM) did not downregulate $\text{TNF}\alpha$ or IL-12 secretion. SA (1 mM) inhibited $\text{TNF}\alpha$ secretion in this cell type (Fig. 3A), whereas it increased IL-12 production (Fig. 3B). Moreover, UR-1505 (100 μM -1 mM) was devoid of any significant effect on iNOS or COX-2 expression after LPS or $\text{IFN}\gamma$ stimulation (Fig. 3C and D). However, SA (1 mM) inhibited the COX-2 expression induced by LPS or $\text{IFN}\gamma$ activation but only induce a minor modification on iNOS expression (Fig. 3C and D).

All these results reveal that UR-1505 specifically affects T-lymphocytes without showing significant effects on macro-

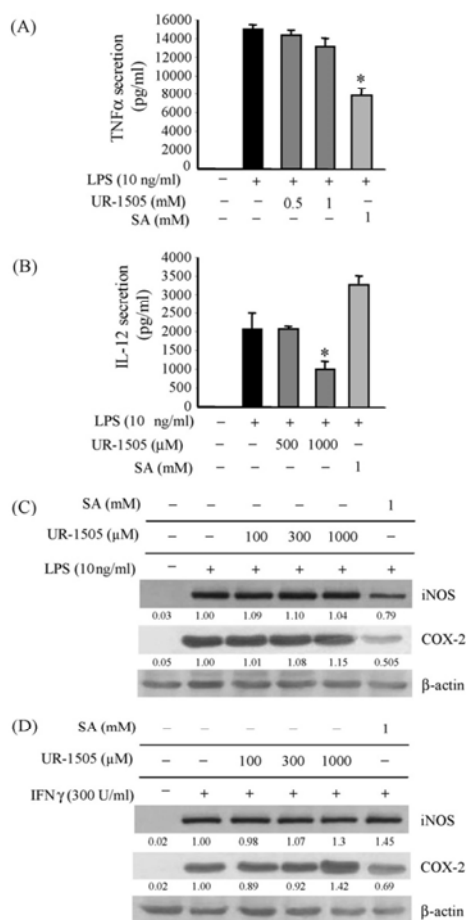


Fig. 3 – Effect of UR-1505 on pro-inflammatory markers in activated macrophages. UR-1505 at high doses does not affect to TNF α secretion (A), but inhibits IL-12 secretion (B) in LPS-activated macrophages. BMDM were incubated with indicated concentrations of UR-1505 and SA and then were activated with LPS during 24 h. The concentrations of cytokines in the culture supernatants were analyzed by ELISA. Each experiment was performed three times and represented as the mean \pm S.D. UR-1505 does not inhibit the iNOS and COX-2 expression induced by LPS (C) or IFN γ (D) in macrophages. BMDM were pretreated with UR-1505 or SA for 1 h and then incubated with LPS or IFN γ for 6 and 24 h, respectively. The iNOS and COX-2 expression were analyzed by Western blotting. Densitometric analysis of the bands was performed and the values obtained are represented in the figure as the normalized band intensity (iNOS or COX-2/actin) and referred as the maximum intensity band value in LPS or IFN γ stimulated value (1.00). All of these experiments were performed in triplicate with similar results ($P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs. LPS).

phage activity. Low concentrations of this drug (100–300 μ M) inhibited activated T-cell proliferation and the production of different cytokines. On the contrary, even high concentrations did not significantly modify TNF α secretion, COX-2 or iNOS expression in activated macrophages.

3.3. Inhibitory effect of UR-1505 on inflammation in the TNBS model of rat colitis

The second aim of this work was to address whether UR-1505 inhibits the inflammation induced in the TNBS model of rat colitis. The assayed doses of UR-1505 were 10 and 30 mg/kg. One week after colitis induction, thickening of the bowel wall was evident in TNBS control rats with a significant increase in the colonic weight/length ratio in comparison with non-colitic rats ($P < 0.01$; Table 1). The administration of UR-1505 (10 or 30 mg/kg) for 7 days exerted an intestinal anti-inflammatory effect that included a decrease in the weight/length ratio in UR-1505 treated colitic groups compared to TNBS control ($P < 0.05$; Table 1), as well as a significant reduction in the extent of colonic damage, resulting in a lower macroscopic damage score (Table 1). The intestinal anti-inflammatory activity of UR-1505 was also evidenced biochemically since it significantly counteracted glutathione depletion that occurred as a consequence of the inflammation in untreated colitic rats (Table 1). Of note, preliminary experiments performed in healthy rats treated with UR-1505 for 7 days, at doses ranging from 5 to 30 mg/kg, revealed the absence of any deleterious effect when compared with untreated rats (data not shown).

Microscopically, TNBS caused the typical inflammatory features in the colonic architecture: ulceration, crypt dilation, goblet cell depletion as well as mixed cell infiltration, mainly composed by mononuclear cells (macrophages, lymphocytes and plasmatic cells), although granulocytes were also present (Fig. 4B). Both doses of UR-1505 improved the colonic architecture since most of the treated rats showed an almost complete restoration of the damaged colon displaying a moderate inflammatory infiltrate with a focal distribution (Fig. 4C and D). Only 20% of the treated rats presented of gross ulceration with a prominent inflammatory cell infiltrate. There was also a restoration in the crypt architecture with goblet cell and mucin replenishment (Fig. 4).

3.4. UR-1505 treatment down-regulates several pro-inflammatory markers in the TNBS model of rat colitis

We further evaluated the effects of oral administration of UR-1505 (10 and 30 mg/kg/day) on several colonic inflammatory markers in the TNBS model of rat colitis 7 days after, i.e. colonic TNF α and LTB $_4$ production, myeloperoxidase (MPO) activity, as well as iNOS, COX-2 and IFN γ expression, being the latter one of the main pro-inflammatory cytokines in CD [6,7]. As expected, all these biochemical parameters were significantly modified as a consequence of the inflammatory process, showing increased colonic MPO activity, LTB $_4$ and TNF α levels (Table 2), as well as enhanced iNOS (Table 2 and Fig. 5A), COX-2 (Fig. 5A) and IFN γ (Fig. 5B) expression. UR-1505 treatment, at doses of 10 and 30 mg/kg, significantly inhibited MPO activity, confirming the decrease of neutrophil infiltration evidenced histologically (Fig. 1). Moreover, UR-1505

Table 1 – Effects of UR-1505 (10 and 30 mg/kg) treatment in colon weight/length, extent of the inflammatory lesion along the colon, macroscopic damage score and glutathione (GSH) content in TNBS experimental colitis in rats

Group (n = 10)	Weight/length (mg/cm)	Extent of damage (cm)	Damage score (0–10)	GSH (nmol/g)
Non-colic	61.2 ± 1.7	0	0	1948 ± 44
TNBS control	184.2 ± 13.3 ^{##}	4.7 ± 0.3 ^{##}	7.5 (7–9) ^{##}	1652 ± 55 ^{##}
UR-1505 (10 mg/kg)	155.8 ± 14.3 ^{##,†}	3.3 ± 0.5 ^{##,†}	6 (4–9) ^{##,†}	1835 ± 59 [†]
UR-1505 (30 mg/kg)	142.2 ± 13.6 ^{##,†}	2.7 ± 0.4 ^{##,™}	6 (4–7) ^{##,™}	1854 ± 60 [†]

The colon weight data and extent of damage are expressed as mean ± S.E.M.

[†] P < 0.05 vs. TNBS control group.

[™] P < 0.01 vs. TNBS control group.

^{##} P < 0.01 vs. non-colic group. Damage score for each rat was assigned according to the criteria described by Bell et al. (1995) and data are expressed as median (range).

administration to colitic rats resulted in a significant reduction of the colonic production of LTB₄ and TNF α (Table 2). The beneficial effects exerted by both doses of UR-1505 on colonic inflammation were also associated with a lower colonic expression of iNOS (Table 2 and Fig. 5A) and IFN γ (Fig. 5B) when compared with TNBS control animals. However, UR-1505 treatment was not able to inhibit the COX-2 expression induced by TNBS administration (Fig. 5A).

3.5. UR-1505 treatment affects cell infiltration into the intestinal epithelium in the TNBS model of rat colitis

Immunofluorescence staining of colonic samples from TNBS control group confirmed the presence of both macrophages and T-lymphocytes in the inflamed areas of the intestine, mainly located in the lamina propria and the submucosa adjoining regions of ulceration (Fig. 6). In addition, neutrophils

were also found in crypt abscesses and in the surface of ulcerated epithelium (data not shown). The intestinal anti-inflammatory effect exerted by UR-1505 is associated with a decreased number of infiltrated macrophages, T-lymphocytes (Fig. 6) and neutrophils (data not shown).

4. Discussion

CD is characterized by a chronic-intermittent transmural, segmental, and typically granulomatous inflammation of different segments of the intestine. Although many important findings have been reported recently, it is not fully understood why the mucosal immune response is over-reactive in patients with this intestinal condition, or how current medical treatment affects the mucosal immune system. However, it has become more and more evident that alterations in the

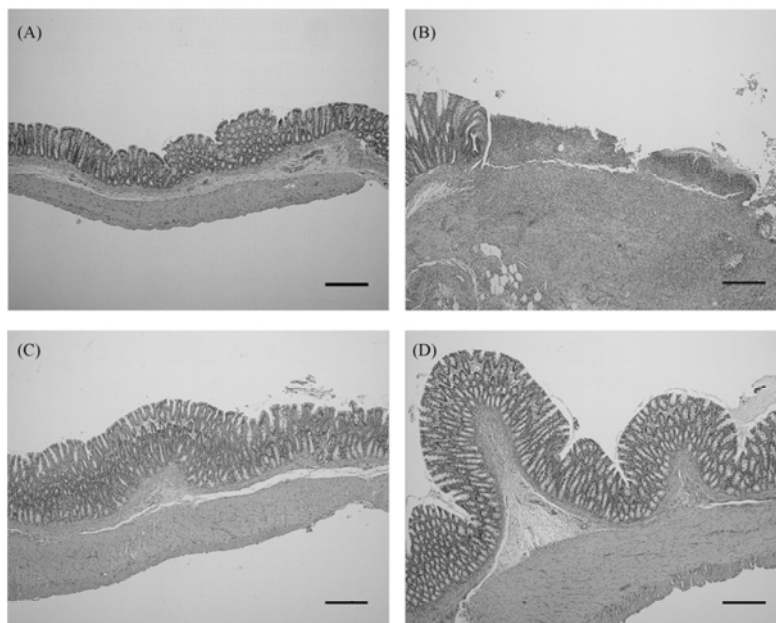


Fig. 4 – Histological sections of colonic mucosa from TNBS-induced colitic rats treated with UR-1505 stained with hematoxylin and eosin showing the anti-inflammatory effect of UR-1505 treatment. (A) Non-colic group; (B) TNBS-control group; (C and D) UR-1505 treated groups at doses of 10 and 30 mg/kg, respectively. Calibration bar = 200 μ m.

Table 2 – Effects of UR-1505 (10 and 30 mg/kg) treatment on colonic MPO activity, LTB₄ and TNF α and iNOS expression in induced-TNBS experimental colitis in rats

Group (n = 10)	MPO activity (units/g)	LTB ₄ (ng/g)	TNF α (pg/g)	iNOS (arbitrary units)
Non-colitic	27.7 \pm 4.5	2.2 \pm 0.3	226.5 \pm 12.0	0.162 \pm 0.018
TNBS control	181.4 \pm 13.8 ^{**}	7.8 \pm 0.4 ^{**}	309.5 \pm 20.0 ^{**}	1.078 \pm 0.142 ^{**}
UR-1505 (10 mg/kg)	148.0 \pm 9.5 ^{**,*}	5.6 \pm 0.5 ^{**,*}	232.7 \pm 27.9 ^{**}	0.451 \pm 0.038 ^{**,*}
UR-1505 (30 mg/kg)	130.1 \pm 5.6 ^{**,*}	4.9 \pm 0.7 ^{**,*}	204.3 \pm 20.1 ^{**}	0.460 \pm 0.030 ^{**,*}

Data are expressed as mean \pm S.E.M.
^{*} P < 0.05 vs. TNBS control group.
^{*} P < 0.01 vs. TNBS control group.
^{**} P < 0.01 vs. non-colitic group.

innate immunity are crucial in the pathogenesis of CD and involve a deregulated Th1 lymphocyte response [6,7]. Considering this, different immunosuppressive therapies have been developed lately [9,10,29].

In the present study, we have used the TNBS model of rat colitis that resembles CD pathology [4,5]. Indirect evidences suggest that CD4⁺ T cells play a major role in the initiation and perpetuation of TNBS colitis, mostly driven by a Th1 cytokine response, as supported by the attenuating effects obtained after T cell-directed immunotherapies: anti-IL-12 monoclonal antibody (mAb), anti-CD40L mAb, antiinterferon- γ mAb, or OX40-Ig [30,31].

UR-1505 is a novel salicylate derivative with an adequate oral bioavailability in rats, since 96.9% of the administered dose (ranging from 10 to 50 mg/kg), is absorbed in the small intestine, thus providing high plasma levels (unpublished data). In consequence, the oral administration of a unique dose of 30 mg/kg would probably result in a blood concentra-

tion higher than 200 μ M, and in consequence, able to systemically inhibit lymphocyte activity as demonstrated in the *in vitro* experiments.

The main aim of this work was to evaluate its anti-inflammatory and immunomodulatory properties in the main types of cells involved in the TNBS rat colitis, namely macrophages and T-lymphocytes, comparing its pharmacological profile with CsA and SA. The *in vitro* results obtained in the present study suggest that UR-1505 inhibits T-cell proliferation and Th1 cytokine production (IL-12 and IFN γ) when T-lymphocytes are activated with Con A. However, this drug neither affects TNF α and IL-12 secretion nor iNOS and COX-2 expression in activated macrophages. For this reason, UR-1505 seems to be more specific for T-lymphocytes than for macrophages, most probably by interfering a common pathway implicated in IL-12 and IFN γ production in activated T-cells. The possible mechanisms involved in this effect are currently being investigated in our group.

UR-1505 inhibits activated T-lymphocyte proliferation in a similar way as CsA. However, there are some differences when their effects on cytokine release are analyzed suggesting different mechanism of action of both drugs; while UR-1505 reduces both IFN γ and IL-12 secretions, without showing any significant effect on TNF α , CsA downregulates IFN γ and TNF α , as well as it slightly increases IL-12 production in Con A activated T-lymphocytes. Although UR-1505 is a derivative of SA, its immunomodulatory properties are also clearly different. In fact, SA has antiproliferative properties in Con A activated T-lymphocytes (although at higher concentrations than UR-1505), but it does not inhibit IFN γ and TNF α secretions, and increases IL-12 production. In addition, SA inhibits COX-2 expression in macrophages stimulated with LPS and IFN γ while UR-1505 does not. All these results suggest that UR-1505 shows a different anti-inflammatory profile than SA, supporting a potential role of this new drug for the oral treatment of different inflammatory conditions associated to an altered immune response such as CD.

The efficacy of UR-1505 in an experimental model of intestinal inflammation has been clearly shown, since this compound was able to facilitate the recovery from TNBS-induced colonic damage, as evidenced by a significant amelioration in the different inflammatory parameters assayed. However, some contradictory results arise between the *in vivo* and the *in vitro* studies regarding the effects of this new drug on the altered immune response. Thus, UR-1505 treatment to colitic rats inhibits the colonic production of TNF α and iNOS expression; however, this drug is not able to

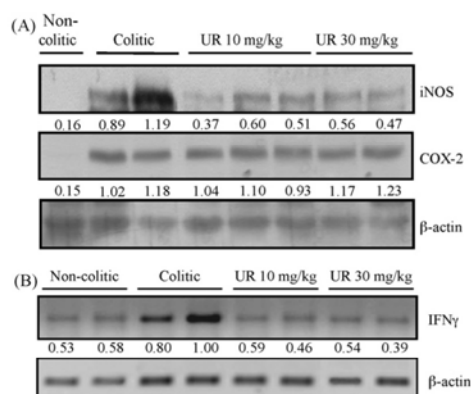


Fig. 5 – UR-1505 treatment inhibits IFN γ and iNOS expression but it does not modify COX-2 expression in TNBS-induced colitic rats. The iNOS and COX-2 expression is evaluated by Western blot (A) and IFN γ expression was assessed by semiquantitative RT-PCR (B). Densitometric analysis of the bands was performed and the values obtained are represented in the figure as the normalized band intensity (iNOS/actin, COX-2/actin and IFN γ /actin) and referred as the maximum intensity band value in control colitic rats (1.00). The gel shown is representative of all colonic samples per group (n = 10).

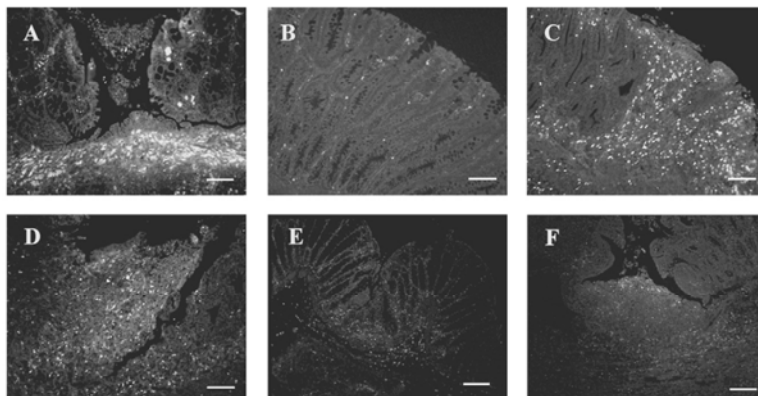


Fig. 6 - UR-1505 treatment inhibits the macrophages and T-lymphocytes recruitment in the TNBS model of rat colitis. Immunofluorescence of macrophages (A-C) and T-lymphocytes (D-F) were performed in histological sections of colonic mucosa from colitic rats. The sections of TNBS-control group (A and D) and UR-1505 treated groups at doses of 10 mg/kg (B and E) and 30 mg/kg (C and F), were incubated with anti-rat mononuclear phagocytes or anti-rat CD3 antibodies. Calibration bar = 50 μ m.

downregulate these parameters in activated macrophages, the main producers of these mediators, which are clearly increased in the inflamed intestine [26]. The lower granulocyte infiltration in the damaged areas of the intestine after UR-1505 treatment, as observed biochemically (reduced colonic MPO activity) and by immunohistochemistry, would probably justify the ability of this drug to modify the global inflammatory response, since it is well described that, in the first steps of the gut inflammation, margination and extravasation of circulating granulocytes probably result in the perpetuation of the inflammatory process [32,33]. Supporting this, glutathione depletion also takes place, most probably due to a greater oxidative stress derived from granulocyte activity in the inflamed areas of the intestine [34]. Moreover, the decrease in neutrophil infiltration may also account for the partial reduction in the colonic production of LTB_4 observed after UR-1505 treatment, as neutrophils are considered the main source of this chemotactic eicosanoid in IBD [18].

Although UR-1505 does not probably affect macrophage cell activity *per se*, its oral administration to colitic rats reduces the infiltration of these cells into the inflamed intestine and it may also contribute to its beneficial effects. In fact, macrophages are considered an important source of several pro-inflammatory mediators, such as NO, $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ [26]. Among these, $\text{TNF}\alpha$ secretion and NO overproduction have been proposed to play a deleterious role in colonic inflammation [35-37]. Therefore, we can consider that the *in vivo* inhibitory effects of UR-1505 on colonic $\text{TNF}\alpha$ production and iNOS expression might be secondary to a reduced macrophage infiltration, since, as observed *in vitro*, this compound was not able to reduce $\text{TNF}\alpha$ production or iNOS expression in activated macrophages. Moreover, although UR-1505 treatment inhibits MPO activity significantly, it does not restore this enzymatic activity to the basal levels. This suggests that UR-1505 does not directly inhibit neutrophil activity (nor macrophage activity) but it is able to reduce the leukocyte

infiltration, most probably by inhibiting the production and/or release of chemotactic molecules by other cell types, including lymphocytes. In addition, the lower leukocyte infiltration could also account for the restoration in colonic glutathione, since a lower oxidative insult would occur.

These results led us to suggest that UR-1505 could probably exert its action through the reduction of the inflammatory cell recruitment to the inflammatory foci and the disruption of the positive feedback process involved in the perpetuation of the inflammatory response in the intestine by inhibiting T-lymphocyte activity, proliferation and production and release of cytokines, like $\text{IFN}\gamma$, the main macrophage activator [38], and IL-12 , that promotes the differentiation of CD4^+ T-cells into Th1 effector cells [39]. Thus, UR-1505 would downregulate the adaptive immunity and the perpetuation of the inflammatory response.

It is important to note that UR-1505 treatment did not ameliorate COX-2 expression induced by TNBS colitis. This is in agreement with the *in vitro* experiments performed in macrophages when stimulated with LPS or $\text{IFN}\gamma$, and supports the T-lymphocyte specificity proposed for UR-1505. Although the *in vivo* assays revealed that there was a lower macrophage infiltrate in the colitic group treated with UR-1505, as evidenced by IHC (Fig. 6) or by a reduction in colonic iNOS expression (Fig. 5A), the lack of any significant effect on COX-2 expression may be derived from its different distribution in colonic tissue since it has been proposed that it is mainly induced in intestinal epithelial cells [40], in agreement with the specificity showed by this compound toward T-lymphocytes.

One limitation in this study may arise from the experimental design, since TNBS and UR-1505 were administered concurrently. This may result in an attenuation of the colitis induction by UR-1505 rather than a facilitated recovery of the damaged colonic tissue. In this sense, additional assays performed with this drug revealed that UR-1505 treatment does not prevent the acute colonic damage 24 h after TNBS

administration (data not shown). This suggests that the compound is devoid of any preventative effect in this experimental model of rat colitis, but it facilitates the restoration of the inflamed tissue, an effect already achieved 48 h after TNBS instillation (unpublished results).

In conclusion, UR-1505 administration facilitates the recovery of the inflamed tissue in the TNBS model of rat colitis, an effect associated with a reduced recruitment of inflammatory cells in the inflamed tissue that results in the reduction of some proinflammatory mediators, including cytokines, like TNF α and IFN γ , eicosanoids, like LTB $_4$, and NO. Moreover, its ability to inhibit T-lymphocyte activation also facilitates the recovery of the damaged tissue by inhibiting the reactivation of the exacerbated immune response that takes place in these intestinal conditions, thus suggesting that UR-1505 treatment could be a good candidate for the CD therapy and other Th1-mediated inflammatory diseases. However, clinical studies will be required in order to confirm the safety and efficacy of this new drug in the management of CD.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2005-03199), with funds from the European Union, from Junta de Andalucía (CTS 164) and from J. Uriach y Compañía S.A. (Palau-solità i Plegamans, Barcelona, Spain). M.C. is a recipient of Juan de la Cierva Program from Spanish Ministry of Science and Technology. E.B. is recipient of a fellowship from the Ministry of Science and Technology, Spain. The authors want to thank M.E. Rodríguez-Cabezas for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- [2] Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;216:149-59.
- [3] Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15:291-7.
- [4] Strober W, Fuss IJ, Ehrhardt RO, Neurath M, Boirivant M, Ludviksson BR. Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation. *Scand J Immunol* 1998;48:453-8.
- [5] Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549.
- [6] Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, 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;157:1261-70.
- [7] Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzo F, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-78.
- [8] Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* 2004;126:1582-92.
- [9] Holtmann MH, Galle PR, Neurath MF. Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:455-66.
- [10] Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117:761-9.
- [11] Egan LJ, Sandborn WJ. Drug therapy of inflammatory bowel disease. *Drugs Today (Barc)* 1998;34:431-46.
- [12] Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology* 2000;101:53-60.
- [13] Paccani SR, Boncristiano M, Olivieri C, D'Elios MM, Del Prete G, Baldari CT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem* 2002;277:1509-13.
- [14] Kim H, Jeon H, Kong H, Yang Y, Choi B, Kim YM, et al. A molecular mechanism for the anti-inflammatory effect of taurine-conjugated 5-aminosalicylic acid in inflamed colon. *Mol Pharmacol* 2006;69:1405-12.
- [15] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
- [16] Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodríguez-Cabezas ME, et al. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:265-71.
- [17] Lara-Villoslada F, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, et al. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr* 2006;45:418-25.
- [18] Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995;268:G622-30.
- [19] 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.
- [20] Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985;113:548-55.
- [21] Xaus J, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mana J, et al. High expression of p21Waf1 in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:295-301.
- [22] Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1010-21.
- [23] Comalada M, Valledor AF, Sanchez-Tillo E, Umbert I, Xaus J, Celada A. Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *Eur J Immunol* 2003;33:3091-100.
- [24] Comalada M, Bailon E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:487-97.
- [25] Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, et al. The intestinal

- anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004;143:908-18.
- [26] Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* 2005;35:584-92.
- [27] Cavallini L, Francesconi MA, Zoccarato F, Alexandre A. Involvement of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation in mitogen-induced lymphocyte proliferation: inhibitory effects of lymphoproliferation by salicylates acting as NF-kappaB inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:141-7.
- [28] Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998;161:3930-5.
- [29] Arnott ID, Watts D, Satsangi J. Azathioprine and anti-TNF alpha therapies in Crohn's disease: a review of pharmacology, clinical efficacy and safety. *Pharmacol Res* 2003;47:1-10.
- [30] Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-90.
- [31] Higgins LM, McDonald SA, Whittle N, Crockett N, Shields JG, MacDonald TT. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J Immunol* 1999;162:486-93.
- [32] Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 2002;169:6467-73.
- [33] Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002;33:311-22.
- [34] Galvez J, Garrido M, Rodriguez-Cabezas ME, Ramis I, de Medina FS, Merlos M, et al. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:363-71.
- [35] Van Deventer SJ. Tumor necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997;40:443-8.
- [36] Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, et al. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002;82:597-607.
- [37] Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995;37:247-55.
- [38] Celada A, Allen R, Esparza I, Gray PW, Schreiber RD. Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1985;76:2196-205.
- [39] Gorham JD, Guler ML, Murphy KM. Genetic control of interleukin 12 responsiveness: implications for disease pathogenesis. *J Mol Med* 1997;75:502-11.
- [40] Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vmadevan AS, Thomas LS, et al. COX-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 2006;131:862-77.



Capítulo 7

*UR-1505, a Salicylate Able to
Selectively Block T-Cell Activation,
Shows Intestinal Anti-inflammatory
Activity in the Chronic Phase of the
DSS Model of Rat Colitis*

Inflamm Bowel Dis. 14: 888-897. 2008

UR-1505, un salicilato capaz de bloquear la activación de linfocitos T de forma específica, muestra actividad antiinflamatoria intestinal en la fase crónica del modelo de colitis experimental inducido por DSS en rata

Objetivos:

El objetivo del presente estudio fue comprobar si el tratamiento con el UR-1505 provocaba un efecto antiinflamatorio intestinal en la colitis experimental inducida por la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) en rata, considerado un excelente modelo para correlacionarlo con la colitis ulcerosa (CU). Además, se realizaron estudios *in vitro* sobre la activación de linfocitos T procedentes de bazo y de macrófagos procedentes de médula ósea de ratón (BMDM, *bone marrow-derived macrophage*).

Resultados:

Para determinar la eficacia terapéutica del nuevo fármaco, utilizamos dos protocolos de colitis experimental inducida por DSS en ratas: colitis aguda y colitis establecida. El primer protocolo consistió en la incorporación del DSS al agua de bebida a una concentración del 5% durante 5 días (colitis aguda); en el segundo protocolo, una vez la colitis aguda fue inducida, la concentración de DSS se redujo al 2% y se mantuvo durante 10 días (colitis establecida). Se ha demostrado que la inflamación aguda inducida por DSS es producida principalmente por la activación de una respuesta de tipo innata, donde participan neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, en la fase crónica, se produce además una activación de la respuesta inmune adaptativa, con activación de las células T, que desempeñan un papel muy importante en la perpetuación de la inflamación intestinal.

Ambos protocolos provocaron una inflamación intestinal caracterizada por anorexia, diarrea y sangre en las heces, junto con un incremento significativo de la relación peso/longitud colónica y de la infiltración leucocitaria. Además, el proceso inflamatorio mostró un aumento en la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *tumor necrosis factor α*) y la IL-1 β , y de otros mediadores proinflamatorios como la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, *inducible nitric oxide sintase*) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). El daño tisular durante la inflamación intestinal también llevó a una depleción del antioxidante glutatión (GSH). Un hecho significativo fueron las diferencias observadas en el aumento de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en los dos modelos de colitis. El incremento de la actividad enzimática fue mucho más severo en la colitis aguda que en la colitis establecida lo que nos sugirió un cambio en el perfil celular del infiltrado inflamatorio entre los dos tipos de protocolos, con una menor presencia y/o activación de neutrófilos en la fase establecida.

La administración del UR-1505 se realizó al mismo tiempo que la incorporación del DSS al 5% al agua de bebida (protocolo preventivo) en el caso de la colitis aguda, y en el momento de la reducción de la concentración de DSS (protocolo curativo), en el caso de la colitis establecida. Los resultados obtenidos demostraron que la administración del UR-1505 (10 y 30 mg/kg) en la fase aguda de la colitis inducida por DSS, no dio lugar a un efecto antiinflamatorio significativo, ya que no se modificaron los parámetros macroscópicos (relación peso/longitud del colon) ni los marcadores bioquímicos de inflamación evaluados (actividad MPO y contenido de GSH). Sin embargo, en el caso de la colitis establecida, el tratamiento con el UR-1505 dio lugar a un claro efecto antiinflamatorio, observado, macroscópicamente, por una disminución del daño colónico, e histológicamente por la restauración de la citoarquitectura de las criptas, de las células caliciformes y por la disminución del infiltrado de células mononucleares en mucosa y submucosa. Bioquímicamente, se observó un aumento de los niveles de GSH, una disminución de la producción del TNF α y de la IL-1 β , y una inhibición de la expresión de las enzimas iNOS y COX-2.

En los estudios *in vitro* se utilizaron los linfocitos T procedentes de bazo de ratón, estimulados con concanavalina A (ConA). La ConA es un activador policlonal del receptor de células T (TCR, *T cells receptor*) que da lugar a la proliferación y a la activación de dichas células, con un aumento de la producción de citocinas como la IL-1 β o la IL-6. Además, se analizó el efecto del UR-1505 sobre los BMDM, células que se encuentran proliferando en la presencia del factor de crecimiento específico de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*) y se activan cuando son estimulados con lipopolisacárido (LPS), provocándose la producción de citocinas como el TNF α y la IL-1 β . Los resultados mostraron que el UR-1505 inhibió la proliferación y la producción y la expresión de IL-1 β e IL-6 en linfocitos T activados con ConA. Estas dos citocinas juegan un papel muy importante en la patología de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y en el modelo de colitis experimental inducido por DSS. Sin embargo, el tratamiento con el UR-1505 fue incapaz de modificar la proliferación y la activación de los BMDM.

Conclusión:

Los diferentes resultados confirman la importancia de seleccionar y optimizar el modelo experimental para evaluar los posibles fármacos útiles para la EII. Los datos sugieren que la falta de eficacia del UR-1505 en la colitis aguda inducida por DSS podría ser atribuida a la selectividad del compuesto por las diferentes células inmunológicas implicadas en la respuesta inflamatoria. El UR-1505 es capaz de inhibir la proliferación y activación de linfocitos T procedentes de bazo de ratón estimulados con ConA, pero no afecta a los BMDM, lo que podría explicar que el compuesto posea actividad antiinflamatoria intestinal en la colitis establecida, donde, además de una participación de neutrófilos y macrófagos, existe una importante activación de linfocitos. Por esto, el UR-1505 podría considerarse un buen candidato para inducir remisión o terapias de mantenimiento en la EII en humanos, en concreto en la CU, patología con características

similares a lo que ocurre en el modelo de colitis experimental inducido por la administración de DSS.

ORIGINAL ARTICLE

UR-1505, a Salicylate Able to Selectively Block T-Cell Activation, Shows Intestinal Anti-inflammatory Activity in the Chronic Phase of the DSS Model of Rat Colitis

Elvira Bailón, BS,* Mònica Comalada, PhD,* Juan Román, PhD,[†] Pedro Michelena, PhD,[†] Isabel Ramis, PhD,[†] Manuel Merlos, PhD,[†] Ana Nieto, PhD,[‡] Angel Concha, MD,[§] Antonio Zarzuelo, PhD,* and Julio Gálvez, PhD*

Background: UR-1505 is a novel salicylate derivative compound that has been demonstrated to selectively down-regulate T-cell activation. The aim of the present study was to elucidate the mechanisms involved in the intestinal anti-inflammatory effects of UR-1505 in 2 protocols of a dextran sodium sulfate (DSS) model of rat colitis: acute and established colitis.

Methods: The first protocol consisted of incorporating DSS into the drinking water at a concentration of 5% (w/v) for 5 days (acute initial colitis). In the second protocol, once the acute colitis had been induced, the concentration of DSS was reduced to 2% (w/v) and maintained for 10 days (established colitis).

Results: The results obtained demonstrated that although UR-1505 did not exert a significant intestinal anti-inflammatory effect in ameliorating the initial steps of the intestinal inflammation induced by DSS, it had a beneficial effect on ongoing inflammation, most probably through inhibiting activation of T lymphocytes, thus avoiding perpetuation of the inflammatory process.

Conclusions: These results suggest that this compound is a good candidate for inducing remission or maintaining therapies in human inflammatory bowel disease (IBD). Moreover, the different results obtained by UR-1505 in these 2 protocols of colitis induction (acute

initial colitis versus established colitis) confirm the importance of selection and optimization of the experimental model to evaluate the drugs to be used in IBD therapy.

(*Inflamm Bowel Dis* 2008;13:000–000)

Key Words: salicylates, NSAIDs, rat DSS experimental colitis, innate immunity, macrophages, T cells

The term *inflammatory bowel disease* (IBD) refers to chronic diseases of the digestive tract, mainly ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), characterized by chronic and spontaneously relapsing inflammation. At present, the etiology of IBD is not fully understood, but there is increasing experimental evidence that it is related to an abnormally exacerbated immune response to otherwise innocuous stimuli that is not properly counteracted by the feedback system.¹ It has been reported that mucosal injury in IBD is the result of the inflammatory response generated by persistent and inappropriate mucosal T-cell activation, resulting in early histological and functional changes as well as late permanent tissue destruction.² A specific causal treatment of IBD is not yet available because the predisposing and triggering factors of this exacerbated immune response have not been clearly identified. Therefore, therapeutic and preventive strategies for these disorders must rely on interrupting or inhibiting the immunopathogenic mechanisms involved.

One of the strategies to effectively down-regulate the inflammatory response that characterizes IBD may be to interfere with the first steps of this exacerbated immune response by blocking the initial innate immunity. This is the case with some biological therapies targeting inflammatory cytokines mainly produced by activated macrophages. In fact, the successful use of anti-IL-12 or anti-TNF α antibodies in CD patients has been reported.^{3,4} However, to obtain a sustained response with time, it is necessary to administer these antibodies periodically. This can result in the development of important adverse effects that limit their extensive use. Despite the scientific interest in these biological therapies, classical immunosuppressant drugs, including azathioprine,

Received for publication August 30, 2007; Accepted December 4, 2007.

From the *Department of Pharmacology, CIBER-EHD, School of Pharmacy, University of Granada, Spain; [†]Pharmacology & Toxicology, Palau Pharma, S.A., Palau-solità i Plegamans, Barcelona, Spain; [‡]Andalusian Stem Cell Bank, Health and Progress Foundation, Granada, Spain; [§]Department of Pathology, Hospital Universitario "Virgen de las Nieves," Granada, Spain.

Supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2005-03199), with funds from the European Union, the Junta de Andalucía (CTS 164), and Palau Pharma S.A. (Barcelona, Spain).

Elvira Bailón and Mònica Comalada contributed equally to this article.

Antonio Zarzuelo and Julio Gálvez contributed equally to the supervision of this study.

Reprints: Julio Gálvez, PhD, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Universitario 'La Cartuja' s/n, 18071 Granada, Spain (e-mail: jgalvez@ugr.es)

Copyright © 2008 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.20381

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

methotrexate, cyclosporin A, and tacrolimus, continue to play a pivotal role in the management of inflammatory bowel diseases. They mainly act by inhibiting T-cell activation and the subsequent activation of adaptive immunity.⁵ It is important to note that the administration of these drugs is limited by inconsistent efficacy, a relatively slow onset of action, inadequate selectivity, or substantial short- and long-term toxicity.⁵ For this reason, the development of new drug treatments that are both effective and safe is an important goal in IBD therapy.

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used anti-inflammatory drugs whose spectrum of activity goes far beyond inhibition of cyclooxygenase. Among NSAIDs, acetylsalicylic acid is reported to block T-cell activation,^{6,7} although this effect was observed at relatively high concentrations. UR-1505 is a novel salicylate derivative compound that has been shown to selectively inhibit T-cell proliferation, to down-regulate T-cell activation,⁸ and to exert intestinal anti-inflammatory activity in the TNBS model of rat colitis,⁹ making it a suitable candidate to be developed in IBD treatment.

The aim of the present study was to test the intestinal anti-inflammatory effect of UR-1505 in the dextran sodium sulfate (DSS) model of rat colitis, characterized by the production of intestinal inflammation limited to the colonic mucosa, which is more closely related to human ulcerative colitis,¹⁰ as opposed to the TNBS model of rat colitis, which induces a transmural lesion with pathological characteristics similar to Crohn's disease.¹¹ In this context and in order to evaluate the significance of the therapeutic use of this new drug, we used 2 protocols of experimental DSS colitis in rats: acute and established colitis. The first consisted of the incorporation of DSS into the drinking water of the animals at an initial concentration of 5% (w/v) for 5 days (acute initial colitis); in the second protocol, after induction of acute inflammation, the concentration of DSS was reduced to 2% (w/v), which was maintained for 10 days (established colitis).¹² It has been reported that the acute initial inflammation induced by DSS is produced mainly by activation of innate immune cells, including neutrophils and macrophages,¹³ whereas in the chronic phase, the adaptive immune response, mainly produced by T-cell activation, plays an important role in the perpetuation of gut inflammation.¹⁴ Moreover, *in vitro* experiments with murine T cells and bone marrow-derived macrophages were also performed to further characterize the immune response induced by UR-1505. The results obtained in this study demonstrated that UR-1505 is a good candidate for inducing remission or maintaining therapy in IBD.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain) unless otherwise stated. Glutathione reduc-

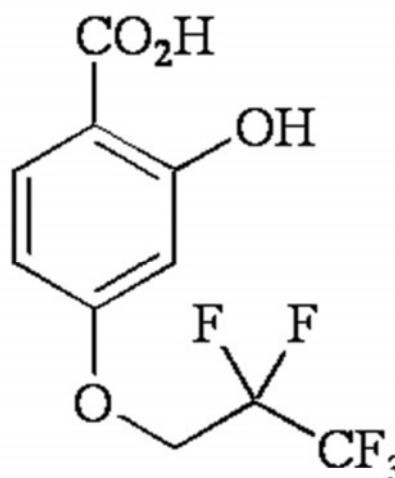


FIGURE 1. Chemical structure of UR-1505.

tase was provided by Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). UR-1505 [2-hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)benzoic acid] was synthesized by J Uriach & Cia S.A. (Barcelona, Spain; Fig. 1).

Animals

Balb/C mice (20–24 g) and Wistar rats (180–200 g) were obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Granada (Granada, Spain). This study was carried out in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" as promulgated by the National Institutes of Health.

Cell Cultures

To obtain primary lymphocytes cultures, spleens were removed from male Balb/C mice and homogenized in DMEM plus 1% penicillin/streptomycin. After centrifugation (1500 rpm, 5 minutes), erythrocytes were lysed with the buffer (NH₄Cl 1.7 mol/L, KHCO₃ 0.12 mol/L, ethylenediamine-tetraacetic 9 mmol/L) for 30 minutes at 4°C. Resting cells were counted with a hemacytometer and cultured to perform the proliferation and stimulation assays in the current culture medium (DMEM+10% FBS). Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were also obtained and cultured in DMEM, which contained 20% FBS and 30% L-cell-conditioned medium as a source of macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF).¹⁵ After 7 days of culture, a homogeneous population of adherent macrophages was obtained. To render cells quiescent (for the proliferation assay), at 80% confluence macrophages were

deprived of L-cell-conditioned medium for 16–18 hours before the distinct stimuli.¹⁵

Proliferation and Viability Assays

Spleen-derived lymphocytes were cultured in 24-well plates (1.5×10^6 cells/well) in 0.5 mL of medium and stimulated with Con A ($5 \mu\text{g/mL}$). Quiescent macrophages were cultured in 24-well plates (1×10^5 cells/well) in 0.5 mL of medium and stimulated with L cells as the source of M-CSF (1200 U/mL). Cell proliferation was measured by the incorporation of ^3H -thymidine incorporation as previously described¹⁵ in the presence or the absence of the indicated concentrations of UR-1505.

T-cell viability was determined using the Reagent WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Determination of Cytokine Production

Macrophages and splenocytes were cultured in 24-well plates in the presence or the absence of UR-1505 at different concentrations for 1 hour before stimulation with LPS (10 ng/mL) for macrophages or Con A ($5 \mu\text{g/mL}$) for splenocytes. Supernatants were collected after 24 (macrophages) or 48 (T lymphocytes) hours and frozen until ELISA analysis. Cytokine production was measured with commercial murine ELISA kits (Cytosets, Biosource International, Nivelles, Belgium) following the manufacturer's protocol. Total RNA from splenocytes was isolated using TRIzol Reagent (Gibco-BRL, Carlsbad, CA) following the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized using a First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham, Biosciences, Barcelona, Spain). The primer sequences were: forward 5'-TGATGAGAATGACCTGTCT-3', reverse 5' CTTCTCAAAGATGAAGGAAA-3' for IL-1 β ; forward 5' GTGACAACCACGGCCTCCCTACT-3', reverse 5'-GGTAGCTATGGTACTCCA-3' for IL-6; and forward 5'-AATCG- TGCGTGACATCAAAG-3', reverse 5' ATGCCACAGGA- TTCCATACC-3' for β -actin. Polymerase chain reaction was performed as described previously,¹⁶ but in this case there were 38 cycles for IL-1 β , 30 cycles for IL-6, and 23 cycles for β -actin.

Induction of Colitis and Treatment Protocols

After a 7-day acclimation period, rats were weighed and randomly distributed in the different experimental groups ($n = 10$). Two experimental protocols were followed (Fig. 1).¹² In the first protocol, acute initial colitis was induced by replacing normal drinking water with distilled water containing 5% DSS [(w/v) prepared daily, molecular weight 36,000–50,000] for 5 days. Four experimental groups were used: a noncolitic group that received no drug treatment and distilled water without DSS; a colitic control group that received 5% DSS alone; and 2 treated groups, which received 5% DSS and UR-1505 at a dose of 10 or 30 mg/kg per day. UR-1505 was

TABLE 1. Scoring of Disease Activity Index (DAI)

Score	Weight loss	Stool consistency	Rectal bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1%–5%		
2	5%–10%	Loose stools	
3	10%–20%		
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding

DAI value is the combined scores for weight loss, stool consistency, and bleeding divided by 3.

dissolved in a vehicle consisting of Tween 80 [1% (vol/vol)] in distilled water and administered orally by an esophageal catheter (volume: 1 mL), beginning concurrently with DSS administration. All controls received equivalent volumes of vehicle for the duration of the study. All animals were sacrificed 5 days after the beginning of the experiments. In the second protocol, established colitis was induced by incorporating DSS into the drinking water at a concentration of 5% (w/v) for the first 5 days and at 2% (w/v) for the next 10 days. Similarly, 4 experimental groups of rats were included: a noncolitic group, a control colitic group, and 2 UR-1505-treated groups; in this dosing protocol drug treatment (at doses of 10 or 30 mg/kg per day) started when the concentration of DSS was reduced. All animals were sacrificed 15 days after the beginning of the experiments.

Assessment of Colonic Damage

Animal body weight, the presence of gross blood in the feces, and stool consistency were recorded daily for each rat by an observer unaware of the treatment. These parameters were each assigned a score according to the criteria described in Table 1, which was used to calculate an average daily disease activity index (DAI) for each animal.¹² Consumption of food and water was also recorded daily. Once rats were killed by cervical dislocation, their colons were immediately removed and rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline. The excised colonic segments were 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 colon was longitudinally opened, and a cross section from the distal diseased area was immediately fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin for histological analysis. Afterward, it was sectioned into different longitudinal fragments to be used for biochemical determination and Western blotting.

Biochemical Determinations in Colonic Tissue

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured according to the technique described by Krawisz et al (1984).¹⁷ The results were expressed as units of MPO per gram of wet

TABLE 2. Scoring Criteria for Full-Thickness Distal Colon Sections

Mucosal epithelium
Ulceration: none (0); mild surface (1); moderate (2); extensive full thickness (3)
Crypts
Mitotic Activity: lower third (0); mild mid third (1); moderate mid third (2); upper third (3)
Mucus depletion: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Lamina propria
Mononuclear infiltrate: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Granulocyte infiltrate: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Vascularity: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Fibrin deposition: none (0); mucosal (1); submucosal (2); transmural (3)
Submucosal
Mononuclear infiltrate: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Granulocyte infiltrate: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)
Edema: none (0); mild (1); moderate (2); severe (3)

Scoring scale: 0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe. Maximum score: 30.

tissue. One unit of MPO activity was defined as that degrading 1 μmol hydrogen peroxide per minute at 25°C. Total glutathione (GSH) content was quantified with the recycling assay described by Anderson (1985)¹⁸ and the results expressed as nanomoles per gram of wet tissue. The production of cytokines (TNF α , IL-1 β) was quantified by ELISA (Amersham, Madrid, Spain) in the colonic homogenates as previously described.¹²

Histological Analysis

Full-thickness 5- μm sections were stained with hematoxylin and eosin and graded by 2 pathologists (A.N. and A.C.) blinded to the experimental groups according to the criteria previously reported (Table 2).¹²

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Colonic iNOS and COX-2 expression was determined by Western blotting as described previously.¹⁹ Equal amounts of protein from tissue samples (150 μg) were separated on 7.5% SDS-PAGE. Each primary antibody—iNOS (Transduction Laboratories, Becton Dickinson Biosciences, Madrid, Spain) and COX-2 (Cayman Chemical Company, Montigny le Bretonneux, France)—was diluted 1:3000 and incubated overnight at 4°C, followed by incubation for 1 hour of peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG as the secondary antibody (1:3000). Protein loading and transfer were controlled by

detection of β -actin level. Then, ECL (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, Mass.) detection was performed.

Statistics

In vivo results are expressed as means \pm SEMs, whereas in vitro results are expressed as means \pm SDs. Differences between means were tested for statistical significance using 1-way analysis of variance and post hoc least-significant-difference tests. All statistical analyses were carried out with the Statgraphics 5.0 software package (STSC, Md.), with statistical significance set at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of UR-1505 on Concanavalin A-Activated Lymphocytes

First, we tested the effect of UR-1505 on the activity of lymphocytes, a cell type mainly involved in the sustained response in intestinal inflammation. When different concentrations of UR-1505 (100 and 300 μM) were added to the lymphocyte culture, the proliferation induced by Con A was dose-dependently inhibited, achieving approximately 90% inhibition at the highest concentration assayed without affecting cell viability (data not shown), similar to that reported previously.⁹ Additionally, stimulation of murine splenocytes with Con A induces secretion of IL-1 β and IL-6 (Fig. 2), 2 of the main proinflammatory cytokines involved in the pathogenesis of IBD.^{20,21} UR-1505 pretreatment was able to dose-dependently inhibit the production of these cytokines in Con A-activated lymphocytes (Fig. 2). This effect was associated with reduced expression of these cytokines in lymphocytes, as evidenced by RT-PCR analysis (Fig. 2).

Effects of UR-1505 on Bone Marrow-Derived Macrophages

As reported previously,⁹ the pretreatment of BMDMs with different concentrations of UR-1505 (100 and 300 μM) did not significantly modify the proliferative response induced by M-CSF in BMDMs (data not shown). We also confirmed the absence of any significant effect of UR-1505 (up to 300 μM) on LPS-induced BMDM activation, which is characterized by increased production of TNF α and IL-1 β after 24 hours (data not shown). Moreover, as has been described,²² LPS induced the expression of iNOS in these cells, but UR-1505 (100 and 300 μM) pretreatment did not modify it (data not shown).

Effects of UR-1505 on Acute DSS-Induced Rat Colitis

The administration of DSS at a concentration of 5% (w/v) for 5 days induced a colonic inflammatory status, with features similar to those described previously.¹² The animals developed diarrhea and had weight loss associated with anorexia, which were evident from the first day after DSS

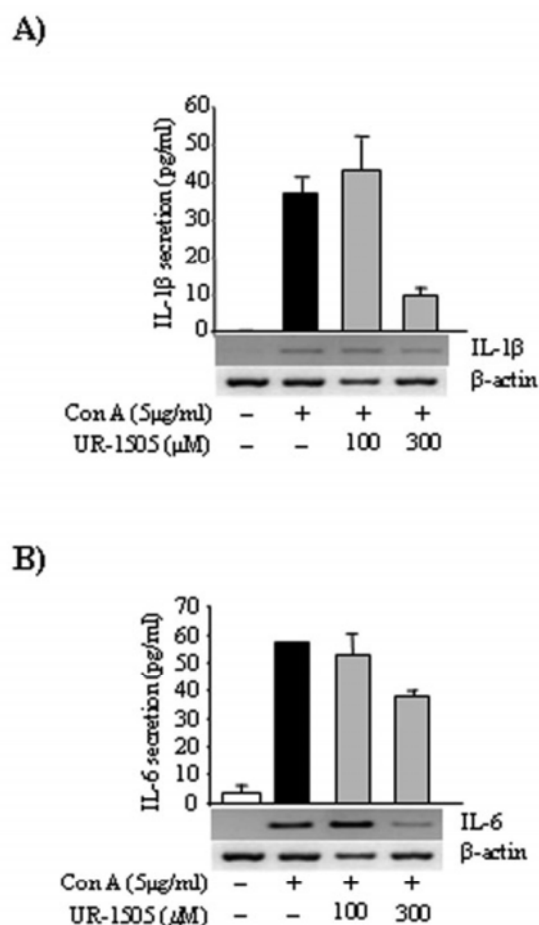


FIGURE 2. Effect of UR-1505 on T-lymphocyte cytokine production. UR-1505 inhibited IL-1 (A) and IL-6 (B) secretion and expression in Con A-activated T lymphocytes. Splenocytes were incubated with the indicated concentrations of UR-1505 with Con A for 48 hours. The concentrations (means \pm SDs) of cytokines in the culture supernatants were analyzed by ELISA, and their expression in cells was assessed by RT-PCR. The results of a representative experiment of 4 independent trials are shown.

administration and progressively increased during the course of the experiment. However, no significant modification in these parameters was observed in those colitic rats treated with UR-1505 (10 and 30 mg/kg) when starting the same day as DSS administration (data not shown). Moreover, UR-1505 did not reduce the increased weight/length ratio as a consequence of inflammation in comparison with that in nontreated colitic animals, nor did it improve colonic histology, amelio-

rate glutathione depletion, or inhibit the enhanced colonic MPO activity (a marker of neutrophil infiltration) that occurred after DSS administration for 5 days. Thus, macroscopic, microscopic, and biochemical examination of the colonic specimens after 5 days of DSS administration revealed no beneficial effects of this drug treatment in the acute phase of DSS colitis (Table 3).

Effects of UR-1505 on Established DSS-Induced Rat Colitis

To examine whether the lack of intestinal anti-inflammatory activity showed by UR-1505 was restricted to the initial acute phase in DSS-induced rat colitis, we tested the effects of UR-1505 in a different DSS administration protocol in an attempt to maintain the intestinal inflammation with time and to evaluate the effects of the drug on the ongoing colitis (Fig. 3).

Once the rats from the DSS control group were sacrificed, macroscopic examination of the colonic samples revealed an inflammatory process with similar characteristics to those previously obtained after 5 days of 5% DSS treatment. Thus, bowel wall thickening was evident with a significant increase in the weight/length ratio in comparison with that in noncolitic rats (Table 4). Microscopically, the samples from nontreated colitic rats showed typical inflammatory changes in colonic architecture: ulceration, crypt dilation, and goblet cell depletion as well as mixed cell infiltration, mainly composed of mononuclear cells (macrophages, lymphocytes, and plasmatic cells), although granulocytes were also present (Fig. 4 and Table 5). According to the criteria shown in Table 2, the mean tissue damage score assigned to these rats was 13.6 ± 1.5 . As expected, depletion of glutathione content and increased MPO activity were also observed in DSS colitic rats in comparison with those in noncolitic rats (Table 4); however, both markers of inflammation were modified to a lesser degree than in the initial acute colitis, thus reflecting the chronicity of the intestinal condition. Moreover, all the other parameters studied were also significantly modified as a consequence of the inflammatory process, revealing higher colonic levels of TNF α and IL-1 β (Table 4). In addition, increased expression of colonic iNOS and COX-2 was also observed in comparison with that in noncolitic rats (Fig. 5).

The results obtained after daily administration of UR-1505 in this experimental protocol of chronic colitis revealed that this compound effectively exerted an intestinal anti-inflammatory effect. This was already observed in comparison with the nontreated colitic group during the course of the experiment as a reduction in DAI values with both doses of UR-1505 assayed, although no statistically significant differences were obtained (Fig. 3). Once rats were sacrificed, macroscopic examination of the colonic segments showed no statistical differences in weight/length ratio between all colitic groups (Table 4); however, the histological analysis

TABLE 3. Effects of UR-1505 Treatment (10 and 30 mg/kg) on Colonic Weight/Length, Histological Damage Score, Glutathione (GSH) Content, and Myeloperoxidase (MPO) Activity in the Acute Phase of DSS Experimental Colitis in Rats (Day 5)

Group (n = 10)	Weight/length (mg/cm)	Tissue damage score (0–30)	GSH content (nmol/g)	MPO activity (units/g)
Noncolitic	65.6 ± 3.2	0.0 ± 0.0	1562.4 ± 48.2	15.1 ± 3.2
DSS control	101.8 ± 5.3	17.4 ± 1.8	1119.7 ± 66.4	314.8 ± 43.0
UR-1505 (10 mg/kg)	92.6 ± 4.9	15.9 ± 2.8	1125.6 ± 64.1	225.8 ± 37.3
UR-1505 (30 mg/kg)	94.1 ± 4.7	16.2 ± 1.6	1076.2 ± 72.5	292.0 ± 57.6

All data are expressed as means ± SEMs. All colitic groups differed significantly from the noncolitic group ($P < 0.01$, not shown).

revealed that UR-1505 treatment improved colonic architecture in comparison with nontreated colitic rats (Fig. 4 and Table 5), and they were assigned a total tissue damage score of 7.3 ± 1.4 at a dose of 10 mg/kg and a score of 4.7 ± 0.9 at a dose of 30 mg/kg ($P < 0.01$ versus nontreated colitic group at both doses). Thus, most treated rats showed almost complete restoration of the damaged colon, displaying a moderate inflammatory infiltrate with a focal distribution that was associated with a clear reduction in the mononuclear cell infiltrate in both mucosa and submucosa. There was also restoration of the crypt architecture with goblet cell replenishment mucin. Biochemically, UR-1505 treatment facilitated increased colonic glutathione content (Table 4), thus improving the colonic oxidative status altered by the DSS-induced inflammatory process.¹² However, this drug treatment did not inhibit MPO activity compared with that in the DSS control group (Table 4), suggesting that administration of UR-1505 did not affect granulocyte infiltration in the inflamed tissue. In addition, UR-1505 treatment resulted in clear improvement in the proinflammatory mediators assayed and a significant reduction in colonic levels of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ in colitic rats (Table 4). Finally, treatment of colitic rats with this drug

resulted in significant inhibition of the expression of inducible enzymes, both iNOS and COX-2, in colonic specimens compared with that in the nontreated control rats (Fig. 5).

DISCUSSION

At present, the etiology of the most common forms of IBD, UC and CD, is not fully known. For this reason, a specific causal treatment of IBD is not available yet, and therefore, therapeutic and preventive strategies for these disorders must rely on interrupting or inhibiting the immunopathogenic mechanisms involved in these intestinal conditions. Nowadays, several immunosuppressive agents, including azathioprine and its primary metabolite 6-mercaptopurine, cyclosporin A or tacrolimus, are drugs available for the clinical management of human IBD, in which the inhibition of T-cell activation seems to be of crucial relevance in their mechanism of action.⁵ Moreover, it has been reported that the chimeric anti-TNFA antibody (infliximab), which has been shown to be highly effective in patients with Crohn's disease, exerts its action in this disease by inducing apoptosis in the T-cell compartment, an effect mostly produced by inhibition of secondary immunity rather than of innate responses through direct inhibition of soluble $\text{TNF}\alpha$ bioactivity.²³ However, none of these drugs have proven to achieve significant remission maintenance of these diseases without the existence of important adverse events.⁵ For this reason, the discovery and development of new drugs that interfere with T-cell activation and the subsequent activation of adaptive immunity are of great interest.

From the results of this study, we propose that the salicylate derivative UR-1505 may constitute a new pharmacological therapy in IBD because it is able to ameliorate perpetuation of the inflammatory status in the chronic stages of colitis, most probably because of its ability to down-regulate T-lymphocyte activation.^{8,9} Many of the significant advances in the understanding of the etiology of IBD have been derived from the use of experimental models in laboratory animals, thus allowing experiments that are not feasible in humans as well as the study of inflammation over time. Most of the experimental models promote differential activation of T helper 1-type cells, and among them, the DSS-

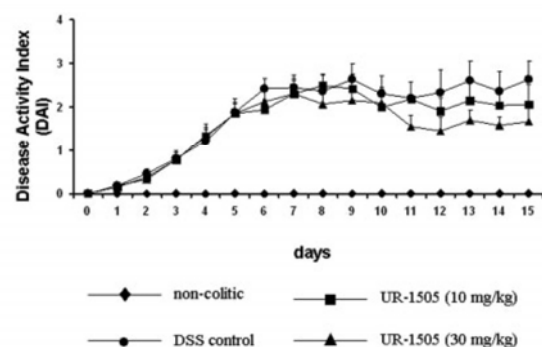


FIGURE 3. Effects of UR-1505 treatment (10 and 30 mg/kg) on the time course and the Disease Activity Index (DAI) over the 15-day experimental period in the DSS model of rat colitis, based on the criteria shown in Table 1.

TABLE 4. Effects of UR-1505 Treatment (10 and 30 mg/kg) on Colonic Weight/Length and Glutathione (GSH) Content, Myeloperoxidase (MPO) Activity, TNF α and IL-1 β Levels in Established DSS Experimental Colitis in Rats (Day 15)

Group (n = 10)	Weight/ length (mg/cm)	GSH content (nmol/g)	MPO (U/g)	TNF α (ng/g tissue)	IL-1 β (ng/g tissue)
Noncolitic	67.0 \pm 1.2	1687.4 \pm 89.1	22.6 \pm 8.8	0.99 \pm 0.06	0.57 \pm 0.10
DSS control	95.3 \pm 8.4 [§]	1360.7 \pm 62.5 [‡]	138.9 \pm 44.7 [§]	3.55 \pm 0.49 [§]	4.63 \pm 1.54 [§]
UR-1505 (10 mg/kg)	97.3 \pm 8.1 [§]	1539.1 \pm 58.1 [*]	135.7 \pm 30.4 [§]	1.59 \pm 0.22 [*]	0.94 \pm 0.18 [*]
UR-1505 (30 mg/kg)	86.9 \pm 4.4 [§]	1687.4 \pm 70.7 [†]	136.9 \pm 28.5 [§]	2.10 \pm 0.17 ^{*‡}	0.61 \pm 0.11 [†]

All data are expressed as means \pm SEMs (^{*} $P < 0.05$; [†] $P < 0.01$ versus DSS control group; [‡] $P < 0.05$; [§] $P < 0.01$ versus noncolitic group).

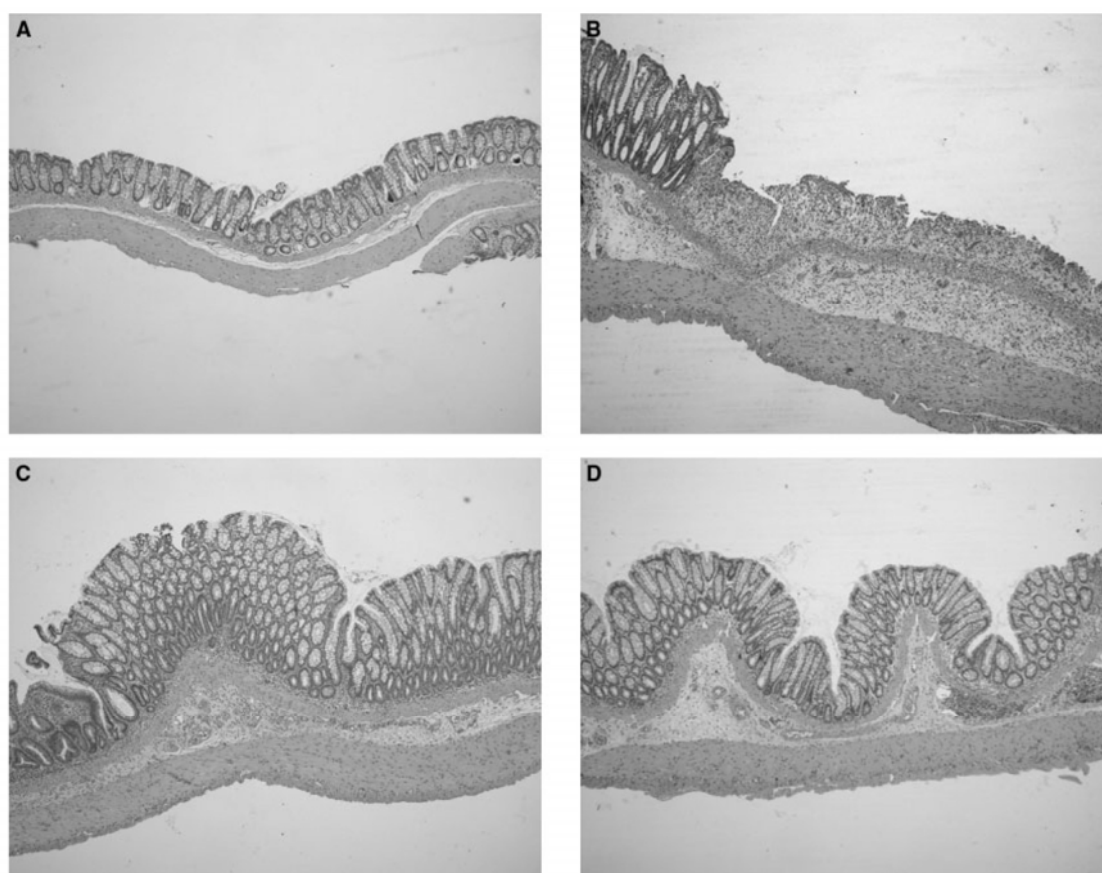


FIGURE 4. Histological sections of colonic mucosa from DSS colitic rats stained with hematoxylin and eosin showing the effects of UR-1505 treatment when administered after initial colonic damage with the offending agent. A: Noncolitic group showing normal histology of rat colon (original magnification, 50 \times). B: DSS control group showing extensive intestinal ulceration with severe inflammatory cell infiltrate in the lamina propria and submucosa (original magnification, 50 \times). C, D: UR-1505-treated groups (10 and 30 mg/kg) showing recovery in the inflammatory process without ulceration of the intestinal mucosa and with mucin-replenished goblet cells (original magnification, 50 \times).

TABLE 5. Effects of UR-1505 Treatment (10 and 30 mg/kg) on Colonic Histological Damage Score in Established DSS Experimental Colitis in Rats (Day 15)

Group (n = 10)	Mucosal epithelium (0–3)	Crypts (0–6)	Lamina propria (0–9)	Fibrin deposition (0–3)	Submucosal (0–9)
Noncolitic	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
DSS control	1.9 ± 0.2 [§]	3.0 ± 0.4 [§]	3.5 ± 0.4 [§]	2.0 ± 0.4 [§]	3.3 ± 0.6 [§]
UR-1505 (10 mg/kg)	0.9 ± 0.4 ^{*‡}	1.6 ± 0.5 [*]	2.2 ± 0.3 ^{*§}	0.9 ± 0.4 ^{*‡}	1.8 ± 0.4 ^{*§}
UR-1505 (30 mg/kg)	0.4 ± 0.2 [*]	1.4 ± 0.4 [*]	1.9 ± 0.4 ^{†§}	0.0 ± 0.0 [†]	1.0 ± 0.4 ^{‡†}

All data are expressed as means ± SEMs (^{*}*P* < 0.05; [†]*P* < 0.01 versus DSS control group; [‡]*P* < 0.05; [§]*P* < 0.01 versus noncolitic group).

induced colitis model is one of the most widely used.²⁴ However, and as it has been demonstrated in the present study, the adequate experimental design used in the colitis induction with DSS seems to be crucial in the future development of a given compound.

The therapeutic use of UR-1505 was evaluated in 2 phases in the experimental model of DSS colitis, namely, acute initial colitis and established colitis, using a different dosing protocol in each phase. The preventive dosing protocol was performed by administering the drug during the initial phase of acute colitis concurrently with incorporation of DSS (5%) into the drinking water and continued for 5 days. In the curative dosing protocol, the administration of the drug was started after 5 days of 5% DSS administration, when the colonic damage had already been established, and the supply of DSS to all colitic animals was maintained, but at a lower concentration (2%), for 10 days. In general, DSS intake promoted a sustained chronic inflammatory process, showing features similar to those described previously.^{10,12} The colonic inflammation was characterized by bowel wall thickening, evidenced by a significant increase in the colonic

weight/length ratio. In addition, the inflammation was also associated with colonic glutathione depletion and enhanced colonic MPO activity in the 2 colitic protocols when compared with that in noncolitic rats, being more severe in the acute initial colitis than in the established colitis. Increased levels of colonic proinflammatory cytokines, TNF α and IL-1 β , were also detected in the chronic colitis. All these results confirm that in both stages of this experimental model of rat colitis, there is an active inflammatory response derived from exacerbated activity from the immune cells infiltrating the inflamed intestinal tissue.

When UR-1505 (10 and 30 mg/kg) was administered in the acute phase of DSS-induced rat colitis, no significant anti-inflammatory effect was observed in either the macroscopic (colonic weigh/length ratio) or the biochemical markers of inflammation evaluated (MPO activity and GSH content). On the contrary, the administration of both doses of UR-1505 starting once the inflammation had been induced (established colitis) did result in a clear anti-inflammatory effect, as evidenced histologically by improvement in the damaged colonic architecture and biochemically by restoration of GSH content and down-regulation of the levels of the proinflammatory cytokines assayed, that is, TNF α and IL-1 β ; however, the treatment was devoid of any significant effect on colonic MPO activity.

The differences in efficacy observed in both stages of intestinal inflammation may be attributable to the selectivity of the drug against the immune cell types involved in the inflammatory response induced by DSS. Previous studies have reported that the acute phase of DSS-induced colitis is mainly mediated by infiltration of granulocytes and macrophages in the mucosa and submucosa,¹³ whereas in the chronic phase, lymphocytes are more prominent, supporting the key role that T cells play during the regenerative phase of DSS colitis.¹⁴ The *in vitro* assays performed in the present study showed the absence of any inhibitory effect of UR-1505 on macrophage proliferation and activity, confirming previous studies,⁹ and in accordance with the lack of any beneficial effect in the acute phase of DSS colitis. Most probably, UR-1505 does not affect neutrophil activity, as evidenced by the absence of any significant effect on the

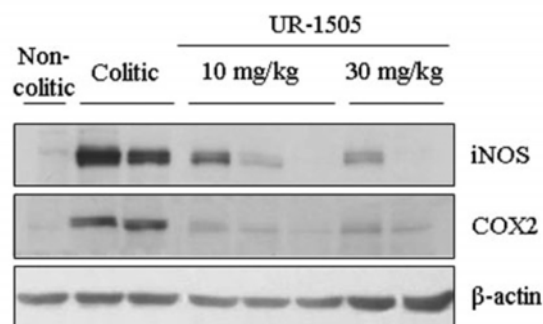


FIGURE 5. Effect of UR-1505 treatment (10 and 30 mg/kg) on colonic iNOS and COX-2 expression in DSS experimental colitis in rats. Expression of iNOS and COX-2 was analyzed by Western blotting using colonic homogenates as described in the Material and Methods section. One hundred and fifty micrograms of protein was loaded in each lane. β -Actin expression was used as the control for loading and transfer.

biochemical marker of neutrophil infiltration, colonic MPO activity,¹⁷ in both the acute and chronic stages of DSS colitis. On the contrary, UR-1505 specifically affects in vitro T-cell activity and proliferation, and this effect seems to be crucial to the beneficial effect shown by this drug in the chronic phase of DSS rat colitis. In consequence, inhibition of T-lymphocyte activation can counteract perpetuation of the inflammatory process obtained in the present study by maintaining the DSS intake in rats, although at a lower concentration of DSS (2%). The in vitro results also show that UR-1505 can inhibit the increased production of IL-1 β and IL-6 after Con A-induced T-cell stimulation and that this can also account for its anti-inflammatory effect in the chronic phase of DSS experimental colitis because it has been proposed that these cytokines play a key role in IBD pathology in this experimental model.²⁵

Furthermore, the beneficial effect exerted by UR-1505 may not be restricted to an inhibitory effect on T-cell activity, or it could subsequently affect other intestinal cells involved in the chronic inflammatory response induced by DSS. In this regard, although UR-1505 was not able to directly inhibit increased iNOS expression or TNF α production in LPS-activated macrophages when evaluated in vitro (unpublished data), oral administration to colitic rats resulted in significant inhibition in both colonic iNOS expression and TNF α production. Because macrophages are considered the main source of several proinflammatory mediators, including NO and TNF α , in IBD,²⁶ it is possible that the inhibition of T-cell activity induced by UR-1505 can indirectly affect macrophage cell activity, thus contributing to the intestinal anti-inflammatory effect of UR-1505. In fact, previous studies have shown that macrophages require both IFN- γ -mediated and TLR4-mediated signals for the increased production of NO.²⁷

Finally, it is important to note that although UR-1505 is devoid of any preventive effect in this model of rat colitis, its administration once the colitis has been induced allows us to better establish the real significance of its therapeutic use. In fact, this protocol resembles better what is really found in the human clinic, and this compound can be considered a good candidate for inducing remission after exacerbation and maintaining it. However, more studies are required to demonstrate the efficacy of UR-1505 in human IBD. Moreover, the different results obtained by this compound in these 2 DSS protocols (acute initial colitis and established colitis) confirm that good optimization in the experimental model is required to obtain significant conclusions about the evaluation of drugs intended to be developed in the treatment of human IBD.

ACKNOWLEDGMENTS

E.B. is recipient of a fellowship from the Ministry of Education and Science, Spain. M.C. is a recipient of the

“Ramón y Cajal” Program of the Spanish Ministry of Science and Technology. The authors thank to Dr. M. E. Rodríguez-Cabezas for her technical assistance.

REFERENCES

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115:182-205.
2. Neurath MF, Finotto S, Fuss I, et al. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol*. 2001;22:21-26.
3. Holtmann MH, Galle PR, Neurath MF. Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:455-466.
4. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117:761-769.
5. Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology*. 2004;126:1582-1592.
6. Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin. *Immunology*. 2000;101:53-60.
7. Paccani SR, Boncristiano M, Olivieri C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem*. 2002;277:1509-1513.
8. Roman J, Fernandez de Arriba A, Barron S, et al. UR-1505, a new salicylate, blocks T cell activation through nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol*. 2007;72:269-279.
9. Bailon E, Camuesco D, Nieto A, et al. The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:1496-1506.
10. Kullmann F, Messmann H, Alt M, et al. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis*. 2001;16:238-246.
11. Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, et al. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 1999;117:1078-1088.
12. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol*. 2004;143:908-918.
13. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994;107:1643-1652.
14. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998;114:385-391.
15. Comalada M, Xaus J, Sanchez E, et al. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur J Immunol*. 2004;34:2257-2267.
16. Comalada M, Ballester I, Bailon E, et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1010-1021.
17. 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;87:1344-1350.
18. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 1985;113:548-555.
19. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35:584-592.

20. Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;859:149–159.
21. Panja A, Goldberg S, Eckmann L, et al. The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 1998;161:3675–3684.
22. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 2000;95:3823–3831.
23. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2003;124:1774–1785.
24. Powrie F, Uhlir H. Animal models of intestinal inflammation: clues to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Novartis Found Symp.* 2004;263:164–174.
25. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, et al. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337:647–654.
26. Neurath MF, Meyer zum Buschenfelde KH. Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. *J Investig Med.* 1996;44:516–521.
27. Shi D, Das J, Das G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res.* 2006;16:70–74.



Capítulo 8

The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a DSS model of colitis which resembles to ulcerative colitis

J Pharmacol Sci. 2009. In press

El nuevo salicilato UR-1505 modula la respuesta Th2 y humoral en el modelo de colitis experimental inducido por DSS, que se asemeja a la colitis ulcerosa

Objetivos:

El objetivo de este estudio consistió en evaluar el efecto inmunomodulador del UR-1505 sobre la respuesta Th2 y humoral en el modelo de colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) en rata. Este modelo ha mostrado una buena correlación con el patrón de respuesta atípica Th1/Th2 que tiene lugar en la colitis ulcerosa (CU) y puede considerarse un excelente modelo para estudiar esta enfermedad. Además, se han comparado los resultados *in vivo* con estudios *in vitro* sobre linfocitos T y B procedentes de bazo de ratón.

Resultados:

El modelo de colitis experimental consistió en la incorporación del DSS al agua de bebida a una concentración del 5% durante 5 días, que luego se redujo al 2% durante 10 días, dando lugar a una fase de inflamación crónica en el colon, a la cual denominamos fase establecida. Tanto en los estudios *in vivo* como *in vitro* se analizaron citocinas del tipo Th2 (IL-4 e IL-5), citocinas del tipo Tr1 (Tr, linfocito T regulador) (IL-10) y finalmente, inmunoglobulinas (Ig) (IgG e IgA) que median la respuesta humoral.

El proceso inflamatorio inducido por DSS provocó una disminución de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y de la IgA, y un incremento de la IgG, sin modificación de la secreción de IL-4, de forma similar a lo que sucede en la CU. La administración del UR-1505 (10 y 30 mg/kg) en este modelo establecido de colitis inducida por DSS, dio lugar a un incremento de la producción de IL-10 e IgA y al mismo tiempo, provocó una disminución de los niveles de IgG, mejorando así la inflamación intestinal.

Las células utilizadas para los estudios *in vitro* fueron linfocitos T y B procedentes de bazo de ratón estimulados con concanavalina A (ConA) o con lipopolisacárido (LPS), respectivamente. La activación de linfocitos T mediante ConA (5 µg/ml) provocó un incremento de la producción de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, mediante la unión de la ConA al receptor específico de las células T (TCR, *T cells receptor*). La administración del UR-1505 (300 µM) inhibió la producción de IL-10 e IL-5, pero no modificó la secreción de IL-4. Los linfocitos B se estimularon con altas concentraciones de LPS (50 µg/ml), que provocaron su activación mediante la unión al receptor de tipo Toll 4 (TLR, *Toll like receptor*) presente en estas células. La activación de los linfocitos B por el LPS indujo un aumento de la proliferación celular y de la producción de Igs, entre ellas la IgG y la IgA. Los resultados mostraron que el UR-1505 inhibió de forma dosis dependiente (30-300 µM)

la proliferación y disminuyó la producción de IgG e IgA en linfocitos B. Todo esto nos sugirió que el UR-1505 podría estar inhibiendo la activación de la inmunidad humoral en el colon.

Conclusión:

Los resultados *in vitro* muestran que el UR-1505 ejerce un efecto inhibitor sobre los linfocitos T y B procedentes de bazo de ratón, ya que inhibe la producción de IL-5 e IL-10, y la proliferación y la producción de IgG e IgA, respectivamente. Sin embargo, a nivel *in vivo* el UR-1505 es capaz de restablecer los niveles de IL-10 e IgA en el colon, proteínas implicadas en la tolerancia oral de las mucosas. Las diferencias observadas *in vitro* e *in vivo* sugieren que el UR-1505 posee propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Estos resultados nos sugieren que el compuesto podría considerarse un buen candidato para el tratamiento de la CU, ya que el modelo de colitis experimental por administración de DSS presenta unas características similares a las que ocurren en dicha enfermedad en humanos.

The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a DSS model of colitis which resembles to ulcerative colitis.

Elvira Bailón¹, Juan Román², Isabel Ramis², Pedro Michelena², Dolors Balsa², Manuel Merlos², Antonio Zarzuelo¹, Julio Gálvez^{1,*} and Mònica Comalada^{1,*}.

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Department of Pharmacology, University of Granada, Granada, Spain.

²Pharmacology & Toxicology, Palau Pharma S.A, Barcelona, Spain.

Running head: UR-1505 in Th2/humoral response

Corresponding author: Mònica Comalada, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Universitario 'La Cartuja' s/n, 18071 Granada, Spain. Tel: +34958243889. Fax: +34958248964. E-mail: comalada@ugr.es

*Both authors contributed equally to the supervision of the study.

Number of words in the main body: 1495

Abbreviations: AP-1, activator protein 1; CD, Crohn's disease; Con A, concanavalin A; DSS, dextran sodium sulphate; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IBD, inflammatory bowel disease; IFN γ , interferon gamma; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; JAK, Janus

tyrosine kinase; LPS, lipopolysaccharide; NF-AT, nuclear factor of activated T-cells; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; STAT, signal transducer and activator of transcription; Th, T helper; TNBS, trinitrobenzenesulphonic acid; TNF α , tumor necrosis factor alpha; UC, ulcerative colitis.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the immunomodulatory effects of UR-1505, a new salicylate derivative, on the Th2/humoral response produced during dextran sodium sulfate (DSS)-induced rat colitis. In *in vitro* studies, UR-1505 (300 μ M) inhibited both the production of IL-10 and IL-5 in concanavalin A (Con A)-activated splenocytes and the production of IgG and IgA by B-lymphocytes. However, in contrast to *in vitro* results, the administration of UR-1505 (10 and 30 mg/kg per day) to rats with established DSS-colitis enhanced both IL-10 and IgA production whereas inhibited IgG production, ameliorating thus the intestinal inflammation.

Key words: inflammatory bowel disease; B lymphocytes; Th2 cytokines.

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two major forms of chronic inflammatory bowel disease (IBD). Although the aetiology of these conditions is not completely known, it has been suggested that aberrant innate and adaptive immune responses against intestine microbiota might play a key role (1). In previous studies, we have shown that UR-1505 [2-hydroxy-4-(2,2,3,3,3-pentafluoropropoxy)-benzoic acid], a new molecule chemically related to salicylic acid, blocked T-cell activation, thus inhibiting the production of Th1-cytokines involved in immune response. This anti-inflammatory effect was mediated through the inhibition of NF-AT DNA binding in activated-T cells without showing significant effects on other transcription factors such as NF- κ B and AP-1 (2). These results suggested that UR-1505 could be a useful strategy for the treatment of IBD.

It has been reported different experimental models of colitis in rodents in relation with the type of T helper (Th) response evoked. Thus, some of them, like the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) model of colitis, promote a Th1 response, which resembles human CD. On the other side, DSS-induced colitis in rats is a good pharmacological tool to study human UC because it shows a correlation at histological and immunological level with atypical Th1/Th2 inflammation, in which an increase of Th2-cytokines are associated with the production of some Th1-cytokines (3).

UR-1505 has demonstrated the *in vivo* anti-inflammatory effect in both TNBS- and DSS-established colitis, as evidenced histologically by an improvement in the damaged colonic tissue and immunologically by the down-regulation of TNF α and IL-1 β (4, 5). The

intestinal anti-inflammatory effects of UR-1505 have been supported by the *in vitro* results, in which we have demonstrated the specificity of UR-1505 towards T-cell activity, without affecting macrophage activation (2, 4, 5). However, in those previous studies, we only focused in the Th1-cytokines, without analysing the Th2-cytokines, despite the fact that they seem to be pivotal in UC pathology.

In counterpart of T-cell activation, immunoglobulins and autoantibodies produced by B cells have also been involved in the pathogenesis of UC (6). It is well known that Th2 cells can secrete cytokines that have a powerful effect on B cells. In this sense, both IL-4 and IL-5 act on B cells to induce activation and differentiation of the pre-B cells. They also act on T cells as growth factors and promote differentiation of Th2 cells, thus reinforcing the antibody response (7). Finally, IL-10 also facilitates the growth and differentiation of the B cells (7); however, although IL-10 has been considered for some authors to be a Th2-cytokine, it is currently more investigated due to its immune-modulator activity.

In the present study we further evaluated whether the anti-inflammatory effect of UR-1505 could also be associated with an inhibition of Th2-cytokines, such as IL-5, IL-4 and IL-10, according to the methodology described (4, 5). Stimulation of splenocytes with Con A (5 µg/ml) induced the production of these cytokines (Table 1). UR-1505 pre-treatment inhibited Con A-induced IL-5 secretion in a concentration-dependent manner, showing the maximal effect at 300 µM (70% of inhibition). Moreover, UR-1505 was also able to inhibit the IL-10 secretion, although in this case only a 40% inhibition was observed at the highest

dose tested (300 μ M) (Table 1). In the case of IL-4, UR-1505 at 300 μ M did not modify its secretion induced by Con A in splenocytes (Table 1). The ability of UR-1505 to inhibit some cytokines such as IFN γ (4) or IL-5, without showing any effect on TNF α (4) or IL-4 could be easily correlated with the fact that both IL-5 and IFN γ expression are modulated through NF-AT sites in their promoter regions (8), whereas TNF α expression is mainly under the regulation of NF- κ B pathway (9) and IL-4 transcription induced in activated T cells depends on the JAK-STAT pathway (10).

Table 1: Effects of UR-1505 on IL-4, IL-5 and IL-10 production in Con A-activated T lymphocytes and on IgG and IgA secretion in LPS-activated B lymphocytes.

		Non stimulated	Activated-cells	UR-1505 30 μ M	UR-1505 100 μ M	UR-1505 300 μ M
T cells	IL-4 (pg/ml)	8.2 \pm 0.6	49.6 \pm 2.9	48.2 \pm 6.8	46.5 \pm 1.3	44.9 \pm 2.2
	IL-5 (pg/ml)	1.1 \pm 1.2	174.4 \pm 13.4	121.3 \pm 9.3	94.3 \pm 3.1*	51.9 \pm 11.8**
	IL-10 (pg/ml)	0.0 \pm 0.0	2557.9 \pm 110.9	2407.1 \pm 98.8	2205.4 \pm 99.5	1437.6 \pm 102.1*
B cells	IgG (ng/ml)	35.6 \pm 16.7	208.9 \pm 16.3	205.5 \pm 3.1	145.1 \pm 18.4*	81.6 \pm 2.1**
	IgA (ng/ml)	45.3 \pm 1.9	58.5 \pm 0.2	53.7 \pm 3.2	49.4 \pm 3.5	43.1 \pm 2.7*

Splenocytes were incubated with different concentrations of UR-1505 and with Con A (5 μ g/ml) during 48 hours for activation of IL-4, IL-5 and IL-10 production in T lymphocytes or with LPS (50 μ g/ml) during 3 or 5 days for activation of IgG and IgA secretion, respectively, in B lymphocytes. The concentrations (expressed as means \pm SDs) of cytokines in the culture supernatants were analyzed by ELISA. The results of representative experiment of 3 independent trials are shown.

* p<0.05 vs activated-cells (Con A for T cells or LPS for B cells).

** p<0.01 vs activated-cells (Con A for T cells or LPS for B cells).

A well-characterized and critical function of B cells in the intestine is the production of IgA. The paradigm is that intestinal B cells differentiate to produce abundant amounts of IgA that can be transported across the epithelium to the lumen of the gastrointestinal tract and bind to potential pathogens inhibiting the deleterious effects they could exert (11). In UC, this adaptive humoral defence mechanism seems to be also impaired. The local production of dimmers and larger polymers of IgA (collectively called pIgA) is significantly down-regulated, although in IBD lesions the immunocyte population is

increased (11). These changes, together with the activation of mucosal macrophages and T cells and a dramatic increase of IgG-producing immunocytes and IgG antibodies, may reflect local establishment of a second line of defence which, however, is unsuccessful in its attempt to eliminate antigens derived from the indigenous microbiota.

We further evaluated the *in vitro* effects of UR-1505 on the IgG and IgA production in LPS-activated splenocytes. LPS (50 µg/ml) induced IgG and IgA production at 3 and 5 days, respectively (Table 1). The IgG and IgA secretion induced by LPS was inhibited dose-dependently by UR-1505, especially in the case of IgG, achieving a maximum inhibition at the concentration of 300 µM (Table 1). Therefore, we have shown that UR-1505 is also able to inhibit B-cell activation, probably by NF-AT inhibition since this transcription factor plays a key role in these cells (8).

In order to correlate the *in vitro* data with the *in vivo* Th2/humoral potential effects of UR-1505, we used the same colonic homogenates obtained from those previous studies (5). Established colitis was induced in rats by incorporation of DSS into drinking water at 5% (w/v) during 5 days and afterwards at 2% (w/v) for 10 days, when treatment with UR-1505 (10 and 30 mg/kg per day) started. UR-1505 was dissolved in a vehicle consisting of Tween 80 in distilled water (1%) and administered orally by an esophageal catheter. Once rats were killed, different longitudinal colonic segments were used for immunological determinations (4, 5). The results reveal that the inflammatory process induced by DSS showed a reduced IL-10 and IgA secretion in the colonic specimens, while an increase on

IgG levels was observed (Fig. 1). The administration of UR-1505 to colitic rats was able to restore these parameters. Thus, UR-1505 increased IL-10 and IgA production and also reduced the IgG levels to the basal state (Fig. 1B). However, DSS-induced inflammation was not associated with significant modification in colonic IL-4 levels, similarly to that previously described for UC (3). Moreover, and as expected based on the *in vitro* data, UR-1505 treatment did not modify the expression of IL-4 in colonic homogenates (Fig. 1A).

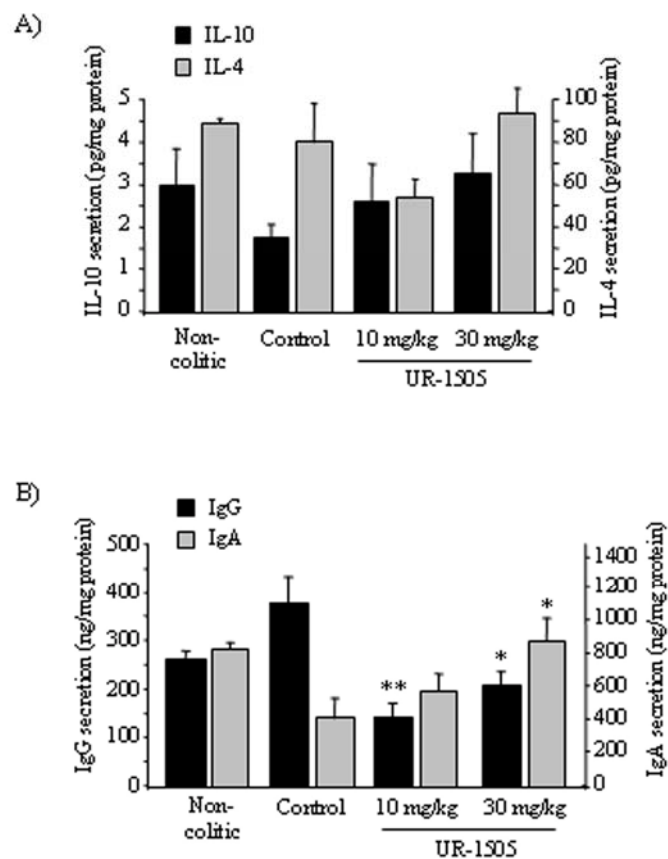


Figure 1: Effects of UR-1505 treatment (10 and 30 mg/kg per day) on colonic IL-10, IL-4 (A), IgG and IgA levels (B) in established DSS experimental colitis in rats. The concentrations of cytokines and immunoglobulins in colonic homogenates were analyzed

by ELISA following the manufacturer's protocol. All dates are expressed as means \pm SEMs (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus DSS control group).

To our knowledge, this is the first time that it has been reported that, in DSS-established colitis in rats, there is an increase of IgG production in the colon and a simultaneous IgA decrease as a consequence of the colitic process; similarly to that it has been previously reported in UC (11). Although a variety of antibodies against epithelial cells or bacteria have been found in the serum of patients with UC, it is still unclear whether these are epiphenomena or related to the disease process. A marked increase in the mucosal IgG-producing immunocytes and IgG antibodies against unknown colonic antigens or autoantigens has been described in patients with UC (12). In counterpart of IgG, the IgA production in the colon of UC patients is down-regulated significantly leading to increase the tissue injury (11). In fact, IgA has been reported to exert anti-inflammatory effect by inhibiting the production of LPS-induced cytokines such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ by human monocytic cells (13). Conversely, IgA immunodeficiency in humans is a heterogenous condition that can be associated with inflammatory disorders such as UC (11). Thus, our results suggest that the aberrant IgG and IgA production in colon homogenates could be a good pharmacological tool to evaluate the chronic inflammation in this model.

When the anti-inflammatory cytokine IL-10 is considered, an inhibition in its production has been also associated with IBD, as it occurs in the spontaneous colitis

induced in IL-10 *knock out* mice (3). Therefore, it has been suggested that the use of different strategies that increase IL-10 production may be useful in IBD patients, like the use of genetically modified *Lactococcus lactis* expressing IL-10 for mucosal delivery as maintenance treatment for chronic intestinal disease (14).

In conclusion, the results obtained in this work and the discrepancies observed between the *in vitro* and the *in vivo* studies suggest that UR-1505 could exert its action through the reduction of the inflammatory cells recruitment to the inflammatory foci and the disruption of the positive feedback process involved in the perpetuation of the inflammatory response. In this sense, it seems obvious that the immunomodulatory actions exerted by UR-1505 in the *in vivo* system differ from that obtained with other immunosuppressive compounds used in IBD therapy, such as cyclosporine A, where a general downregulation of Th1- and Th2-cytokines was observed (15). Furthermore, the administration of these drugs is limited by inconsistent efficacy or short- and long-term toxicity in cells outside the immune system (15). For this reason, the development of new drug treatments that are both effective and safe is an important goal in IBD therapy.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2005-03199), with funds from the European Union, and by Junta de Andalucía (CTS-164). Mònica Comalada is a recipient of Ramon y Cajal Program from Spanish Ministry of Science

and Technology; Elvira Bailón is a recipient from Spanish Ministry of Education and Science.

CIBER-EHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

References

1. Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ. T cell receptor- $\alpha\beta$ -deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol.* 1997;150:91-97.
2. Román J, de Arriba AF, Barrón S, Michelena P, Giral M, Merlos M, et al. UR-1505, a new salicylate, blocks T cell activation through nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol.* 2007;72:269-279.
3. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:495-549.
4. Bailón E, Camuesco D, Nieto A, Concha A, Fernández de Arriba A, Román J, et al. The intestinal anti-inflammatory effects of the novel agent UR-1505 in the TNBS model of rat colitis are mediated by T-lymphocyte inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:1496-1506.
5. Bailón E, Comalada M, Román J, Michelena P, Ramis I, Merlos M, et al. UR-1505, a salicylate able to selectively block T-cell activation, shows intestinal anti-inflammatory activity in the chronic phase of the DSS model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:888-897.

6. Targan SR. The search of pathogenic antigens in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1998;114:1099-1100.
7. Banchereau J, Brière F, Liu YJ, Rousset F. Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. *Stem Cells*. 1994;12:278-288.
8. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A.. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 2003;17:2205-2232.
9. Becker C, Barbulescu K, Wirtz S, Meyer zum Büschenfelde KH, Pettersson S, Neurath MF. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr*. 1999;8:115-127.
10. So EY, Oh J, Jang JY, Kim JH, Lee CE. Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells. *Mol Immunol*. 2007;44:3416-3426.
11. Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS. The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol*. 2006;579:149-167.
12. Hibi T, Ohara M, Toda KK, Hara A, Ogata H, Iwao Y, et al. In vitro anticolon antibody production by mucosal or peripheral blood lymphocytes from patients with ulcerative colitis. *Gut*. 1990;31:1371-1376.

13. Wolf HM, Fischer MB, Pühringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. *Blood*. 1994;83:1278-1288.
14. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:754-759.
15. Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology*. 2004;126:1582-1592.



Capítulo 9

UR-1505, ¿un nuevo salicilato para la enfermedad inflamatoria intestinal?

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son enfermedades inflamatorias intestinales (EII) crónicas humanas, en donde la etiología y patogénesis siguen siendo de origen desconocido. Sin embargo, parece ser que su fisiopatología se encuentra asociada a una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que acaba conduciendo a una incontrolada y prolongada activación del sistema inmunitario intestinal. En este sentido, existen varias teorías que intentan explicar el motivo por el cual en la EII se provoca una activación exacerbada de la respuesta inmunológica. Una de ellas se basa en que diversas alteraciones genéticas en individuos predispuestos llevan a un aumento de la inmunidad innata, incrementándose la actividad de los macrófagos y los neutrófilos presentes en la mucosa intestinal, con la consiguiente activación de la inmunidad adaptativa como segundo estadio de la enfermedad, y desencadenándose entonces el proceso inflamatorio intestinal. Otras teorías indican lo contrario, que el desarrollo de una inmunidad innata insuficiente frente a la gran translocación bacteriana, da lugar a la acumulación de antígenos bacterianos en los tejidos, a una reacción adaptativa incontrolada y a una respuesta crónica intestinal (Comalada y Peppelenbosch, 2008). De una forma o de otra, lo que sí está demostrado es la activación de la mayoría de las células del sistema inmunitario en pacientes con EII activa, con un papel muy importante de los linfocitos T en la perpetuación de la enfermedad. De hecho, se ha descrito que las células T procedentes de pacientes con EII tienen disminuida la muerte celular programada o apoptosis, favoreciendo el mantenimiento de la activación de la inmunidad adaptativa (Ina y col., 1999).

Algunos de los avances significativos para entender las causas y la fisiopatología de la EII derivan del estudio con diferentes modelos experimentales en animales que intentan reproducir la enfermedad. Estos modelos permiten realizar experiencias que no son factibles en humanos, posibilitando el estudio del proceso inflamatorio en tiempos más cortos, y además, pueden ser utilizados como herramientas para evaluar los posibles tratamientos farmacológicos, así como para determinar su mecanismo de acción para, a posteriori, ser evaluados en estudios más complejos en pacientes con EII (estudios clínicos). Muchos de estos modelos animales se encuentran asociados, al igual que en humanos, a una activación de las células T de tipo Th1 (Th, linfocito T colaborador, *T helper*), con un incremento de la secreción de IL-12, de interferón ($IFN\gamma$) y del factor de necrosis tumoral α , ($TNF\alpha$, *tumor necrosis factor α*), de forma similar a la respuesta que tiene lugar en la EC (Strober y col., 2002). Éste sería el caso del modelo del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) en rata (Fuss y col., 2002), de los ratones deficientes en IL-2 (Ehrhardt y col., 1997), o de los ratones transgénicos STAT4 (STAT, *signal transducers and activator of transcription*) (Wirtz y col., 1999). Por el contrario, la CU se ha clasificado como una inflamación de tipo Th1/Th2 atípica, ya que existe un aumento en el colon de los pacientes de citocinas del tipo Th2 como IL-5 e IL-13, pero no se afectan los niveles de IL-4, y además, se produce un incremento de las citocinas Th1 como $TNF\alpha$ e IL-1 β (Fuss y col., 1996; Strober y col., 2002). Por este motivo, se han desarrollado modelos de colitis intestinal de tipo Th2 como por ejemplo, el modelo de la oxazolona (Boirivant y col., 1998), así como la colitis espontánea desarrollada en ratones *knock out* (KO) de la cadena α del receptor de células T (TCR, *T cells*

receptor) (Mizoguchi y col., 1999). El modelo del sulfato de dextrano sódico (DSS) ha mostrado una buena correlación con el patrón de respuesta atípica Th1/Th2 y puede considerarse un excelente modelo para estudiar la CU (Dieleman y col., 1998).

Por otra parte, a pesar de que no existe un tratamiento ideal para la EII, se oferta un amplio abanico de posibilidades terapéuticas. Algunas estrategias farmacológicas bloquean la activación de la inmunidad innata, actuando directamente sobre los macrófagos y los neutrófilos o bien sobre los productos generados por estas células, como algunas citocinas proinflamatorias y las prostaglandinas (PG). Este es el caso de los aminosalicilatos, ampliamente utilizados durante largo tiempo como tratamiento en la EII (Klotz, 2000; Stein y Hanauer, 2000) que disminuyen la liberación de leucotrienos (LT), de PG (Tromm y col., 1999), y de las citocinas TNF α e IL-1 β (MacDermott, 2000); o los anticuerpos anti-IL-12 (ABT-874) o anti-TNF (infliximab, adalimumab) administrados en pacientes con EII con gran éxito (Mannon y col., 2004; Sardborn y col., 2007). Otras terapias ejercen su efecto por inhibición de la proliferación y activación de las células T, como los inmunosupresores ciclosporina (CsA), azatioprina o metotrexato. Sin embargo, la mayoría de las estrategias farmacológicas pueden actuar tanto a nivel de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, como es el caso de los aminosalicilatos y el infliximab, que han demostrado una inducción de la apoptosis en los linfocitos T activados de forma crónica en el colon (Liptay y col., 1999; Ten Hove y col., 2002).

Nuestro grupo de investigación lleva varios años tratando de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para la EII, que combinen un perfil adecuado de eficacia, seguridad y coste, y que supongan una alternativa al arsenal terapéutico disponible, ya que la administración de los tratamientos farmacológicos que existen en la actualidad es limitada por la aparición de importantes efectos adversos. Se han estudiado diversas estrategias como la administración de flavonoides (Camuesco y col., 2004; Comalada y col., 2005), ácidos grasos omega-3 (Camuesco y col., 2005), probióticos (Perán y col., 2007a; Perán y col., 2007b), prebióticos (Lara-Villoslada y col., 2006) y posibles fármacos como la dersenazina sódica, una asociación entre el 5-aminosalicílico (5-ASA) y un antagonista del factor activador de plaquetas (PAF, *platelet activating factor*) (Gálvez y col., 2000). En esta Tesis Doctoral, nos hemos propuesto abordar el estudio de un nuevo compuesto derivado de salicilatos como agente modulador de la respuesta inflamatoria, se trata del UR-1505. Para ello, hemos observado su especificidad y mecanismo de acción *in vitro* en las distintas células del sistema inmunitario implicadas en la EII y pertenecientes, tanto a la inmunidad innata (macrófagos, células epiteliales) como a la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B). Además, hemos evaluado la posible utilización terapéutica de este compuesto en la EII, tanto en la EC como en la CU, empleando dos modelos de colitis experimental, mediante la administración de TNBS y DSS a ratas de laboratorio. Las características farmacológicas del UR-1505 (absorción, biodisponibilidad, vida media) se encuentran resumidas en el capítulo 3 de este trabajo.

Los linfocitos como diana terapéutica del UR-1505

El primer indicio de que el UR-1505 podría ser un buen candidato para el tratamiento de la EII se observó cuando este compuesto fue capaz de bloquear a nivel *in vitro* la activación de células T, procedentes de ratón o humanos, mediante la inhibición de la proliferación y producción de citocinas proinflamatorias (capítulo 4, 5, 6 y 7). Como modelo celular utilizamos, en la gran mayoría de estudios presentados, los linfocitos procedentes de bazo de ratón y de sangre periférica humana ya que son cultivos primarios, no transformados, que presentan la maquinaria del ciclo celular intacta y responden de forma fisiológica a la presencia de factores que inducen la proliferación, la activación o la apoptosis celular. En este sentido, la activación específica de los linfocitos T se caracteriza por un aumento de la proliferación celular, que da lugar a la expansión clonal de estas células, con la consiguiente producción de citocinas, que desarrollarán entonces todas sus funciones específicas (Mondino y Jenkins, 1994).

De esta forma observamos que el UR-1505, de forma dosis dependiente (30-300 μM), inhibió la proliferación inducida por la activación del TCR con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en linfocitos T humanos de sangre periférica a partir de las 48 horas (capítulo 4), hecho ratificado también en linfocitos procedentes de bazo ratón estimulados mediante la lectina concanavalina A (ConA), un activador policlonal que induce la activación de todas las vías de señalización y presenta efectos similares a la activación por el receptor TCR (capítulo 5). Además, observamos que el efecto antiproliferativo del UR-1505 sobre los linfocitos T no se produjo como consecuencia de la disminución de la viabilidad celular, sugiriéndonos que este compuesto, a las concentraciones analizadas, no induce apoptosis en linfocitos T activados de sangre periférica ni en esplenocitos de ratón (capítulo 4 y 5).

La inhibición de la proliferación celular producida por el UR-1505 en linfocitos T activados, también se correspondió con una disminución de la producción de citocinas, tanto Th1 como Th2. En este sentido, observamos que el pretratamiento con UR-1505 (30-300 μM) disminuía, hasta niveles basales, el aumento de la producción de citocinas en linfocitos T humanos de sangre periférica activados con anti-CD3 y anti-CD28. El efecto más importante observado en estas células fue la disminución de IL-5 e IFN γ a partir de las 24 horas; sin embargo, la producción de IL-4 y TNF α sólo se vio modificada a la concentración de 300 μM , y la disminución no llegó a ser significativa hasta las 72 horas de estimulación (capítulo 4). El tratamiento con el UR-1505 (100-300 μM) en linfocitos T procedentes de bazo de ratón activados con ConA durante 48 horas, provocó la inhibición de la producción de diversas citocinas tanto Th1 (IL-12, IFN γ , IL-1 β) como Th2 (IL-6, IL-5, IL-10). Al igual que sucedió en linfocitos T humanos de sangre periférica, el IFN γ , la IL-12 y la IL-5 fueron drásticamente inhibidas por el tratamiento con el UR-1505 en esplenocitos activados con ConA. Sin embargo, el UR-1505 apenas inhibió la secreción del TNF α y la IL-4 en los esplenocitos a las 48 horas de estimulación, no analizándose a tiempos posteriores (capítulo 5 y 7).

Paralelamente a la activación de los linfocitos T, las células B, y las inmunoglobulinas (Ig) secretadas, también están implicadas en la patogénesis de la EII. En la CU, sobre todo, se ha demostrado que las células plasmáticas aisladas de la mucosa colónica dan lugar a una gran cantidad de Ig (Rüthlein y col., 1992) y casi el 60-80% de los enfermos tienen anticuerpos de clase IgG, en el suero o la mucosa (Monteleone y col., 2002). Por esta razón, nos resultó interesante estudiar el efecto del UR-1505 sobre cultivos primarios de linfocitos B procedentes de bazo de ratón. En este caso, los linfocitos B se estimularon con altas concentraciones de lipopolisacárido (LPS) (50 µg/ml), provocando así la activación mediante la unión al receptor de tipo Toll 4 (TLR, *Toll like receptor*) presente en estas células (Minguet y col., 2008). La activación de los linfocitos B por el LPS induce un aumento de la proliferación celular y de la producción de Igs, entre ellas la IgG y la IgA. Los resultados mostraron que el UR-1505 inhibió de forma dosis dependiente (30-300 µM) la proliferación y disminuyó la producción de IgG e IgA en linfocitos B procedentes de bazo de ratón estimulados con LPS durante 48, 72 y 96 horas, respectivamente (capítulo 7), sin afectar a la viabilidad de estas células (datos no mostrados). Todo esto nos sugirió que el UR-1505 podría estar inhibiendo la activación de la inmunidad humoral en el colon.

En contraposición a los linfocitos T y B, los macrófagos, pertenecientes a la inmunidad natural o innata, son células especializadas en reconocer múltiples antígenos de forma no específica y condicionan la posterior respuesta inmunitaria. Es por ello que, desde el punto de vista de defensa del organismo, es conveniente que exista un número elevado de macrófagos dispuestos a actuar como la primera línea de defensa. En este sentido, y a diferencia de lo que ocurre con los linfocitos, los macrófagos se encuentran proliferando en condiciones normales para poder mantener una población constante y elevada, y tras un estímulo activador, los macrófagos dejan de proliferar y pasan a desarrollar sus funciones (Xaus y col., 2001). En la EII se ha descrito que la mutación en el gen NOD2/CARD15 (NOD, Dominio de oligomerización de nucleótidos, *nucleotide-binding oligomerization domain*/CARD, Dominio de reclutamiento y activación de caspasas, *caspase activation and recruitment domains*) en estas células puede ser responsable de la activación alterada del factor de transcripción nuclear κB (NFκB, *nuclear factor κB*), provocando un incremento de citocinas proinflamatorias y, por tanto, una respuesta inflamatoria exacerbada (Comalada y Peppelenbosch, 2008). Por todo lo comentado, decidimos estudiar la acción del UR-1505 en cultivos primarios de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM, *bone marrow-derived macrophage*) de ratón. Estas células se encuentran proliferando de forma basal gracias a la presencia del factor de crecimiento específico de macrófagos (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*). Sin embargo, si los BMDM son activados con el LPS o el IFNγ, dejan de proliferar y pasan a secretar diversos mediadores proinflamatorios, como las citocinas TNFα o IL-12; PG y tromboxanos (TX) a través de la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), y óxido nítrico (NO) mediante la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Nuestros resultados indicaron que el UR-1505 no inhibió la proliferación inducida por el M-CSF en BMDM a las concentraciones ensayadas (300-1000 µM) (capítulo 5). El

compuesto tampoco modificó la secreción de TNF α e IL-12 en macrófagos después de la activación con LPS durante 24 horas ni la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 en estas mismas células activadas por LPS o IFN γ durante 6 y 24 horas, respectivamente (capítulo 5). Todos estos datos demostraron que el UR-1505 no posee ningún efecto sobre los macrófagos estudiados.

Por último, el efecto del UR-1505 fue analizado sobre las células epiteliales intestinales, que también juegan un papel clave en la patología de la EII (capítulo 1). Como modelo de epitelio intestinal seleccionamos la línea celular HT-29, procedente de un adenocarcinoma humano, ya que los cultivos *ex vivo* de las células epiteliales intestinales son muy difíciles de obtener y manipular. En este sentido, el UR-1505, al igual que en los macrófagos, no inhibió la proliferación en la línea HT-29 en estado confluyente a las concentraciones ensayadas (300-1000 μ M) (datos no mostrados). Además, se estudió la producción de IL-8, una quimiocina que provoca la atracción de células inflamatorias hacia la zona de infección. La producción de IL-8 fue inducida por el LPS durante 24 horas, y no se vio modificada hasta altas concentraciones de UR-1505 (1000 μ M), donde el compuesto disminuyó la viabilidad celular (datos no publicados).

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados hasta el momento, podemos afirmar que el UR-1505 es específico de linfocitos, tanto de linfocitos T como B, y no afecta a macrófagos ni a células epiteliales. El hecho de que sólo afecte a la inmunidad adaptativa puede ser positivo, ya que la mayoría de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes se desarrollan por una activación exagerada del sistema inmunológico, sobre todo, con la participación de los linfocitos (Asarch y col.; 2008; Fuss y col., 1996; Larché, 2006). Además, el hecho de que este producto sea administrado de forma oral y no presente un efecto sobre la inmunidad innata también podría ser positivo, ya que es la primera línea de defensa del organismo, los procesos de reconocimiento, ingestión y destrucción de patógenos por parte de los macrófagos y los neutrófilos se seguirían produciendo, y se podrían evitar infecciones bacterianas oportunistas (Marks y Segal, 2008).

Mecanismo de acción del UR-1505

El siguiente paso que nos planteamos fue determinar el mecanismo de acción o diana sobre la cual el UR-1505 ejercía su efecto en células T y B. Se ha demostrado que el efecto inhibitorio del UR-1505 sobre la producción de citocinas, se produce a nivel transcripcional porque el ARN de muchos de los genes se reduce después del tratamiento con UR-1505. Este es el caso de la inhibición de la expresión de IFN γ e IL-5 en linfocitos T de sangre periférica activados durante 24 horas con anti-CD3 y anti-CD28 (capítulo 4) y la disminución de la expresión de IL-1 β e IL-6 en linfocitos T procedentes de bazo de ratón estimulados 48 horas con ConA (capítulo 6). Por este motivo, se estudiaron los principales factores de transcripción activados en linfocitos como son el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT, *nuclear factor of activated T-lymphocytes*), el NF κ B y la proteína activadora-1 (AP-1, *activator protein 1*), responsables de la expresión de la mayoría de citocinas

analizadas (Macian y col., 2001; Sánchez-Valdepeñas y col., 2006). Los ensayos se realizaron en células T humanas de sangre periférica, estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28, y también se utilizó la línea celular Jurkat T, de linfocitos T humanos leucémicos, estimulados con PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato, *phorbol 12-myristate 13-acetate*) y el ionóforo de calcio, Ionomicina (Io), que permiten evaluar con facilidad las distintas vías de señalización en linfocitos.

Una de las primeras posibilidades que nos planteamos fue detectar la unión de los diferentes factores de transcripción al ADN, mediante las técnicas de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*) y EMSA (Ensayo de movilidad electroforética, *electrophoretic mobility shift assay*), utilizando los extractos nucleares de las células Jurkat T y de los linfocitos T humanos de sangre periférica. Los resultados mostraron que el UR-1505 específicamente inhibió la unión al ADN del NFAT en células T, sin afectar a los factores de transcripción NFκB y AP-1 (capítulo 4). Además, el UR-1505 inhibió la proliferación de células T y la producción de citocinas en un rango de concentraciones similar a las que inhibió la vía de NFAT. Por esta razón, el selectivo efecto del UR-1505 disminuyendo la secreción de algunas citocinas como IFNγ o IL-5, pero no afectando a TNFα (capítulo 5) ni a IL-4 (capítulo 7), se podría explicar por el hecho de que la expresión de IL-5 e IFNγ se encuentra modulada por NFAT (Lee y col., 1995; Hogan y col., 2003). Sin embargo, la expresión de TNFα principalmente se lleva a cabo bajo la regulación de NFκB (Becker y col., 1999), mientras que la transcripción de IL-4 en células T depende también de la vía de JAK-STAT (JAK, Janus tirosina kinasa, *Janus tyrosine kinase*) (So y col., 2007; Yamashita y col., 2000). La ausencia de efecto en linfocitos T activados sobre la IL-4 por parte del UR-1505, están de acuerdo con que el UR-1505 fue incapaz de inhibir la proliferación inducida por la vía de JAK-STAT (proliferación celular dependiente de IL-2) en linfocitos T humanos de sangre periférica (capítulo 4).

La vía de señalización de NFAT juega un papel muy importante en linfocitos T y B. A modo de resumen, cuando estas células se encuentran en reposo, el factor de transcripción se encuentra fosforilado y se localiza en el citoplasma. Tras la estimulación de los linfocitos, tiene lugar una movilización de calcio, elevándose los niveles intracelulares que inducen una activación de la enzima calmodulina. La calmodulina, una serina-treonina kinasa, a su vez, activa a la fosfatasa calcineurina, que desfosforila al factor NFAT citoplasmático. Este proceso conduce a la entrada del factor al núcleo (translocación) y a la exposición de las secuencias de localización nuclear del NFAT, permitiendo así la transcripción de múltiples genes (Sandborn y Tremaine, 1992) (Figura 1). La asociación física entre la calcineurina y el NFAT sigue incluso en el núcleo donde la calcineurina desfosforila al factor mientras los niveles de calcio intracelulares sigan elevados (Rao y col., 1997). La inhibición de la señalización, se produce por la activación de kinasas específicas, que fosforilan el NFAT e inducen la exportación de este factor de transcripción del núcleo al citoplasma. Sin embargo, hay datos que muestran que la fosforilación en residuos específicos de NFAT provoca un incremento de su actividad transcripcional, aumentando la unión al ADN por cambios conformacionales y/o reclutamiento de cofactores como la

histona acetiltransferasa p300 (transactivación). En este sentido, Okamura y col. (2000) han demostrado como la fosforilación en el dominio transactivador de NFATc2, después de la estimulación de células T con PMA más Io, incrementa la actividad transcripcional (Okamura y col., 2000).

El NFAT, por tanto, puede estar regulado en diferentes niveles: fosforilación/desfosforilación, localización subcelular, unión al ADN, y transactivación (Aceves y col., 2004; Rao y col., 1997) (Figura 1).

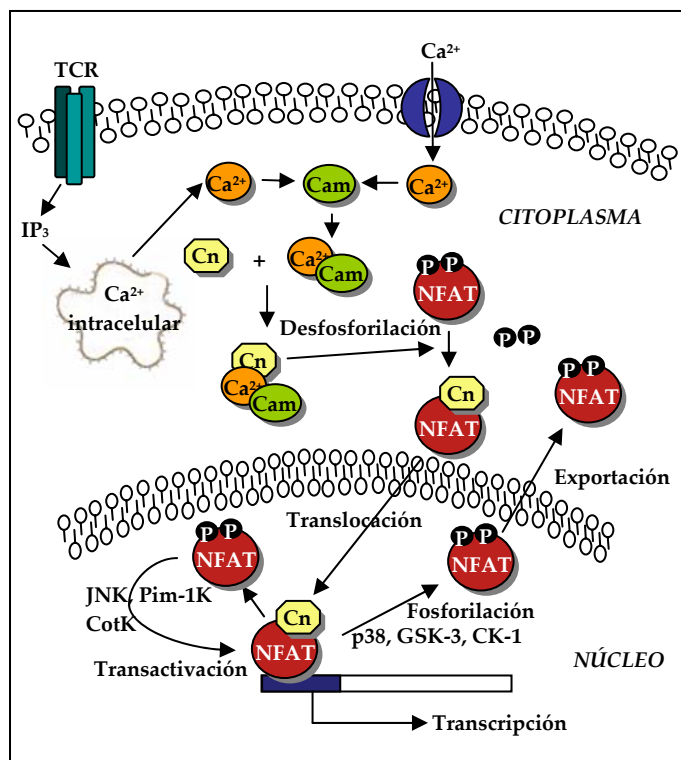


Figura 1: Activación del NFAT en linfocitos T. Ca^{2+} , calcio. Cam, calmodulina. Cn, calcineurina. IP_3 , inositol 3-fosfato. P, fosfato.

Se desarrollaron diversas experiencias para determinar si el UR-1505 afectaba, además de la unión al ADN, a los otros niveles de regulación. Los estudios de localización subcelular del NFAT se llevaron a cabo mediante inmunocitoquímica con las células HeLa, que fueron estimuladas con el ionóforo de calcio Io, provocando así su activación. Las células HeLa son células epiteliales humanas procedentes de carcinoma cervical, ampliamente utilizadas para estudiar la translocación de factores de transcripción. Los resultados demostraron que el UR-1505 no tuvo ningún efecto en la translocación del NFAT hacia el núcleo inducida por Io (capítulo 4).

Por otra parte, se determinó si la inhibición del NFAT provocada por el UR-1505 podría deberse a un aumento de la exportación del factor de transcripción, provocando entonces una disminución de la unión al ADN. Para ello, se utilizó la leptomicina B como inhibidor de la exportina (CRM1) junto con el UR-1505 y se determinó, de nuevo, la unión del NFAT al ADN en Jurkat T estimuladas con PMA e Io. Se demostró cómo la incorporación de leptomicina B no modificó el efecto de inhibición del UR-1505 sobre el NFAT (capítulo 4). A su vez, para confirmar la ausencia de efecto del UR-1505 sobre la exportación nuclear, se estudió la actividad de las kinasas p38, glucógeno sintasa kinasa-3 (GSK-3, *glycogen synthase kinase 3*) y caseína kinasa-1 (CK-1, *casein kinase 1*) que son las principales proteínas implicadas en la exportación del NFAT (Beals y col., 1997; Chow y col., 1997; Kiani y col., 2000) (Figura 1). El UR-1505 tampoco afectó a la actividad de ninguna de estas kinasas (capítulo 4), confirmando así que el mecanismo del UR-1505 no está mediado por el incremento de la exportación del NFAT.

El hecho de que el UR-1505 inhiba la activación del NFAT, nos hizo plantearnos comparar este compuesto a nivel *in vitro* con la CsA, un inhibidor selectivo de la calcineurina e inmunosupresor utilizado en pacientes con EII, en los brotes corticorrefractarios de CU (Lichtiger y col., 1994) y en la EC fistulizante (Present y Lichtiger, 1994). A modo de resumen, la CsA forma un complejo con ciclofilina, una enzima que facilita el plegamiento de proteínas, y se une después a calcineurina, impidiendo la translocación al núcleo del NFAT y, por tanto, su activación.

El UR-1505, a diferencia de la CsA, no afectó a la translocación del NFAT del citoplasma al núcleo y tampoco modificó la exportación de este factor de transcripción del núcleo al citoplasma. Por eso, el UR-1505 inhibiría la activación del NFAT a nivel de la unión al ADN, aunque no podemos descartar la implicación de otros mecanismos, como es el caso de la transactivación. Se ha descrito que la actividad de kinasas inducibles como Pim-1 kinasa (Pim-1K) (Rainio y col., 2002), c-jun N-terminal kinasa (JNK) (Ortega-Pérez y col., 2005) y Cot kinasa (CotK) (De Gregorio y col., 2001) pueden fosforilar a NFATc1 y NFATc2, incrementando su actividad transcripcional (Figura 1). Por eso, una posibilidad que sugerimos es que UR-1505 podría actuar inhibiendo la unión del NFAT al ADN, reduciendo la actividad de estas kinasas.

Además, nuestros resultados demostraron que la CsA inhibe la proliferación de linfocitos T activados, como lo hace también el UR-1505, tanto en linfocitos T humanos de sangre periférica activados con anti-CD3 y anti-CD28 (capítulo 4), como en células T procedentes de bazo de ratón estimuladas con ConA (capítulo 5). Sin embargo, mientras que el UR-1505 reduce la secreción de IL-12 e IFN γ , sin mostrar efecto sobre TNF α (capítulo 4, 5 y 6), la CsA inhibe la producción de TNF α e IFN γ , como se ha demostrado previamente (Ritter y col., 2005), sin modificar los niveles de IL-12 en linfocitos T de bazo de ratón activados por ConA durante 48 horas (capítulo 5). Además, nuestros resultados demuestran que el UR-1505 no inhibe NF κ B, y CsA posee un efecto de inhibición parcial de NF κ B (capítulo 4), acorde con estudios previos (Meyer y col., 1997). Por lo tanto, se

demuestra que el mecanismo de acción de UR-1505 y CsA es diferente, explicándose así las diferencias observadas en la activación celular en cuanto a la secreción de citocinas.

Se conoce que el NFAT actúa como punto común entre la proliferación y producción de citocinas por las células T (Macián, 2005; Peng y col., 2001) y promueve la transición de la fase G1 (de crecimiento) a la S (de replicación) del ciclo celular por activación del TCR (Caetano y col., 2002). Así, observamos como el UR-1505 incrementó los niveles de p27^{KIP1} en la línea celular Jurkat T, que se encuentra proliferando de forma basal. El p27 es una proteína inhibidora del complejo ciclina E-cdk2, que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, permitiendo el paso de la fase G1 a la fase S en respuesta a señales externas (Xaus y col., 2001). La acumulación de p27 produce una parada en fase G1, induciendo quiescencia en las células, sin inducir apoptosis (Mohapatra y col., 2001). El UR-1505 dio lugar a la parada del ciclo celular en G1/S por un aumento de la expresión de p27, sin reducir la viabilidad en Jurkat T (capítulo 4), efecto que ya se había confirmado en linfocitos T de bazo de ratón (capítulo 5).

Por otra parte, puesto que el NFAT es una diana de salicilatos y el UR-1505 es un derivado del ácido salicílico (AS), decidimos comparar las propiedades inmunomoduladoras de estos compuestos. En este sentido, las concentraciones utilizadas de AS (300-500 μ M) no mostraron actividad antiproliferativa en linfocitos T humanos de sangre periférica, pero inhibieron parcialmente la proliferación celular de linfocitos T activados procedentes de bazo de ratón a concentraciones más elevadas (1000 μ M) (capítulo 5). Además, nuestros resultados mostraron como el AS no inhibió la secreción de IFN γ ni TNF α en estas células activadas (capítulo 5). Todos los efectos observados están de acuerdo con estudios previos, donde los salicilatos provocan una inhibición de la proliferación en linfocitos a dosis más altas (1000-3000 μ M), parece ser que por interferir en la vía de señalización del NF κ B (Cavallini y col., 2001), aunque otros autores atribuyen dicho efecto a una actuación sobre NFAT (Núñez y col., 2006).

La implicación del AS en la vía de señalización del NF κ B quedó confirmada cuando observamos que dicho compuesto, a 1000 μ M, inhibió la expresión de COX-2 inducida por el LPS e IFN γ en BMDM. Parece ser que esta acción de disminución de la expresión de la COX-2, se debe a la inhibición de la MAP quinasa (MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos *mitogen-activated protein kinase*) regulada por señales extracelulares ERK (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) y el factor de transcripción NF κ B, por parte de los salicilatos (Chae y col., 2004). Estos resultados, junto con el hecho de que la activación de la vía de señalización de NFAT no esté implicada en los mecanismos de proliferación y activación de estas células (Comalada et al, 2003; Goodridge y col., 2007), nos confirman, de nuevo, que el UR-1505 presenta un mecanismo de acción diferente al de AS y CsA. Mientras que AS y CsA inhiben NFAT y NF κ B, aunque sea de forma parcial, el UR-1505 se considera específico del factor de transcripción NFAT.

Aunque no se ha analizado el mecanismo de acción del UR-1505 sobre los linfocitos B, nuestros resultados sugieren que el compuesto actuaría al mismo nivel que en linfocitos T, puesto que su activación a través del LPS a altas concentraciones (50 µg/ml) induce la activación del factor de transcripción NFAT (Kumar y col., 2005; Williamson y col., 1984), conduciendo a la expansión clonal y secreción de Ig (Kawaguchi, 1994; Minguet y col., 2008). El hecho de que el UR-1505 haya inhibido la proliferación y la producción de IgG e IgA en linfocitos activados por LPS (capítulo 7), nos permite establecer la hipótesis de que probablemente el compuesto utilice el mismo mecanismo de acción que en los linfocitos T. Así, otros inmunosupresores como la CsA, también inhiben la proliferación y la producción de IgM e IgG en las células B (Heidt y col., 2008; Venkataraman y col., 1994).

Modelos experimentales de colitis: evaluación del proceso inflamatorio

El segundo indicio de que el UR-1505 podría ser un buen candidato para el tratamiento de la EII, se observó cuando se evaluó la eficacia terapéutica de este nuevo agente en dos modelos experimentales inducidos químicamente, donde los animales fueron expuestos a TNBS o a DSS.

El primer modelo de colitis se indujo mediante la administración intracolónica de 10 mg de TNBS disueltos en etanol al 50% con una cánula introducida 8 cm a través del ano a ratas Wistar hembras. El etanol principalmente promueve la destrucción de la barrera epitelial, con incremento de la permeabilidad de la membrana, permitiendo así la translocación de la microflora y productos luminales y el acceso del TNBS, que actúa como hapteno, dando lugar a infiltración leucocitaria y a la activación del sistema inmunitario. El sacrificio de los animales se realizó a los 7 días, manifestándose entonces una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la activación, principalmente, de células de tipo Th1 en la zona dañada, de forma similar a lo que ocurre en la EC (Fuss y col., 2002).

El otro modelo de colitis fue inducido por la administración de DSS en el agua de bebida. Se piensa que el DSS ejerce un efecto tóxico directo sobre las células del epitelio intestinal de las criptas, afectando a la integridad de la barrera epitelial, y permitiendo la translocación de las bacterias luminales y la infiltración de neutrófilos y otras células inmunológicas (Okayasu y col., 1990). Además, cabe mencionar que el DSS ejerce un efecto directo sobre la activación de los macrófagos residentes en el colon (Okayasu y col., 1990, Strober y col., 2002) y que, a diferencia del modelo con TNBS, en este modelo también juega un papel clave la respuesta Th2 (Dieleman y col., 1998). Por todo esto, la colitis inducida con DSS se considera un excelente modelo para correlacionarlo con la CU. Una ventaja que presenta es que dependiendo del protocolo a seguir, se puede establecer tanto un proceso colítico de tipo agudo como uno crónico (Kullmann y col., 2001). Cuando la administración de DSS se realiza al 5% durante 5 días, se da lugar a un proceso agudo, donde predomina la respuesta inmunológica de tipo innata (Qualls y col., 2008). Por el contrario, si después

de 5 días con DSS al 5%, se disminuye la concentración de DSS al 2% y se mantiene durante 10 días, se da lugar a la fase de inflamación crónica en el colon, a la cual hemos denominado fase establecida (Camuesco y col., 2006), y donde también existe una marcada activación de linfocitos, generándose la activación de la inmunidad adaptativa (capítulo 6).

La inflamación intestinal que se produce en ambos modelos se caracteriza por pérdida de peso asociada a anorexia, diarrea y presencia de sangre rectal en los animales durante la administración de los agentes exógenos. Además, cuando se sacrifican los animales, se puede observar un engrosamiento de la pared intestinal, como resultado del edema que se genera, con un acortamiento del intestino. Ambos parámetros provocan un incremento significativo de la relación peso/longitud colónica en comparación con los animales no colíticos. El daño tisular se encuentra caracterizado por inflamación, edema, y ulceraciones en ambos modelos, además, de una severa necrosis en el caso del modelo por administración de TNBS (capítulo 5 y 6).

Asimismo, se ha podido comprobar como los dos modelos de colitis se caracterizan por una infiltración leucocitaria incrementada en las zonas de inflamación, compuesta principalmente por células mononucleares (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) y granulocitos. Este hecho se pone de manifiesto por el incremento de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) colónica, y de mediadores quimiotácticos, como el leucotrieno B₄ (LTB₄) (capítulo 5 y 6). La presencia en la mucosa de la enzima MPO es debida, principalmente, a una infiltración de neutrófilos, aunque también puede ser expresada en menor extensión por otras células del sistema inmunitario, como los monocitos y los macrófagos (Brown y col., 2001; Klebanoff, 2005). Todas estas células son reclutadas al foco inflamatorio, desde las primeras fases del proceso inflamatorio, por la acción de sustancias quimiotácticas como el LTB₄, producido por neutrófilos, macrófagos y mastocitos (Bell y col., 1995; Ohnishi y col., 2008). Apoyando todo esto, una amplia evidencia experimental y clínica postula que en el intestino inflamado existe un incremento de la actividad granulocítica (Gálvez y col., 2003), que da lugar a un desencadenamiento del estrés oxidativo. Como ya se ha establecido, tanto en el modelo inducido por TNBS como en la colitis por DSS, el daño tisular durante la inflamación intestinal lleva a una depleción del antioxidante glutation (GSH), al igual que sucede en la EII humana (Miralles-Barrachina y col., 1999; Sido y col., 1998) y en otros modelos de colitis (Cetinkaya y col., 2005).

Un hecho significativo son las diferencias observadas en los 2 protocolos de administración de DSS, en cuanto al aumento de la actividad MPO cuando se comparan con las ratas no colíticas. En la colitis aguda el incremento de la actividad enzimática es mucho más severo que en la colitis establecida. Estos datos nos sugirieron que existe un cambio en el perfil celular del infiltrado inflamatorio entre los dos tipos de protocolos, con una menor presencia y/o activación de neutrófilos en la fase establecida. Este mismo hecho tiene lugar en la CU, donde existe una activación de los neutrófilos, sobre todo en los

ataques agudos, que contribuye al daño tisular y a la inflamación (Lampinen y col., 2008; Naito y col., 2007).

Otros mediadores que aparecen aumentados en la colitis inducida por los dos agentes, son las enzimas iNOS y COX-2 (Camuesco y col., 2004; Perán y col., 2007b), con la consiguiente elevación de los niveles de NO y PG, respectivamente (capítulo 5 y 6). La iNOS es producida fundamentalmente por los macrófagos presentes en la mucosa colónica como mecanismo defensivo (Camuesco y col., 2004), aunque otras células presentes en la mucosa también pueden expresar esta proteína, como los fibroblastos, las células epiteliales, las células endoteliales, las células presentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cells*) o las células asesinas naturales (NK, *natural killer*) (Coleman, 2001). Se han detectado grandes cantidades de NO en pacientes con EII (Rachmilewitz y col., 1995), que provocan un daño tisular al reaccionar con radicales superóxido (O_2^-) y generar peroxinitrilo (ONOO \cdot), un oxidante muy potente (Alderton y col., 2001). Por otro lado, la enzima COX-2 es expresada mayoritariamente en macrófagos, pero también se encuentra en fibroblastos, linfocitos, células dendríticas (DCs, *dendritic cell*), células endoteliales y epiteliales (Chacón y col., 2005; Corral y col., 2007; González-Rey y Delgado, 2008; Gudis y Sakamoto; 2005). Se ha observado una elevación significativa de la expresión de la enzima en los modelos experimentales de colitis estudiados, que indica un incremento en el metabolismo del ácido araquidónico, de forma similar a lo que ocurre en la EII (El Miedany y col., 2006) y en los distintos modelos de inflamación intestinal (Meenan y col., 1996; Perán y col., 2007a).

La colitis inducida en ratas por TNBS y DSS también da lugar a una disminución de la producción de la IL-10 en los homogenados de colon (capítulo 7). Esta citocina, secretada por las células T reguladoras (Tr) juega un importante papel en la tolerancia oral, ya que es clave en el control de los procesos inflamatorios al impedir la activación de otros tipos celulares (Allez y Mayer, 2004). La importancia de la inhibición de esta citocina antiinflamatoria en la inflamación intestinal también se ha demostrado en los ratones KO para IL-10, que desarrollan una colitis espontánea a las 4-8 semanas (Kühn y col., 1993).

Por otra parte, en cuanto a la producción de citocinas proinflamatorias, en ambos modelos se ha demostrado la existencia de una mayor producción de TNF α e IL-1 β en los animales colíticos. El TNF α y la IL-1 β son citocinas del tipo Th1, sintetizadas por un amplio abanico de células del sistema inmunológico, tanto pertenecientes a la inmunidad innata como a la adaptativa, aunque los macrófagos y las DCs se consideran sus principales fuentes de producción (Woywodt y col., 1999). Ambas citocinas participan en numerosas funciones en la mucosa intestinal como la inducción de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales, y la liberación de mediadores inflamatorios (NO, prostaciclina, PAF), favoreciendo así la entrada de nuevas células inflamatorias a la mucosa intestinal. Además, participan en la síntesis de metaloproteinasas por parte de los fibroblastos (Monteleone y col., 2002), y pueden contribuir al daño intestinal por alteración de la integridad de las membranas epiteliales, ya que son responsables de la hiperplasia de las

células de la cripta que tiene lugar en la EII (Bajaj-Elliott y col., 1998). Por todas estas acciones, el TNF α y la IL-1 β se consideran excelentes parámetros para evaluar la colitis intestinal, tanto en la EII (Rogler y Andus, 1998), como en los diferentes modelos experimentales de colitis (capítulo 5 y 6).

No obstante, si se han observado diferencias en las respuestas de linfocitos T CD4⁺ en ambos modelos experimentales de EII, al igual que sucede entre la EC y la CU. En el modelo de colitis por administración de TNBS, existen granulomas formados principalmente por linfocitos T (Chen y col., 2005), que producen una respuesta Th1, asociada con una elevada producción de citocinas como TNF α , IL-12 e IFN γ (Strober y col., 2002).

En el caso del DSS, no se han observado granulomas, pero sí existen unos agregados linfoides en la lámina propia, compuestos principalmente por linfocitos B, aunque también existen linfocitos T en la periferia (Dieleman y col., 1998). El modelo, en su fase aguda, se encuentra caracterizado por una respuesta de tipo Th1, y más tarde, en las fases crónicas de la inflamación, tiene lugar una mezcla de una respuesta Th1 y Th2, donde el TNF α y la IL-6 son las principales citocinas responsables del daño tisular (Dieleman y col., 1998; Strober y col., 2002). Existen estudios que muestran una participación de la IL-4 (Dieleman y col., 1998, Ohkawara y col., 2002), pero nuestros resultados indican que no hay modificación de la producción de esta citocina con la administración de DSS (capítulo 7), de forma similar a lo que ocurre en la CU (Fuss y col., 1996), y en concordancia con lo observado también por otros autores (Egger y col., 2000; Xu y col., 2008). Por otro lado, aunque no está claro un aumento de IL-5 en los homogenados colónicos, probablemente por la falta de kits comerciales de ELISA de esta citocina en rata, sí se produce un incremento de las células productoras de IL-5 en el bazo de los animales colíticos en las fases crónicas de la enfermedad (Dieleman y col., 1998). Además, se sabe que la ausencia de dicha citocina (ratones IL-5^{-/-}) da lugar a una reducción de la eosinofilia en los animales que reciben DSS, aunque no se produce una disminución de la severidad y extensión del daño (Forbes y col., 2004; Stevceva y col., 2000).

La presencia de agregados linfoides en el modelo del DSS, compuestos, principalmente, por linfocitos B (Dieleman y col., 1998) y el aumento de IL-5, citocina implicada en la proliferación y activación de estas células (Abbas y Lichtman, 2004), sugieren que la inmunidad adaptativa de tipo humoral desempeña un papel importante en este modelo de colitis. De hecho, se ha demostrado que los linfocitos B juegan un papel clave en la EII (Rüthlein y col., 1992), así, una sobreproducción de IgG en la mucosa, particularmente de IgG1, se considera relevante para la patogénesis de la CU, ya que provoca una activación del complemento (Scott y col., 1986). No obstante, los antígenos específicos implicados en el reconocimiento por IgG y los epítomos reconocidos por las células plasmáticas aumentadas en CU, no están totalmente definidos. Aunque se han encontrado una gran variedad de anticuerpos contra las células epiteliales y bacterias en suero de pacientes con CU, no está claro lo que sucede en este proceso. Se ha observado

que en los pacientes con CU existe un marcado incremento de células productoras de IgG (Baklien y Brandtzaeg, 1975) y anticuerpos IgG frente a antígenos desconocidos del colon (Hibi y col., 1990), antígenos de neutrófilos o autoantígenos como la isoforma 5 de la tropomiosina (Onuma y col., 2000). A diferencia de la IgG, la producción de IgA en el colon de pacientes con CU se encuentra disminuida dando lugar a un aumento del daño en el tejido (Brandtzaeg y col., 2006), ya que esta inmunoglobulina se encarga de la opsonización de antígenos y de su eliminación.

Por todas estas razones, consideramos que la medida de la producción de IgA e IgG podría constituir un buen parámetro inmunológico para evaluar la respuesta humoral de la mucosa intestinal. Nuestros resultados demuestran que, por primera vez y de forma simultánea, se produce un incremento de la producción de IgG en el colon y un descenso de IgA como consecuencia del proceso colítico originado en el modelo con DSS (capítulo 7), similarmente a lo que se ha establecido en los pacientes con CU (Onuma y col., 2000). Todo esto nos confirma que la evaluación de estas Igs podría ser de gran importancia para cuantificar la respuesta humoral generalizada del proceso inflamatorio, aunque consideramos que sería interesante verificar que sucede con otras Igs como IgG1 o IgG2a, que también se encuentran aumentadas en la EII (Furrie y col., 2004).

Efecto antiinflamatorio intestinal del UR-1505 en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS y DSS

El siguiente paso en esta Tesis Doctoral, después de analizar el proceso inflamatorio en los modelos de colitis experimental por TNBS y por DSS, consistió en determinar la posible acción antiinflamatoria intestinal del UR-1505, así como establecer el mecanismo de acción *in vivo* de este compuesto. Para ello, se evaluaron las modificaciones de los distintos parámetros bioquímicos, inmunológicos e histológicos comunes a ambos modelos de inflamación intestinal después de la administración del UR-1505, así como los parámetros más específicos de cada modelo, como la respuesta Th1 en el modelo del TNBS y la respuesta Th1/Th2 y humoral en el modelo del DSS.

Los resultados previos a este trabajo demostraron que el UR-1505 presenta una buena biodisponibilidad oral en ratas, y el 96.9% de la dosis administrada (10-50 mg/kg) es absorbida en el intestino delgado, manteniendo así altas concentraciones plasmáticas. Además, el UR-1505 presenta una vida media en sangre relativamente larga, del rango de 6-9 horas, por lo que la administración a los animales se puede realizar una vez al día. De hecho, la administración oral de una única dosis de 30 mg/kg (dosis ensayada en los modelos *in vivo*) da lugar a una concentración plasmática de, aproximadamente, 300 μ M (concentración empleada en las experiencias *in vitro*). Las dosis administradas del UR-1505 fueron 10 y 30 mg/kg, y se utilizaron 2 protocolos diferentes de administración del compuesto, un protocolo preventivo y otro curativo, para evaluar el efecto en las distintas condiciones.

En el modelo agudo de colitis inducido por DSS se estableció un protocolo preventivo, que consistió en la administración de UR-1505 al mismo tiempo que la incorporación de DSS al 5% en el agua de bebida durante 5 días. Sin embargo, en el modelo de colitis establecida, la administración del fármaco se realizó siguiendo un protocolo curativo, es decir, se comenzó la administración después de los 5 días de administración del DSS al 5%, cuando el daño colónico ya estaba establecido, y el suministro de DSS a todos los animales colíticos se redujo al 2% (Figura 2).

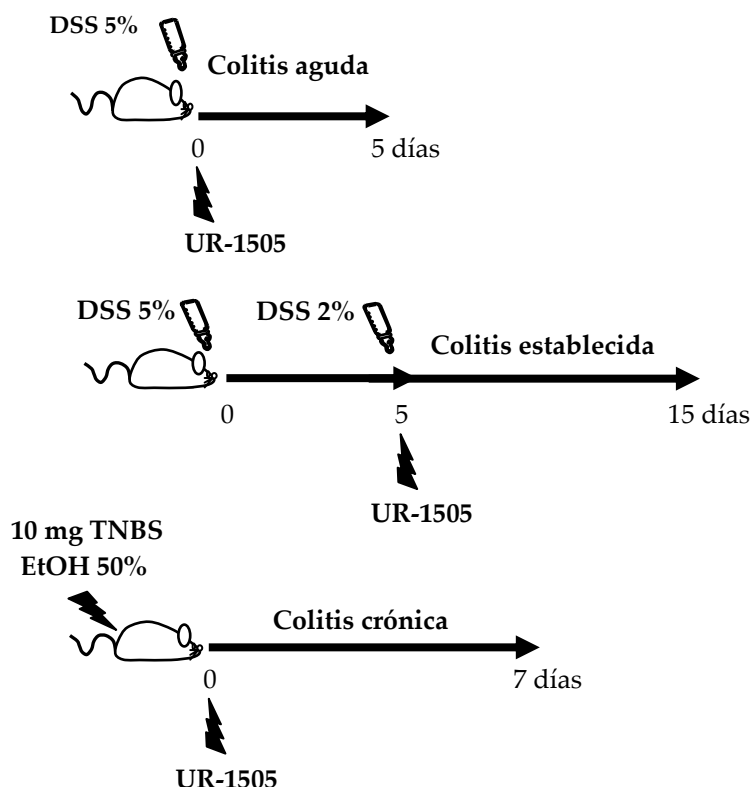


Figura 2: Protocolos de administración del UR-1505 en los modelos de colitis experimental en rata inducidos por TNBS o DSS.

En el caso del modelo inducido por TNBS, el tratamiento con el UR-1505 se realizó de forma curativa, es decir, se comenzó la administración junto con la inducción de la colitis en el primer día (Figura 2). Este diseño experimental, en un primer momento, nos podría plantear la duda de si el efecto antiinflamatorio demostrado por el UR-1505 en este modelo podría deberse a una atenuación del daño inducido por el hapteno, y no a una acción antiinflamatoria que facilitara la recuperación del daño en el tejido después de la administración del agente tóxico. Esta limitación fue verificada en estudios adicionales que revelaron como el pretratamiento con UR-1505 durante los 2 días anteriores a la inducción de la colitis (protocolo preventivo), no tuvo efecto sobre la recuperación del daño en las 24

horas posteriores a la administración de TNBS (datos no presentados). Estos estudios sugirieron que el UR-1505 está desprovisto de efecto preventivo en este modelo experimental en rata, pero facilita la restauración del tejido inflamado, efecto logrado alrededor de las 48 horas después de la instilación de TNBS (datos no presentados).

El análisis del proceso inflamatorio durante el desarrollo de las experiencias reveló como los animales mejoraron después del tratamiento con UR-1505 en ambos modelos, observándose un incremento del peso, de la ingesta de comida y una disminución de la incidencia de diarrea, tanto en el modelo del TNBS a partir del 5 día de la inducción de la colitis (datos no mostrados), como en el modelo establecido por administración de DSS a partir del día 11 del inicio de la enfermedad (capítulo 6). En el modelo agudo por DSS, la administración del compuesto no tuvo ningún efecto (capítulo 6).

El UR-1505 mostró eficacia antiinflamatoria en el modelo de colitis crónica inducida por la administración de TNBS, ya que fue capaz de facilitar la recuperación del daño colónico generado, como evidencia la disminución de la relación peso/longitud del colon, y la reducción significativa de la extensión del daño colónico respecto a los animales colíticos sin tratamiento. Además, como se demostró histológicamente, ambas dosis del UR-1505 mejoraron la citoarquitectura intestinal, restaurando las criptas y las células caliciformes, y disminuyendo las ulceraciones en las zonas dañadas (capítulo 5).

Asimismo, la administración del UR-1505 a 10 y 30 mg/kg a las ratas colíticas inhibió la producción de LTB_4 y redujo la actividad de la enzima MPO de forma significativa (capítulo 5). Estos resultados nos sugirieron que el UR-1505 podría estar actuando directamente inhibiendo la actividad de neutrófilos, sin embargo, observamos que el compuesto no restauró la actividad enzimática hasta niveles basales por lo que el efecto podría deberse a una reducción de la infiltración leucocitaria en el foco inflamatorio, y a la probable inhibición de la producción y/o liberación de moléculas quimiotácticas por los distintos tipos celulares. Por este motivo, analizamos también la infiltración leucocitaria por técnicas inmunohistoquímicas. Se comprobó que el UR-1505 llevó a una inhibición de la infiltración de macrófagos, neutrófilos y linfocitos en las áreas inflamadas del intestino en el modelo crónico con TNBS (capítulo 5). Esta menor infiltración leucocitaria provocada por el UR-1505 podría explicar también la restauración de los niveles de GSH en el colon que llevan a una disminución del estrés oxidativo, y puede ser interpretado como una manifestación del efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por el compuesto en este modelo de colitis experimental (capítulo 5). Estos resultados nos permiten justificar la capacidad del UR-1505 para modificar la respuesta inflamatoria global, ya que, como bien está descrito, en los primeros pasos de la inflamación intestinal, la marginación y extravasación de granulocitos circulantes, probablemente lleven a la perpetuación del proceso inflamatorio (García-Ramallo y col., 2002; Pavlick y col., 2002).

El UR-1505 mostró resultados paralelos al modelo del TNBS cuando se analizó en el modelo de colitis establecida por DSS. El compuesto manifestó un claro efecto

antiinflamatorio, observado, macroscópicamente, por una disminución del daño colónico, histológicamente por la restauración de la citoarquitectura de las criptas, de las células caliciformes y por la disminución del infiltrado de células mononucleares en mucosa y submucosa (capítulo 6). Bioquímicamente, se observó una disminución de los niveles de LTB_4 (datos no mostrados) y un aumento de GSH (capítulo 6). Sin embargo, el tratamiento con el UR-1505 no modificó la actividad MPO en ninguno de los protocolos por administración de DSS, colitis aguda y establecida. Estos datos nos sugirieron que en ambos tipos de protocolos, la activación de la inmunidad innata generada por macrófagos y neutrófilos siempre está presente, por la continua exposición al agente tóxico (Dieleman y col., 1998) y por la activación directa de este agente sobre los macrófagos (Okayasu y col., 1990).

La administración del UR-1505 (10 y 30 mg/kg) en la fase aguda de la colitis inducida por DSS, no dio lugar a un efecto antiinflamatorio significativo, ya que no se modificaron los parámetros macroscópicos (relación peso/longitud del colon) ni los marcadores bioquímicos de inflamación evaluados (actividad MPO y contenido de GSH) (capítulo 6). Esta falta de eficacia podría ser atribuida a la selectividad del compuesto por las diferentes células inmunológicas implicadas en la respuesta inflamatoria inducida por el DSS. Los estudios *in vitro* llevados a cabo con el UR-1505 muestran la ausencia de efecto inhibitorio sobre la proliferación y activación en macrófagos (capítulo 5). Sin embargo, aunque no hemos analizado a nivel *in vitro* el efecto del UR-1505 sobre neutrófilos, el hecho de que la vía de señalización de NFAT no juegue un papel clave en la activación de estas células (Milkolci y col., 2007), nos hace pensar que el UR-1505 no actúa sobre ellas. Por lo tanto, estos resultados nos sugieren la ausencia de una acción antiinflamatoria directa del compuesto sobre los neutrófilos en la fase aguda de colitis inducida por DSS (capítulo 6), y en el modelo agudo de colitis inducido por TNBS durante 48 horas (datos no mostrados), en el cual también tiene lugar una participación de la inmunidad innata (Chen y col., 2005).

La inhibición específica del UR-1505 sobre la activación de los linfocitos T y B observada en los estudios *in vitro*, nos sugiere que el efecto antiinflamatorio en los modelos de colitis crónica del TNBS y DSS establecida, con disminución de algunos parámetros proinflamatorios principalmente producidos por las células de la inmunidad innata, podría ser debido a un efecto indirecto o colateral por la actuación sobre la inmunidad adaptativa. Esta explicación, sería válida cuando analizamos la enzima iNOS, en los distintos modelos de colitis experimental, ya que la administración del compuesto UR-1505 a las ratas colíticas, fue capaz de inhibir su expresión (capítulo 5 y 6). Esto también se podría justificar por la disminución de la infiltración celular detectada por los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, sobre todo por la reducción de macrófagos, ya que estas células son las principales células que inducen la expresión de este marcador (Neurath y Meyer, 1996). Nos apoyamos en esta teoría porque a nivel *in vitro* el UR-1505 fue incapaz de inhibir iNOS inducida por la activación de LPS o $IFN\gamma$ en macrófagos (capítulo 5). Por otro lado, la inhibición de la iNOS en los animales colíticos estaría en concordancia con la reducción del

estrés oxidativo observado en las ratas colíticas tratadas con UR-1505, ya que se genera menos cantidad de NO.

Sin embargo, cuando analizamos el efecto del UR-1505 sobre la expresión de COX-2 en el modelo de colitis por TNBS y por DSS, obtuvimos resultados dispares. La administración del compuesto a las ratas colíticas en el modelo por TNBS no afectó la expresión de COX-2 en los homogenados de colon (capítulo 5), pero sí lo hizo en el modelo con DSS (capítulo 6). Las diferencias observadas pueden ser debidas al tipo de daño y a la diferente fase del proceso inflamatorio donde se encuentra cada modelo en el momento del sacrificio de los animales. En el modelo con DSS, el estudio se realizó a los 15 días del inicio de la colitis, y en este caso, la intensidad del daño es más progresiva y leve que en el modelo por administración de TNBS. Podría ser que el efecto del UR-1505 sobre la inmunidad adaptativa se haga efectivo entonces, y provoque una disminución indirecta de la inmunidad innata con inhibición de la COX-2. Sin embargo, el daño tisular generado en el modelo del TNBS es muy severo, y sigue siéndolo a los 7 días cuando se produce el sacrificio de los animales, de tal forma que el descenso en la expresión de la enzima COX-2 por la acción indirecta del UR-1505 no llega a ser evidente. Pudimos comprobar *in vitro* que el UR-1505 no afectó la expresión de COX-2 en macrófagos (capítulo 5), aunque no analizamos su acción sobre células epiteliales, fibroblastos o linfocitos, también implicadas en la producción de esta enzima (Chacón y col., 2005; Corral y col., 2007; González-Rey y Delgado, 2008; Gudis y Sakamoto; 2005).

Existen datos enfrentados sobre el papel beneficioso o perjudicial de la activación de la COX-2 en la EII. En algunos casos, se ha comprobado que la expresión de esta enzima y la síntesis de PG, sobre todo de PGE₂, por las células epiteliales y demás células inflamatorias, constituye una respuesta protectora en estas patologías, ya que las PG son potentes estimuladores del crecimiento de las células epiteliales intestinales y se ha demostrado que son esenciales para el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal y el proceso reparador de las lesiones (Tessner y col., 1998). Además, las PG parecen tener un efecto regulador sobre la síntesis de citocinas por parte de los linfocitos y macrófagos en el tejido inflamado, así inhiben la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-12, crucial en la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia el fenotipo Th1 (Van der Pouw Kraan y col., 1996). Sin embargo, otros autores han demostrado como la COX-2 juega un importante papel en el desarrollo de la EII y neoplasias asociadas, por lo que los inhibidores selectivos de esta enzima podrían ser una buena opción terapéutica (El Miedany y col., 2006; Paiotti y col., 2007).

Por otra parte, se obtuvieron resultados muy interesantes cuando se evaluó el efecto del UR-1505 sobre el patrón de citocinas producidas por los linfocitos en ambos modelos. La administración del UR-1505 a los animales colíticos modificó la respuesta Th1 que tiene lugar en la colitis experimental inducida por TNBS, ya que el compuesto inhibió la expresión de IFN γ en los homogenados de colon de los animales colíticos. El IFN γ es una de las principales citocinas producida por los linfocitos T y presenta diversas

funciones, como la estimulación de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de clase I y II y de coestimuladores en las APCs; además, activa a los macrófagos para aumentar su capacidad fagocítica, y favorece la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia la subpoblación Th1, inhibiendo la proliferación de los linfocitos Th2 (Abbas y Lichtman, 2004). Por tanto, la disminución de la expresión de IFN γ por parte del UR-1505 podría estar inhibiendo de forma directa la activación de la respuesta Th1 y puede estar indirectamente afectando a la actividad de macrófagos, contribuyendo así al efecto antiinflamatorio intestinal del compuesto, y contrarrestando la perpetuación del proceso inflamatorio (Kwon y col., 2005). De hecho, estudios anteriores han mostrado que los macrófagos requieren señales mediadas por IFN γ y por TLR4 para el incremento de la producción de NO (Shi y col., 2006). Además, el UR-1505 inhibió *in vivo* el TNF α e IL-1 β en el modelo del TNBS y DSS, citocinas Th1 producidas también por los linfocitos, aunque los macrófagos sean los principales productores. Sin embargo, el UR-1505 *in vitro* es incapaz de inhibir TNF α en macrófagos y linfocitos, pero sí que produce una inhibición de IL-1 β en estos últimos, así que, en este sentido, el compuesto podría estar inhibiendo de forma directa esta citocina por su actuación sobre linfocitos y de forma indirecta por la menor infiltración de macrófagos generada. Estos resultados nos resultaron muy interesantes, ya que el compuesto ha mostrado una actividad antiinflamatoria en modelos de colitis, al igual que otras terapias utilizadas actualmente como tratamiento para la EII, como los anticuerpos frente al IFN γ (fontolizumab) o al TNF α (infliximab) (Hommes y col., 2006; Sandborn y col., 2007).

Se ha observado que las fases más crónicas del proceso inflamatorio en el modelo de DSS se encuentran mediadas por una respuesta Th1/Th2. Nuestros resultados muestran que los niveles de IL-4 en el colon no se ven modificados por el proceso inflamatorio (capítulo 7), como ocurre en la CU (Fuss y col., 1996), y la administración del UR-1505 no tuvo ningún efecto (capítulo 7). No obstante, aunque se observó la capacidad del UR-1505 para inhibir *in vitro* la producción de otras citocinas Th2, como la IL-5 en linfocitos T humanos y de ratón (capítulo 4 y 7), no se pudo analizar la producción de esta citocina en los homogenados colónicos en rata.

Sin embargo, a nivel *in vivo* sí que pudimos medir la implicación de la inmunidad humoral mediada por los linfocitos B. El UR-1505 fue capaz de inhibir la producción de IgG y de restaurar los niveles de IgA en el colon, mejorando así el proceso inflamatorio. La disminución de la producción colónica de IgG se relaciona con la acción *in vitro* del UR-1505, ya que inhibió la proliferación y la activación de células B de bazo estimuladas con LPS, provocando entonces una disminución de IgG (capítulo 7). Sin embargo, el UR-1505 posee un efecto diferente sobre los niveles de IgA *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, el UR-1505 fue capaz de inhibir la producción de IgA en esplenocitos activados con LPS, aunque los niveles de IgA no aumentan de forma significativa respecto a las células B no activadas, ya que los linfocitos B sistémicos no son las principales células productoras de esta IgA. Por otro lado, en el modelo de DSS de fase establecida, se produjo el efecto contrario, el UR-

1505 fue capaz de restablecer los niveles de IgA disminuidos en este modelo (capítulo 7). El aumento de IgA en el colon permite una recuperación del proceso inflamatorio, ya que esta Ig mantiene la homeostasis intestinal y actúa opsonizando y precipitando los antígenos potencialmente patógenos para que no entren a la mucosa (Forbes y col., 2004). Además, se ha demostrado que la inmunodeficiencia de IgA en humanos puede estar asociada con alteraciones inmunológicas como la CU (Brandtzaeg y col., 2006), y que esta Ig ejerce un efecto antiinflamatorio al inhibir la producción de citocinas inducidas por LPS como TNF α e IL-1 β en células monocíticas humanas (Wolf y col., 1994). De hecho, se ha observado la acción antiinflamatoria de algunos compuestos que aumentan las células productoras de IgA en el colon (Furuya y col., 2008; Gobbato y col., 2008).

Un caso parecido a la IgA es lo que sucede con la citocina IL-10. En este caso, el compuesto provocó una inhibición de la producción de la IL-10 en linfocitos T de bazo activados con ConA (capítulo 7), pero por el contrario, el tratamiento con el UR-1505 a ratas colíticas llevó a un incremento de esta citocina hasta niveles basales, permitiendo la recuperación del proceso inflamatorio (capítulo 7). Esto es muy interesante ya que se han utilizado diferentes estrategias para incrementar la producción de IL-10 en los pacientes con EII, como es el caso del *Lactococcus lactis* modificado genéticamente para que exprese IL-10 (Braat y col., 2006).

Los efectos sobre IL-10 e IgA demuestran que el UR-1505 podría ejercer acciones inmunomoduladoras *in vivo* más que actuar como un simple compuesto inmunosupresor, como es el caso de metotrexato, CsA o tacrolimus (Hanauer, 2004). Se ha observado que estos inmunosupresores no poseen efecto en la colitis desarrollada en ratones IL-10 deficientes (Ikenoue y col., 2005) y que tampoco restablecen los niveles de IgA (Murphy y col., 1993), por lo que un compuesto con acción antiinflamatoria que disminuya los parámetros proinflamatorios descontrolados en la EII, pero que además, incremente o restaure los niveles de mediadores antiinflamatorios que participan en la tolerancia oral, será muy beneficioso para una mejora de la enfermedad.

UR-1505, un nuevo salicilato para la enfermedad inflamatoria intestinal

En este capítulo se han intentado integrar todos los resultados y conclusiones, a nivel *in vitro* e *in vivo*, obtenidos en los diferentes estudios presentados en esta Tesis Doctoral para intentar analizarlos en un conjunto (capítulo 4, 5, 6 y 7). Así, hemos demostrado que, a nivel *in vitro*, el UR-1505 es específico de linfocitos T y B. El compuesto da lugar a una disminución de citocinas, tanto Th1 (IFN γ , IL-12, IL-1 β) como Th2 (IL-6, IL-5, IL-10) (capítulo 4, 5 y 6) en linfocitos T y de las inmunoglobulinas IgG y IgA en linfocitos B (capítulo 7), ya que provoca una inhibición de la activación del factor de transcripción NFAT a nivel de la unión al ADN y/o la transactivación. Sin embargo, no afecta a otras células del sistema inmunitario como macrófagos (capítulo 5) y células epiteliales

intestinales (resultados no mostrados). El mecanismo de acción *in vitro* del UR-1505 aporta ventajas frente a algunas terapias de la EII, como la CsA, ya que los diversos efectos adversos de este inmunosupresor (nefrotoxicidad, neurotoxicidad, diabetogenicidad, y toxicidad gastrointestinal) son atribuidos a la inhibición de la calcineurina (Fung y col., 1991; Dumont y col., 1992; Ho y col., 1996). Por otra parte, en los estudios *in vivo*, el UR-1505 ha demostrado un efecto inmunomodulador y antiinflamatorio intestinal en las fases crónicas tanto del modelo de colitis experimental inducido por TNBS como por DSS, por la inhibición directa de la activación de los linfocitos T y atenuando de forma indirecta la activación de la respuesta innata mediada por células como macrófagos y neutrófilos. Además, a diferencia de otros inmunosupresores, presenta la capacidad de aumentar la citocina antiinflamatoria IL-10 y la IgA en los homogenados colónicos, restableciendo así los procesos implicados en el mantenimiento de la tolerancia oral de las mucosas.

El efecto antiinflamatorio ejercido por el UR-1505 sobre la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos T y B, no afecta a ninguna de las dos hipótesis comentadas al inicio de este capítulo, que intentan explicar como podría desencadenarse y cronificarse la EII (Comalada y Peppelenbosch, 2006). Es decir, aunque exista una respuesta exagerada de la inmunidad innata o una respuesta insuficiente de ésta frente a la translocación bacteriana y acumulación de antígenos, en ambas teorías, siempre se desencadena una respuesta adaptativa incontrolada mediada por linfocitos T (Comalada y Peppelenbosch, 2006; Marks y Segal, 2008; Yamamoto-Furusho y Korzenik, 2006). Por esto, el UR-1505 podría considerarse una buena opción terapéutica para la EII, de forma similar a los tratamientos actuales existentes que actúan sobre la inmunidad adaptativa, como puede ser el anti-IFN γ (fontolizumab) o el anti-TNF α (infliximab) (Hommes y col., 2006; Sandborn y col., 2007). Además, el tratamiento con el UR-1505 podría ser efectivo tanto en la EC, ya que actúa sobre las citocinas Th1, como en la UC, porque también modifica la respuesta Th1/Th2 y humoral.

Por último, estos resultados no descartan que este fármaco pueda tener actividad en otras patologías donde los linfocitos poseen también un papel clave, como en el caso de la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria caracterizada por una respuesta de tipo Th1 (Arend, 2001; Feldmann y col., 1996; Yamada y col., 2008) o en patologías alérgicas como la dermatitis atópica, donde se produce una respuesta del tipo Th1/Th2 (Akhavan y Rudikoff, 2003; Biedermann y col., 2004; Kubo y Inoue, 2006).

Referencias

- Abbas** AK y **Lichtman** AH. Inmunología celular y molecular. Madrid: *Elsevier*, **2004**.
- Aceves** M, **Dueñas** A, **Gómez** C, **San Vicente** E, **Crespo** MS, **García-Rodríguez** C. A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *J Immunol* **2004**; 173:5721-5729.
- Akhavan** A, **Rudikoff** D. The treatment of atopic dermatitis with systemic immunosuppressive agents. *Clin Dermatol* **2003**; 21:225-240.
- Alderton** WK, **Cooper** CE, **Knowles** RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **2001**; 357:593-615.
- Allez** M, **Mayer** L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10:666-676.
- Arend** WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **2001**; 45:101-106.
- Bajaj-Elliott** M, **Poulsom** R, **Pender** SL, **Wathen** NC, **MacDonald** TT. Interactions between stromal cell-derived keratinocyte growth factor and epithelial transforming growth factor in immune-mediated crypt cell hyperplasia. *J Clin Invest* **1998**; 102:1473-1480.
- Baklien** K, **Brandtzaeg** P. Comparative mapping of the local distribution of immunoglobulin-containing cells in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Clin Exp Immunol* **1975**; 22:197-209.
- Beals** CR, **Sheridan** CM, **Turck** CW, **Gardner** P, **Crabtree** GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **1997**; 275:1930-1934.
- Becker** C, **Barbulescu** K, **Wirtz** S, **Meyer zum Büschenfelde** KH, **Pettersson** S, **Neurath** MF. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor- α promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr* **1999**; 8:115-127.
- Bell** CJ, **Gall** DG, **Wallace** JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* **1995**; 268:G622-G630.
- Biedermann** T, **Röcken** M, **Carballido** JM. Th1 and Th2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* **2004**; 9:5-14.
- Boirivant** M, **Fuss** IJ, **Chu** A, **Strober** W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* **1998**; 188:1929-1939.
- Braat** H, **Rottiers** P, **Hommes** DW, **Huyghebaert** N, **Remaut** E, **Remon** JP, **van Deventer** SJ, **Neiryck** S, **Peppelenbosch** MP, **Steidler** L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**; 4:754-759.
- Brandtzaeg** P, **Bjerke** K, **Kett** K, **Kvale** D, **Rognum** TO, **Scott** H, **Sollid** LM, **Valnes** K. Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann Allergy* **1987**; 59:21-39.
- Brandtzaeg** P, **Carlsen** HS, **Halstensen** TS. The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* **2006**; 579:149-167.
- Brown** KE, **Brunt** EM, **Heinecke** JW. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am J Pathol* **2001**; 159:2081-2088.
- Caetano** MS, **Vieira-de-Abreu** A, **Teixeira** LK, **Werneck** MB, **Barcinski** MA, **Viola** JP. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* **2002**; 16:1940-1942.

- Camuesco D**, Comalada M, Concha A, Nieto A, Sierra S, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr* **2006**; 25:466-476.
- Camuesco D**, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* **2004**; 143:908-918.
- Camuesco D**, Gálvez J, Nieto A, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, Xaus J, Zarzuelo A. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *J Nutr* **2005**; 135:687-694.
- Cavallini L**, Francesconi MA, Zoccarato F, Alexandre A. Involvement of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation in mitogen-induced lymphocyte proliferation: inhibitory effects of lymphoproliferation by salicylates acting as NF-kappaB inhibitors. *Biochem Pharmacol* **2001**; 62:141-147.
- Cetinkaya A**, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med* **2005**; 206:131-139.
- Chacón P**, Vega A, Monteseirín J, El Bekay R, Alba G, Pérez-Formoso JL, Msartínez A, Asturias JA, Pérez-Cano R, Sobrino F, Conde J. Induction of cyclooxygenase-2 expression by allergens in lymphocytes from allergic patients. *Eur J Immunol* **2005**; 35:2313-2324.
- Chae HJ**, Chae SW, Reed JC, Kim HR. Salicylate regulates COX-2 expression through ERK and subsequent NF-kappaB activation in osteoblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2004**; 26:75-91.
- Chen K**, Long YM, Wang H, Lan L, Lin ZH. Activation of nuclear factor-kappa B and effects of pyrrolidine dithiocarbamate on TNBS-induced rat colitis. *World J Gastroenterol* **2005**; 11:1508-1514.
- Choi MS**, Brines RD, Holman MJ, Klaus GG. Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* **1994**; 1:179-187.
- Chow CW**, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **1997**; 278:1638-1641.
- Coleman JW**. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* **2001**; 1:1397-406.
- Comalada M**, Camuesco D, Sierra S, Ballester J, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* **2005**; 35:584-592.
- Comalada M**, Peppelenbosch MP. Impaired innate immunity in Crohn's disease. *Trends Mol Med* **2006**; 12:397-399.
- Comalada M**, Valledor AF, Sanchez-Tilló E, Umberto I, Xaus J, Celada A. Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *Eur J Immunol* **2003**; 33:3091-3100.
- Corral RS**, Iñiguez MA, Duque J, López-Pérez R, Fresno M. Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. *Oncogene* **2007**; 26:958-969.
- Egger B**, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*

2000; 62:240-248.

Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* **1997**; 158:566-573.

El Miedany Y, Youssef S, Ahmed I, El Gaafary M. The gastrointestinal safety and effect on disease activity of etoricoxib, a selective cox-2 inhibitor in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* **2006**; 101:311-317.

De Gregorio R, Iñiguez MA, Fresno M, Alemany S. Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem* **2001**; 276:27003-27009.

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* **1998**; 114:385-391.

Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyvratt M, et al. The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J Exp Med* **1992**; 176:751-760.

Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* **2003**; 3:63-72.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* **1996**; 14:397-440.

Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* **2004**; 172:5664-5675.

Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT. Cox-2 is

regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* **2006**; 131:862-877.

Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Van Thiel D, Armitage J, Jain A, McCauley J, et al. Adverse effects associated with the use of FK 506. *Transplant Proc* **1991**; 23:3105-3108.

Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut* **2004**; 53:91-98.

Furuya H, Ohkawara S, Nagashima K, Asanuma N, Hino T. Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int J Vitam Nutr Res* **2008**; 78:41-49.

Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* **2002**; 168:900-908.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. 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**; 157:1261-1270.

Gálvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* **2000**; 130:1949-1959.

Gálvez J, Garrido M, Rodríguez-Cabezas ME, Ramis I, de Medina FS, Merlos M, Zarzuelo A. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm Bowel Dis* **2003**; 9:363-371.

García-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N. Resident cell

chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* **2002**; 169:6467-6473.

Gobbato N, Rachid M, Perdigón G. Anti-inflammatory effect of yoghurt in an experimental inflammatory bowel disease in mouse. *J Dairy Res* **2008**; 75:497-504.

Gonzalez-Rey E, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells. *Brain Behav Immun* **2008**; 22:35-41.

Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **2007**; 178:3107-3115.

Gudis K, Sakamoto C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Dig Dis Sci* **2005**; 1:S16-23.

Hanauer SB. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* **2004**; 126:1582-1592.

Heidt S, Roelen DL, Eijnsink C, van Kooten C, Claas FH, Mulder A. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation* **2008**; 86:1292-1300.

Hibi T, Ohara M, Toda KK, Hara A, Ogata H, Iwao Y, Watanabe N, Watanabe M, Hamada Y, Kobayashi K, Aiso S, Tsuchiya M. In vitro anticolon antibody production by mucosal or peripheral blood lymphocytes from patients with ulcerative colitis. *Gut* **1990**; 31:1371-1376.

Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* **1996**; 80:S40-S45.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium,

calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* **2003**; 17:2205-2232.

Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zákuciová M, D'Haens G, Van Asshe G, Ba S, Lee S, Pearce T. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* **2006**; 55:1131-1137.

Ikenoue Y, Tagami T, Murata M. Development and validation of a novel IL-10 deficient cell transfer model for colitis. *Int Immunopharmacol* **2005**; 5:993-1006.

Ina K, Itoh J, Fukushima K et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* **1999**; 163:1081-1090.

Iñiguez MA, Punzón C, Fresno M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol* **1999**; 163:111-119.

Kawaguchi S. Signals through membrane Ig of peritoneal CD5 B cells to suppress LPS-induced Ig secretion. *Cell Immunol* **1994**; 159:49-60.

Kiani A, Rao A, Aramburu J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* **2000**; 12:359-372.

Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, Haruma K, Tamaru T, Kajiyama G, Miyoshi A. Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis. *Dig Dis Sci* **1992**; 37:1729-1737.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* **2005**; 77:598-625.

Klotz U. The role of aminosalicylates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Pharmacol* **2000**; 56:353-362.

- Kubo M**, Inoue H. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia. *Curr Allergy Asthma Rep* **2006**; 6:32-39.
- Kühn R**, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **1993**; 75:263-274.
- Kullmann F**, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Schölmerich J, Rüschoff J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* **2001**; 16:238-246.
- Kumar S**, Skeen MJ, Adiri Y, Yoon H, Vezys VD, Lukacher AE, Evavold BD, Ziegler HK, Boss JM. A cytokine promoter/yellow fluorescent protein reporter transgene serves as an early activation marker of lymphocyte subsets. *Cell Immunol* **2005**; 237:131-140.
- Kwon KH**, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**; 337:647-654.
- Lampinen M**, Sangfelt P, Taha Y, Carlson M. Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. *Int J Colorectal Dis* **2008**; 23:939-946.
- Lara-Villoslada F**, de Haro O, Camuesco D, Comalada M, Velasco J, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. *Eur J Nutr* **2006**; 45:418-425.
- Lee HJ**, Masuda ES, Arai N, Arai K, Yokota T. Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J Biol Chem* **1995**; 270:17541-17550.
- Liptay S**, Bachem M, Hacker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol* **1999**; 128:1361-1369.
- MacDermott RP**. Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95:3343-3345.
- Macian F**. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **2005**; 5:472-484.
- Macián F**, López-Rodríguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **2001**; 20:2476-2489.
- Mannon PJ**, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's disease study group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **2004**; 351:2069-2079.
- Marks DJ**, Segal AW. Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *J Pathol* **2008**; 214:260-266.
- Mättö M**, Raunio AR, Postila V, Huttunen K, Hirvonen MR, Pelkonen J. Human B cells and macrophages cooperate in T-cell-independent type 2 response. *Scand J Immunol* **2008**; 67:209-217.
- Meenan J**, Hommes DW, Mevissen M, Dijkhuizen S, Soule H, Moyle M, Büller HR, ten Kate FW, Tytgat GN, van Deventer SJ. Attenuation of the inflammatory response in an animal colitis model by neutrophil inhibitory factor, a novel beta 2-integrin antagonist. *Scand J Gastroenterol* **1996**; 31:786-791.
- Meyer S**, Kohler NG, Joly A. Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett* **1997**; 413:354-358.

- Miskolci V**, Rollins J, Vu HY, Ghosh CC, Davidson D, Vancurova I. NFkappaB is persistently activated in continuously stimulated human neutrophils. *Mol Med* **2007**; 13:134-142.
- Minguet S**, Dopfer EP, Pollmer C, Freudenberg MA, Galanos C, Reth M, Huber M, Schamel WW. Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol* **2008**; 38:2475-2487.
- Miralles-Barrachina O**, Savoye G, Belmonte-Zalar L, Hochain P, Ducrotté P, Hecketsweiler B, Lerebours E, Déchelotte P. Low levels of glutathione in endoscopic biopsies of patients with Crohn's colitis: the role of malnutrition. *Clin Nutr* **1999**; 18:313-317.
- Mizoguchi A**, Mizoguchi E, Bhan AK. The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* **1999**; 116:320-326.
- Mohapatra S**, Agrawal D, and Pledger WJ. p27KIP1 regulates T cell proliferation. *J Biol Chem* **2001**; 276:21976-21983.
- Mondino A**, Jenkins MK. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J Leukoc Biol* **1994**; 55:805-815.
- Monteleone I**, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* **2002**; 50:III60-III64.
- Murphy EA**, Morris AJ, Walker E, Lee FD, Sturrock RD. Cyclosporine A induced colitis and acquired selective IgA deficiency in a patient with juvenile chronic arthritis. *J Rheumatol* **1993**; 20:1397-1398.
- Naito Y**, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr* **2007**; 41:18-26.
- Neurath MF**, Meyer zum Büschenfelde KH. Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. *J Investig Med* **1996**; 44:516-521.
- Núñez L**, Valero RA, Senovilla L, Sanz-Blasco S, García-Sancho J, Villalobos C. Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate. *J Physiol* **2006**; 571:57-73.
- Ohkawara T**, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* **2002**; 123:256-270.
- Ohnishi H**, Miyahara N, Gelfand EW. The Role of Leukotriene B(4) in Allergic Diseases. *Allergol Int* **2008**; 57. Epub ahead of print.
- Okamura H**, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* **2000**; 6:539-550.
- Okayasu I**, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **1990**; 98:694-702.
- Onuma EK**, Amenta PS, Ramaswamy K, Lin JJ, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): a predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5. *Clin Exp Immunol* **2000**; 121:466-471.
- Ortega-Pérez I**, Cano E, Were F, Villar M, Vázquez J, Redondo JM. c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* **2005**; 280:20867-20878.
- Paccani SR**, Boncristiano M, Ulivieri C, D'Elis MM, Del Prete G, Baldari CT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress T-cell activation by inhibiting p38 MAPK induction. *J Biol Chem*

2002; 277:1509-1513.

Paiotti AP, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CT, Miszputen SJ, Franco M. Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:911-918.

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

Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 2001; 14:13-20.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J Appl Microbiol* 2007a; 103:836-844.

Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr* 2007b; 97:96-103.

Qualls JE, Tuna H, Kaplan AM, Cohen DA. Suppression of experimental colitis in mice by CD11c(+) dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct 6. Epub ahead of print.

Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995; 36:718-723.

Rainio EM, Sandholm J, Koskinen PJ. Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol* 2002;

168:1524-1527.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:707-747.

Ritter M, Hohenberger K, Alter P, Herzum M, Tebbe J, Maisch M. Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. *Cytokine* 2005; 30:177-81.

Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22:382-389.

Rüthlein J, Ibe M, Burghardt W, Mössner J, Auer IO. Immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2 determinations from endoscopic biopsy specimens in control, Crohn's disease, and ulcerative colitis subjects. *Gut* 1992; 33:507-512.

Sánchez-Valdepeñas C, Martín AG, Ramakrishnan P, Wallach D, Fresno M. NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity. *J Immunol* 2006; 176:4666-4674.

Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, Rosenfeld MR, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab induction therapy for Crohn's disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146:829-838.

Sandborn WJ, Tremaine WJ. Cyclosporine treatment of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1992; 67:981-990.

Scott MG, Nahm MH, Macke K, Nash GS, Bertovich MJ, MacDermott RP. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. *Clin Exp Immunol* 1986; 66:209-215.

Shi D, Das J, Das G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res* 2006; 16:70-74.

- Sido B**, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **1998**; 42:485-492.
- So EY**, Oh J, Jang JY, Kim JH, Lee CE. Ras/Erk pathway positively regulates Jak1/STAT6 activity and IL-4 gene expression in Jurkat T cells. *Mol Immunol* **2007**; 44:3416-3426.
- Stein RB**, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* **2000**; 23:429-448.
- Stevceva L**, Pavli P, Husband A, Matthaei KI, Young IG, Doe WF. Eosinophilia is attenuated in experimental colitis induced in IL-5 deficient mice. *Genes Immun* **2000**; 1:213-218.
- Strober W**, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **2002**; 20:495-549.
- Sturm A**, de Souza HS, Fiocchi C. Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets* **2008**; 9:381-387.
- Ten Hove T**, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **2002**; 50:206-211.
- Tessner TG**, Cohn SM, Schloemann S, Stenson WF. Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. *Gastroenterology* **1998**; 115:874-882.
- Tromm A**, Griga T, May B. Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties. *Hepatogastroenterology* **1999**; 46:3124-3135.
- Van der Pouw Kraan TC**, Boeije LC, Snijders A, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Regulation of IL-12 production by human monocytes and the influence of prostaglandin E2. *Ann N Y Acad Sci* **1996**; 795:147-157.
- Venkataraman L**, Francis DA, Wang Z, Liu J, Rothstein TL, Sen R. Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells. *Immunity* **1994**; 1: 189-196.
- Wadleigh DJ**, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* **2000**; 275:6259-6566.
- Williamson SI**, Wannemuehler MJ, Jirillo E, Pritchard DG, Michalek SM, McGhee JR. LPS regulation of the immune response: separate mechanisms for murine B cell activation by lipid A (direct) and polysaccharide (macrophage-dependent) derived from *Bacteroides* LPS. *J Immunol* **1984**; 133:2294-2300.
- Wirtz S**, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. 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**; 162:1884-1888.
- Wolf HM**, Fischer MB, Pühringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. *Blood* **1994**; 83:1278-1288.
- Woywodt A**, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1999**; 11:267-276.
- Xaus J**, Comalada M, Cardó M, Valledor AF, Celada A. Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood* **2001**; 98:2124-2133.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardó M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* **2001**; 204:543-550.

Xu Y, Hunt NH, Bao S. The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Res* **2008**; 18:1220-1229.

Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y, Yoshikai Y. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2008**; 67:1299-1304.

Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol* **2006**; 12:6751-6755.

Yamashita M, Katsumata M, Iwashima M, Kimura M, Shimizu C, Kamata T, Shin T, Seki N, Suzuki S, Taniguchi M, Nakayama T. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J Exp Med* **2000**; 191:1869-1879.



Conclusiones

Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral se resumen en los siguientes puntos:

- ✘ El UR-1505 es un inhibidor específico de linfocitos T y B, ya que da lugar a una disminución de la proliferación y de la producción de citocinas, tanto Th1 como Th2 en linfocitos T y de las inmunoglobulinas IgG e IgA en linfocitos B. Sin embargo, no afecta a otras células del sistema inmunitario como macrófagos.
- ✘ La acción del UR-1505 sobre los linfocitos T activados se debe a la inhibición de la activación del factor de transcripción NFAT a nivel de la unión al ADN y/o la transactivación, sin afectar a otros factores de transcripción como NFκB o AP-1.
- ✘ El UR-1505 ha demostrado un efecto antiinflamatorio intestinal en las fases crónicas tanto del modelo de colitis experimental inducido por TNBS como por DSS, sin modificar el proceso inflamatorio en las fases agudas de dichos modelos. El efecto beneficioso del compuesto en las fases crónicas de la inflamación intestinal se debe a la inhibición directa de la activación de los linfocitos T y a la atenuación indirecta de la respuesta innata mediada por células como macrófagos y neutrófilos.
- ✘ Por último, el UR-1505 también presenta un efecto inmunomodulador, por su capacidad de aumentar la citocina antiinflamatoria IL-10 y la IgA en los homogenados colónicos en la fase crónica del modelo de colitis experimental inducido por DSS.



Abreviaturas

ADN	Ácido deoxirribonucleico
AINEs	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
AOM	Azoximetano
AP-1	Proteína activadora-1, <i>activator protein 1</i>
APC	Célula presentadora de antígenos, <i>antigen-presenting cell</i>
ARE	Elementos repetidos ricos en adenina/uracilo, <i>adenine/uracil-rich element</i>
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido salicílico
5-ASA	Ácido aminosalicílico
ATP	Adenosín trifosfato, <i>adenosine-5'-triphosphate</i>
BCR	Receptor de células B, <i>B cells receptor</i>
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea, <i>bone marrow-derived macrophage</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas, <i>caspase activation and recruitment domains</i>
Cdk	Proteína kinasa dependiente de ciclinas, <i>cyclin-dependent kinase</i>
CK-1	Caseína kinasa-1, <i>casein kinase 1</i>
ConA	Concanavalina A
CotK	Cot kinasa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CsA	Ciclosporina A
CU	Colitis ulcerosa
DC	Célula dendrítica, <i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSS	Sulfato de dextrano sódico, <i>dextran sodium sulfate</i>
DTH	Reacción de hipersensibilidad retardada, <i>delayed-type hypersensitivity</i>
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético, <i>ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic</i>
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, <i>enzyme-linked immunosorbent</i>

	<i>assay</i>
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética, <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	Células activadas por fluorescencia, <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Suero fetal bovino, <i>fetal bovine serum</i>
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
GlyCAM-1	Molécula de adhesión celular portadora dependiente de glicosilación 1, <i>Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1</i>
GSH	Glutation
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa-3, <i>glycogen synthase kinase 3</i>
HTB	Ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1, <i>intercellular adhesion molecule 1</i> .
IDM	Índice de daño macroscópico
IFN γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible, <i>inducible nitric oxide sintase</i>
Io	Ionomicina
JAK	Janus tirosina quinasa, <i>Janus tyrosine kinase</i>
JNK	c-Jun N-terminal quinasa, <i>c-jun N-terminal kinase</i>
KLH	Dinitrofenil-hemocianina, <i>keyhole hemocyanin</i>
KO	<i>Knock out</i>
LFA-1	Antígeno asociado a la función leucocítica 1, <i>leukocyte-function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MAdCAM-1	Molécula de adhesión celular adresina 1, <i>mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos, <i>monocyte chemoattractant protein</i>
M-CSF	Factor de crecimiento específico de macrófagos, <i>macrophage colony-</i>

	<i>stimulating factor</i>
MDR1	Gen de multiresistencia a fármacos, <i>Multidrug resistance 1</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, <i>major histocompatibility complex</i>
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófagos 1, <i>macrophage inflammatory protein 1</i>
MPO	Enzima mieloperoxidasa
NFAT	Factor nuclear de linfocitos T activados, <i>nuclear factor of activated T-lymphocytes</i>
NFκB	Factor de transcripción nuclear κB, <i>nuclear factor κB</i>
NK	Célula asesina natural, <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico, <i>nitric oxide</i>
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos, <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
p300	Histona acetiltransferasa
PAF	Factor activador de plaquetas, <i>platelet activating factor</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos, <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Solución salina tamponada con fosfato, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>polymerase chain reaction</i>
PD98059	Inhibidor de la quinasa quinasa activada por mitógenos-1 (MEK, <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>), inhibidor de la proliferación de macrófagos
PG	Prostaglandina
PGP	P-glicoproteína
PG-PS	Peptidoglicano-polisacárido
Pim-1K	Pim-1 quinasa
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato, <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas, <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRRs	Receptores reconocedores de patrones bacterianos, <i>pattern recognition receptors</i>
Rh	Recombinante humano, <i>recombinant human</i>
RT	Transcripción inversa, <i>reverse transcription</i>
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa, <i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida

STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción, <i>signal transducers and activator of transcription</i>
TBS	Solución salina tamponada con Tris, <i>Tris buffered saline</i>
TCR	Receptor de células T, <i>T cells receptor</i>
Tg	Transgénico
TGF β	Factor de crecimiento transformante β , <i>transforming growth factor β</i>
Th	Linfocito T colaborador, <i>T helper</i>
TLR	Receptores de tipo Toll, <i>toll-like receptors</i>
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico, <i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α , <i>tumor necrosis factor α</i>
Tr	Linfocito T regulador
TX	Tromboxanos
UR-1505	Ácido 2-hidroxi-4-(2, 2 ,3 ,3 ,3-pentafluoropropoxi)-benzoico
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	Antígeno de activación tardía 4, <i>Very late activation antigen 4</i>



Esquema de células



Antígenos



Célula dendrítica



Célula epitelial intestinal



Célula M



Fibroblasto



Linfocito



Linfocito B y anticuerpos



Macrófago



Mastocito



Neutrófilo



Anexo

El trabajo desarrollado en el grupo de investigación “*Farmacología de Productos Naturales*” del departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, me ha permitido desarrollar esta Tesis Doctoral con el compuesto UR-1505. En paralelo, he podido colaborar en otros proyectos de investigación, cuyos resultados han sido también publicados en prestigiosas revistas científicas, citadas a continuación. A su vez, he podido asistir a diversos congresos y cursos.

Publicaciones científicas:

Artículos:

- 1.- Arribas B, Elena Rodríguez-Cabezas M, Comalada M, **Bailón E**, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. **Br J Nutr.** 29:1-8. 2008.
- 2.- Perán L, Camuesco D, Comalada M, **Bailón E**, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. **J Appl Microbiol.** 103: 836-844. 2007.
- 3.- Perán L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, **Bailón E**, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid modelo f rat colitis. **Br J Nutr.** 97: 96-103. 2007.
- 4.- Comalada M, Ballester I, **Bailón E**, Sierra S, Xaus J, Galvez J, de Medina FS, Zarzuelo A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived Mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: análisis of the structure-activity relationship. . **Biochem Pharmacol.** 72: 1010-1021. 2006.
- 5.- Comalada M, **Bailón E**, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. The effects of short chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. **J Cancer Res Clin Oncol.** 132: 487-497. 2006.

Abstracts

- 1.- Gálvez J, Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, **Bailón E**, Comalada M, Camuesco D, Xaus J, Zarzuelo A. Immunomodulatory properties of *Lactobacillus salivarius* are not limited to the intestine. **Proc Nutr Soc.** 2008.

2.- Rodríguez-Cabezas ME, Fisac F, **Bailón E**, Comalada M, Camuesco D, Xaus J, Concha A, Talavera P, Nieto A, Zarzuelo A, Galvez J. Lactobacillus fermentum exerts a beneficial effect in an experimental model of rheumatoid arthritis in mice. Proc Nutr Soc. **2008**.

Capítulos de libro:

1.- Aula de la Farmacia. Revista Profesional de Formación continuada. Curso de Formación en medicamentos publicitarios para Farmacéuticos. Módulo 5: Uso de Medicamentos Publicitarios en patologías digestivas, tema 2: Mareo cinético. Diarrea aguda. Volumen 3, número 41, Octubre 2007.

Congresos:

Comunicaciones orales:

1.- **Bailón E**, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arribas B, Román, Balsa D, Merlos M, Zarzuelo A, Comalada M, Gálvez J. La actividad antiinflamatoria intestinal de la dersenazina sódica en el modelo de colitis experimental en rata por TNBS se asocia con una modificación de la respuesta inmunológica alterada. LXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología digestiva. Sitges (Barcelona). **2008**.

Póster:

1.- Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arribas B, **Bailón E**, Comalada M, Garrido N, Balsa D, Román J, Merlos M, Zarzuelo A. The intestinal antiinflammatory activity of dersenazine sodium in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis is associated with the modulation of the altered immune response involving downregulation of IL-17 expression. 16th UEGW Viena, 08. Publicación: vol. 57 (Suppl II), A334. Viena. **2008**.

2.- Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arribas B, Garrido N, **Bailón E**, Comalada M, Adalid J, Navarro A, Zarzuelo A. Evaluation of the synergism of oligosaccharides (Beneo-P95) and resistant dextrin (Fibersol-2) in the intestinal antiinflammatory activity in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. 16th UEGW Viena, 08. Publicación: vol. 57 (Suppl II), A334. Viena. **2008**.

3.- Zarzuelo A, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arribas B, Garrido N, **Bailón E**, Comalada M, Adalid J, Tabuenca D, Gálvez J. Evaluation of the synergism of oligosaccharides (Beneo-P95) and resistant dextrin (Fibersol-2) in their prebiotic effect in rats. 16th UEGW Viena, 08. Publicación: vol. 57 (Suppl II), A349. Viena. **2008**.

- 4.- **Bailón E**, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, Arriba B, Comalada M, Garrido N, Román J, Balsa D, Merlos M, Zarzuelo A, Gálvez J. Dersalazine sodium downregulates IL-17 expression in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. XXX Congreso de la Sociedad Española de Farmacología (SEF). Publicación: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*; 30(2): 129. Bilbao. **2008**.
- 5.- Comalada M, Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, **Bailón E**, Camuesco D, Zarzuelo A, Gálvez J. Modulation of the immune response with the probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 in LPS-induced septic shock in mice. XXX Congreso de la Sociedad Española de Farmacología (SEF). Publicación: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*; 30(2): 130. Bilbao. **2008**.
- 6.- **Bailón E**, Rodríguez-Cabezas ME, Salcedo I, Cueto M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J, Comalada M. El efecto antiinflamatorio intestinal del butirato in vitro está mediado por una inducción de la apoptosis dependiente del estado proliferativo de las células inflamatorias. LXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología digestiva. Publicación: *Revista Española de Enfermedades Digestivas*; 100(1): 47-48. Sitges (Barcelona). **2008**. Ganador de la mejor comunicación en forma de póster en dicho Congreso.
- 7.- Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, **Bailón E**, Comalada M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Efecto sobre la respuesta inmunitaria del probiótico *Lactobacillus fermentum* en el shock séptico inducido en ratones con LPS. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada (SENBA). Publicación: *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*; 27(2): 98. Bilbao. **2007**.
- 8.- Gálvez J, Arribas B, Rodríguez-Cabezas ME, **Bailón E**, Comalada M, Camuesco D, Xaus J, Zarzuelo A. The immunomodulatory properties of *Lactobacillus salivarius* are not limited to the intestine. 1st Internacional Immunonutrition Workshop. Publicación: *Abstract Book*; p. 70. Valencia (España). **2007**.
- 9.- Rodríguez-Cabezas ME, Fisac F, **Bailón E**, Comalada M, Camuesco D, Xaus J, Concha A, Talavera P, Nieto A, Zarzuelo A, Galvez J. *Lactobacillus fermentum* exerts a beneficial effect in an experimental model of rheumatoid arthritis in mice. 1st Internacional Immunonutrition Workshop. Publicación: *Abstract Book*; p. 99. Valencia (España). **2007**.
- 10.- Gálvez J, Haro O, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, **Bailón E**, Camuesco D, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A. The prebiotic properties of rice bran are involved in its intestinal anti-inflammatory activity. 4th Meeting of Probiotics, Prebiotics and New Foods. Publicación: *Giornale dell'Alimentazione e Patologie Correlate*; 3(2): 73-74. Roma (Italia). **2007**.

- 11.- Gálvez J, Perán L, Rodríguez-Cabezas ME, Comalada M, **Bailón E**, Camuesco D, Arribas B, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A. The viability of *Lactobacillus fermentum* is not essential in its intestinal anti-inflammatory activity in the TNBS model of rat colitis. 4th Meeting of Probiotics, Prebiotics and New Foods. Publicación: *Giornale dell'Alimentazione e Patologie Correlate*; 3(2): 73-74. Roma (Italia). **2007**.
- 12.- Gálvez J, Perán L, Rodríguez-Cabezas ME, Comalada M, **Bailón E**, Camuesco D, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A. La viabilidad de *Lactobacillus fermentum* no es indispensable en su actividad antiinflamatoria intestinal. LXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología digestiva. Publicación: *Revista Española de Enfermedades Digestivas*; 99(1): 48-49. Madrid. **2007**.
- 13.- Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Camuesco D, **Bailón E**, Arribas B, Comalada M, Talavera P, Concha A, Zarzuelo A. Efecto antiinflamatorio intestinal de la minociclina en el modelo de colitis experimental por TNBS en rata. LXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Patología digestiva. Publicación: *Revista Española de Enfermedades Digestivas*; 99(1): 49. Madrid. **2007**.
- 14.- Zarzuelo A, **Bailón E**, Comalada M, Fernández de Arriba A, Ramis I, Gálvez J. The new immunomodulator UR-1505 selectively inhibits murine lymphocyte activation. Falk Symposium No. 154: Inflammatory Bowel Disease-Diagnostic and Therapeutic Strategies. Publicación: *Abstract Book p. 10*. Moscú (Rusia). **2006**.
- 15.- Fernández de Arriba A, Ramis I, **Bailón E**, Comalada M, Galvez J, Zarzuelo A, Merlos M. UR-1505, a new immunomodulator, inhibits lymphocyte proliferation and cytokine production. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Publicación: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*; 27(2): 151. Gerona (España). **2005**.
- 16.- Comalada M, de Haro O, Camuesco D, **Bailón E**, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Intestinal anti-inflammatory effect of short chain fructo-oligosaccharides (SC-FOS) administration in the TNBS model of rat colitis. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Publicación: *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*; 27(2): 156. Gerona (España). **2005**.

Cursos:

Curso "Principios Generales de Citometría de Flujo y sus Aplicaciones". Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid-Sistema Nacional de Salud, Madrid, España. (2007). 44 horas.

Que la fuerza te acompañe...

