

**Función de la fosfatasa alcalina no
específica de tejido en la pancreatitis
aguda experimental y en la
activación de los macrófagos**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

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



**Función de la fosfatasa alcalina no específica de
tejido en la pancreatitis aguda experimental y en la
activación de los macrófagos**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

María de los Reyes Gámez Belmonte

Bajo la dirección de los Doctores

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

Granada, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Reyes Gámez Belmonte
ISBN: 978-84-1306-130-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54978>

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

En Granada a 20 de Septiembre de 2018

Directores de la Tesis

Fdo.: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Fdo.: Olga Martínez Augustin

Doctoranda

Fdo.: María de los Reyes Gámez Belmonte

Dña. Pilar Utrilla Navarro, Directora del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, certifica que la tesis doctoral titulada: "Función de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en la pancreatitis aguda experimental y en la activación de los macrófagos", ha sido realizada por la Lda. en Farmacia María de los Reyes Gámez Belmonte.

Y a los efectos legales que correspondan se firma la siguiente constancia en Granada a 20 de Septiembre de 2018

Fdo.: Pilar Utrilla Navarro

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	9
SUMMARY	6
1. INTRODUCTION	19
2. AIMS	20
3. MATERIAL AND METHODS	20
4. RESULTS AND DISCUSSION	21
5. CONCLUSIONS	23
INTRODUCCIÓN	25
1. FOSFATASA ALCALINA	27
1.1. Generalidades	27
1.2. Genética	27
1.2.1 Genes de fosfatasa alcalina	27
1.2.2 Expresión génica y factores de transcripción.....	29
1.3. Estructura	31
1.4. Propiedades enzimáticas	33
1.4.1. Especificidad de sustratos	33
1.4.2. Inhibición enzimática	34
1.4.3. Termoestabilidad	34
1.5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)	35
1.6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).....	37
1.7. Perspectivas en la utilización farmacológica de la AP	42
1.8. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina.....	43
1.9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP	44
2. SISTEMA INMUNOLÓGICO	46
2.1. Respuesta inmune innata	46
2.1.1. Monocitos.....	48

2.1.2. Macrófagos.....	50
2.1.2.1. Activación y polarización de macrófagos	51
2.1.3. Neutrófilos	55
3. PANCREATITIS AGUDA	60
3.1 Generalidades	60
4.2. Patogénesis de la pancreatitis aguda.....	63
4.4. Modelos animales de pancreatitis aguda.....	68
4. SEPSIS	70
4.1. Generalidades	70
4.2. Etiología	74
4.3. Patogénesis	74
4.3.1. Inmunología de la sepsis	77
4.4 Modelos animales de sepsis.....	83
OBJETIVOS	87
MATERIAL Y MÉTODOS	91
1. REACTIVOS	93
2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	93
2.1. Animales de experimentación.....	93
2.2. Estimulación de macrófagos <i>in vivo</i> mediante LPS.....	94
2.3. Inducción de pancreatitis aguda por administración intraperitoneal de ceruleína.....	94
2.4. Evaluación patológica de los modelos <i>in vivo</i>	96
2.4.1. Necropsia del páncreas.....	96
2.4.2. Estudio histológico	96
2.4.3. Análisis sanguíneo general.....	98
2.4.4. Obtención del plasma sanguíneo.....	98
2.4.5. Determinación de glucosa en sangre	98
2.4.6. Determinación de la temperatura.....	98

3. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	99
3.1. Diseño experimental <i>ex vivo</i>	99
3.2. Aislamiento de células acinares	99
3.3. Obtención de organoides de yeyuno de ratón	100
3.4. Obtención de macrófagos del bazo	101
3.5. Obtención de macrófagos intraperitoneales	102
3.6. Obtención de macrófagos procedentes de médula ósea	103
3.7. Aislamiento de neutrófilos de la médula ósea	104
3.8. Cultivo celular	104
3.9. Ensayo de diferenciación de monocitos/macrófagos hacia M1 y M2	105
3.10. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada	106
4. TÉCNICAS GENERALES	107
4.1. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en distintos tejidos/células y actividad mieloperoxidasa en colon	107
4.2. Ensayo de toxicidad por ensayo de MTT	107
4.3. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular, en plasma y en homogenado de páncreas mediante ELISA	108
4.4. Extracción y cuantificación del contenido proteico	108
4.5. Western Blot	108
4.6. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción	109
4.7. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	109
4.8. Citometría de flujo	110
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	111
RESULTADOS	115
1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN UN MODELO DE PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA	117
2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA EN UN MODELO DE SEPSIS/ENDOTOXEMIA	133

3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA TNAP EN LOS MACRÓFAGOS DE BAZO, CAVIDAD PERITONEAL Y MÉDULA ÓSEA	150
3.1. Estudio de la TNAP en la proliferación de macrófagos	150
3.2. Estudio de la TNAP en la producción de citoquinas de macrófagos	150
3.3. Estudio de la inhibición de TNAP en la función de los macrófagos	153
DISCUSIÓN	159
CONCLUSIONES	175
CONCLUSIONS	179
ANEXOS	183
1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	185
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	189
3. INDICE DE ESQUEMAS	191
4. ÍNDICE DE FIGURAS.....	193
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	195

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Alkaline phosphatases are a large family of enzymes distributed from bacteria to man that cleave phosphate moieties with release of inorganic phosphate at alkaline pH. In humans, the alkaline phosphatases are divided into two groups: tissue specific enzymes, including the intestinal (IAP), the placental and the germ cell isoenzymes; and the tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) isoforms. The ALPL gene in turn gives rise to three different enzymes variants that differ only in the glycosidic fraction, namely the liver, bone and kidney isoforms, which are predominantly found in these organs [1].

TNAP is widely known for its role in bone/teeth development. TNAP gene mutations lead to hypophosphatasia [2, 3]. In the liver, TNAP inhibits bile secretion and is increased in cholestasis [4]. Furthermore, TNAP has been shown to be crucial in axonal growth, neuron proliferation and differentiation [5, 6]. On the other hand, some evidences point to a neurotoxic effect of TNAP, as it dephosphorylates dephosphorylated tau protein, a key player in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases [7].

The intestine of the adult mouse mainly expresses IAP, although TNAP can also be detected in the small intestine and in a greatest extent in colon. IAP is one of the best characterized isoforms. It is involved in intestinal homeostasis, controlling lipid absorption [8] and bicarbonate secretion [9, 10], limiting bacterial translocation across the mucosal barrier and attenuating lipopolysaccharide (LPS)-mediated toxicity and inflammation [4, 11, 12]. IAP also avoids dysbiosis and bacterial infection [13]. In addition, both endogenous and orally supplemented IAP may protect against metabolic syndrome [14].

Our group has described an augmented expression of colonic TNAP in models of inflammatory bowel disease, due both to the influx of leukocytes into the inflamed colonic tissue and to enhanced expression in epithelial cells [15-17]. In colonic epithelial cells, a possible protective role is associated to the observed modification of the pattern of glycosylation, from liver type TNAP in quiescent conditions to bone or kidney isoform after inflammation. [17]. TNAP has also been shown to affect glucose metabolism and insulin sensitivity through adipokine production [18].

Acute pancreatitis is among the most common gastrointestinal disorders requiring acute hospitalization [19]. The illness typically develops as a mild and

self-limiting disease (80%) but it may present as a rapidly progressive and even fulminant course with substantial mortality risk [20]. Acute pancreatitis can be caused by a variety of harmful stimuli such as gallstones, alcohol, and mutations in the trypsinogen gene [21]. This disease involves premature digestive enzyme activation and pancreatic autophagy with subsequent acinar cells damage [22, 23], resulting in the recruitment of immune cells. Immune cells involved in the inflammatory response in acute pancreatitis are the pancreatic acinar cells, endothelial cells, lymphocytes, monocytes/macrophages and neutrophils [24]. The latter are the first-line cells that are recruited into pancreatic interstitial space, followed by monocytes [22, 25]. Furthermore, changes in the intestinal permeability have been reported in both animal models of acute pancreatitis and in patients, which correlates with disease severity [26].

Sepsis/endotoxemia is one of the most common causes of death in nonsurgical intensive care units. Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection [27]. Moreover, it is associated with overwhelming production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, macrophages being one of the main producers of these mediators [28].

Thus, TNAP is expressed in immune cells. In B lymphocytes, TNAP has been related to the differentiation process into antibody-secreting cells [29, 30]. TNAP is also contained in the secretory vesicles of neutrophils [31]. Recently, we have shed light on the regulatory role of TNAP in T cells, which was again related to modifications in glycosylation [32]. However, little is known about the role of TNAP in neutrophils and in macrophages.

2. AIMS

Based on all the above, we proposed 2 main objectives in this doctoral thesis:

1. To assess the role of TNAP in inflammatory related conditions: acute pancreatitis and endotoxemia/sepsis.
2. To characterize the immunomodulatory role of TNAP in immune cells.

3. MATERIAL AND METHODS

To carry out the objectives of the present doctoral thesis, we used C57BL/6 (B6.129S7-Akp2^{tm1Sor/J}) heterozygous mice for *Alpl* (referred to as TNAP^{+/-}), with

wild-type (WT) littermates used as controls. Intraperitoneal administration of caerulein and LPS were used as *in vivo* models of acute pancreatitis and endotoxemia/sepsis, respectively. A wide variety of techniques, including RT-qPCR, magnetic cell separation, cell culture of neutrophils and macrophages from spleen, peritoneum and bone marrow, histology techniques, flow cytometry, ELISA, proliferation assays and Western Blot were used.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Acute pancreatitis was induced by caerulein administration. Our data confirm that *Alpl* is expressed by pancreatic acinar cells in mice and that was robustly induced by pancreatitis. Overall, TNAP^{+/-} mice exhibited a greater degree of inflammation as shown by expression of some cytokines (*Il6*, *Il1b*), chemokines (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*), and adhesion molecules and other genes (*Selplg*, *Bax*) in pancreas. Mechanistically, our results may be explained mainly by an augmented activation of neutrophils, but also by enhanced sensitivity of acinar cells to injury in TNAP^{+/-} mice.

The main infiltrating immune cells in this model are, as noted, neutrophils, which express TNAP. *In vitro* stimulation of isolated neutrophils revealed an enhanced response of neutrophils from TNAP^{+/-} mice. Furthermore, in order to evaluate the role of neutrophils, we depleted neutrophils before the stimulation with caerulein. We observed that neutrophil depletion prevented the aggravated inflammatory state in TNAP^{+/-} mice, indicating that neutrophils play a decisive role. This is consistent with their importance in acute pancreatitis and is supported by the higher infiltration of neutrophils in TNAP^{+/-} mice and the enhanced response to *in vitro* stimulation. The mechanism relating TNAP and neutrophil recruitment and activation remains unraveled but may be related to the modulation of extracellular ATP, a known substrate of TNAP. Purinergic regulation has been shown to be essential for shaping neutrophil plasticity and heterogeneity, and to orchestrate their complex functions during inflammation. Thus purinergic regulation has been related, among others, to neutrophil rolling, adhesion, transmigration, apoptosis, phagocytosis, oxidative burst, degranulation and neutrophil extracellular trap formation. The stimulation of P2 receptors by ATP facilitates immune activation, while P1 receptor ligation by adenosine mostly restricts immune cell activation. As TNAP degrades ATP, it is possible that TNAP deficiency brings about an increased ATP/adenosine ratio, thereby inducing a proinflammatory status.

The involvement of acinar cells was assessed, firstly, by isolation of these cells from caerulein induced acute pancreatitis mice, and secondly, by *in vitro* stimulation of isolated acinar cells with caerulein. In the first experiment, acinar cells from TNAP^{+/-} mice displayed an enhanced expression of *Cxcl2*, *Il6* and *Selplg*, while in the second one, we could describe an augmented expression of *Cxcl1*, *Cxcl2* and *Il6*. Taken together, our data point to a modulation of acinar cell phenotype in TNAP^{+/-} mice, which may render them more prone to inflammatory signaling (including neutrophil recruitment) and/or more sensitive to caerulein injury. We further described that this phenotype can be partly reproduced by direct enzyme inhibition with levamisole, suggesting that the main link between haplodeficiency and the enhanced response to caerulein is reduced TNAP levels. The mechanism of TNAP is uncertain but may be related, as in neutrophils, to the modulation of extracellular ATP and purinergic regulation, for instance by reducing activation of NLRP3 via the P2X7 receptor. In turn, changes in TNAP activity in heterozygous mice may be attributed to differences in the dynamics/rate of translation, which may affect glycosylation.

In summary, our data suggest that altered TNAP expression (i.e. diminished expression and/or changed glycosylation) results in heightened pancreatic inflammation, which may be explained by an augmented response of neutrophils and by a higher sensitivity of acinar cells to caerulein injury or by an enhanced proinflammatory profile in these cells, the former being the most relevant.

Next, we used a mouse model of endotoxemia/sepsis by intraperitoneal administration of LPS, due to the involvement of the intestinal barrier function and the immunological response (particularly macrophages) in this pathology. TNAP haplodeficiency had some effects in the acute response to endotoxemia. Thus, mRNA levels of *Il10* and *Cxcl10* in the liver were higher in WT vs. TNAP^{+/-} with no changes in the plasmatic levels of the cytokines IL-6, IFN- γ , and TNF- α and other parameters analyzed. We focused the attention on macrophages. Similarly to liver, gene expression of spleen macrophages from TNAP^{+/-} showed a reduced expression of *Il10* and *Cxcl10* (the latter without reaching statistical significance). Intraperitoneal macrophages from TNAP^{+/-} mice displayed a reduced production of IL-6, together with the reduced phosphorylation of STAT3, AKT and I κ B. Those data suggest a lesser degree of activation of IL-6 producing pathways. In order to study the apparently different behavior of macrophages from different tissues, we tried to characterize macrophages from spleen, peritoneum and bone marrow. We studied proliferation, IL-6 production and

polarization. No differences were seen in proliferation, and, regarding IL-6 production, spleen monocytes tended to a higher production of this cytokine, while intraperitoneal and bone marrow macrophages showed a lower synthesis of IL-6. TNAP haplodeficiency affected polarization in a different way depending of the origin of the cells. Intraperitoneal and bone marrow monocytes from haplodeficient mice show a different regulation among themselves and spleen monocytes through a complex mechanism in which glycosylation may be involved.

In summary, TNAP emerges as a key regulator in immune and epithelial cells, with haplodeficiency resulting in complex changes in the response to inflammatory stimuli, which are attributed to modifications in the amount of protein expressed but also to alterations in the glycosylation pattern.

5. CONCLUSIONS

1. Mouse acinar cells express TNAP, which is induced in a caerulein induced acute pancreatitis model. Acinar cells from TNAP^{+/-} mice show higher sensitivity to caerulein injury.
2. Neutrophils from TNAP^{+/-} mice display an enhanced response to *in vitro* LPS stimulation.
3. TNAP^{+/-} mice exhibit a heightened sensitivity to caerulein induced acute pancreatitis. The mechanism involves an augmented inflammatory response of acinar cells as well as neutrophils. The observation that neutrophil depletion prevented the majority of the differences, indicates that neutrophils are the main component of the observed phenotype.
4. TNAP haplodeficiency in mouse affects the acute response to endotoxemia. The mechanism is complex and requires further investigation.
5. Spleen monocytes express TNAP and their response to LPS is modulated by enzymatic inhibitors or TNAP haplodeficiency.
6. Intraperitoneal, bone marrow and spleen monocytes from haplodeficient mice show a different regulation. These data suggest that TNAP plays an important role in the three populations.
7. Due to its immunomodulatory effects in different cell populations, TNAP may be a useful pharmacological target in the future.

INTRODUCCIÓN

1. FOSFATASA ALCALINA

1.1. Generalidades

Las fosfatasas alcalinas (APs, ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa, EC 3.1.3.1) son una superfamilia de enzimas (glucoproteínas) ampliamente distribuidas, hasta el punto de que pueden encontrarse desde en bacterias hasta en el hombre. Son enzimas homodiméricas que catalizan la hidrólisis a pH alcalino de grupos fosfato (R-OP) con la liberación de fosfato inorgánico (Pi) y un alcohol, azúcar o fenol entre otros (R-OH). En el sitio catalítico tienen 3 iones metálicos, dos de Zn y uno de Mg, necesarios para la actividad enzimática.

Aunque las principales características del mecanismo catalítico se conservan entre especies, cuando se comparan las APs de mamíferos y bacterias, se observa que las APs de mamíferos tienen mayor actividad específica, un mayor pH alcalino óptimo y una menor estabilidad al calor. Además, las APs de mamíferos se encuentran ancladas a la membrana y son inhibidas por L-aminoácidos y péptidos mediante un mecanismo acompetitivo [33]. La tabla 1 resume la nomenclatura, distribución tisular y localización cromosómica de las isoformas de AP en humano y ratón.

1.2. Genética

1.2.1 Genes de fosfatasa alcalina

En humanos, las isoenzimas de fosfatasa alcalina (AP) están codificadas por cuatro genes distintos designados según su localización mayoritaria (tabla 1). Tres isoformas son específicas de tejido: la intestinal (IAP, codificada por *ALPI*), la placentaria (PLAP, codificada por *ALPP*) y la de células germinales (GCAP, codificada por *ALPPL2*). El cuarto gen, *ALPL*, codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) que, como su nombre indica, se expresa en distintos tejidos, mayoritariamente en hígado, hueso y riñón [1]. Los genes que codifican las APs específicas de tejido en humano, *ALPP*, *ALPPL2* y *ALPI*, están íntimamente relacionados. Su estructura es prácticamente idéntica, conteniendo 11 exones interrumpidos por pequeños intrones en posiciones análogas, todo comprimido en menos de 5 kb de DNA genómico [34-36]. La similitud entre la estructura de las tres isoformas sugiere una evolución divergente ya que los tres *loci* (*ALPP*, *ALPPL2* y *ALPI*) están localizados en ese orden del centrómero al telómero en la misma región del brazo largo del cromosoma 2, bandas q34-q37 [37, 38].

Tabla 1. Resumen de la nomenclatura génica, nombre común, distribución tisular y localización cromosómica de las distintas isoformas de fosfatasa alcalina en humano y ratón [39].

Especie	Gen	Proteína	Nombre común	Distribución tisular	Localización cromosómica
Humano	<i>ALPL</i>	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo hígado-hueso-riñón"	SN en desarrollo, tejido óseo, hígado, riñón	chr.1:21581174-21650208
	<i>ALPP</i>	PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria	Sincitiotrofoblasto, tumores	chr2:233068964-233073097
	<i>ALPPL2</i>	GCAP	Fosfatasa alcalina de células germinales	Testículos, trofoblastos	chr2:233097057-233100922
	<i>ALPI</i>	IAP	Fosfatasa alcalina intestinal	Intestino	chr2:233146369-233150245
Ratón	<i>Alpl</i> (<i>Akp2</i>)	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo "hígado-hueso-riñón"	SN en desarrollo, tejido óseo, hígado, riñón	chr4: 137741733-137796384
	<i>Akp3</i>	dIAP	Fosfatasa alcalina intestinal duodenal	Intestino	chr1: 87124973-87127912
	<i>Akp5</i>	EAP	Fosfatasa alcalina embrionaria	Embrión preimplantado,	chr1: 87086694-87089928
	<i>Akp6</i>	gIAP	Fosfatasa alcalina intestinal global	Intestino	chr1:87002298-87005230

Por otro lado, el gen *ALPL* está localizado en el brazo corto del cromosoma 1. Su estructura supera las 50 kb y contiene 12 exones (Esquema 1) [40, 41]. El exón 1 contiene secuencias 5' no transcritas y se compone del exón Ia y el exón Ib, que tienen inicio de transcripción alternativo, es decir, que los exones son incorporados al mRNA de forma excluyente al contener cada uno su propia secuencia promotora [40, 42]. Así, la transcripción del exón Ia está dirigida principalmente por un promotor activo en osteoblastos mientras que en el exón Ib está dirigida por un promotor distinto, activo en hígado y riñón [42, 43].



Esquema 1. Organización genómica del gen humano de *ALPL*. En negro los exones y en gris las regiones 5' y 3' no transcritas [44]

En ratones, además del gen *Alpl* (*Akp2*), localizado en el cromosoma 4 [44], que codifica la TNAP, existen 4 *loci* más que codifican para AP en el cromosoma: el *locus Akp3*, que codifica la AP duodenal (dIAP) [45]; *Akp5*, codifica la AP embrionaria (EAP) [45]; *Akp6*, que codifica la isoforma intestinal global (gIAP) [46] y por último, el pseudogen no transcrito en el *locus Akp-ps1* [45].

Las moléculas de mRNA correspondientes a las isoformas en humano y ratón tienen una longitud de entre 2,4 y 3,0 kb y codifican péptidos de 518-535 aminoácidos. Además, no se han encontrado isoformas placentaria ni de células germinales en ratón, luego en estos animales, IAP es la única AP específica de tejido [44, 47].

1.2.2 Expresión génica y factores de transcripción

La expresión de *Alpl* en ratón (o *Akp2*), que codifica la TNAP, está muy extendida durante el desarrollo, incluso se ha propuesto que pueda ejercer un papel en el mantenimiento del estado indiferenciado de células madres embrionarias [48]. La expresión de *Alpl* se puede observar en diferentes tejidos, como el tubo neural y el cerebro (en distintos estadios del desarrollo embrionario del ratón) [49, 50], las células endoteliales, túbulos renales, el canalículo biliar en el hígado [51] y de forma predominante en el tejido óseo, cartílago y dientes [51]. También hay evidencias claras de que se expresa en distintos tipos celulares en el

cerebro [52, 53]. En las neuronas de ratón parece que se expresa *Alpl* bajo el promotor del exón Ib (tipo hígado), mientras que en humanos el transcrito de *ALPL* contiene el exón Ia o tipo hueso [54]. Por otro lado, nuestro grupo de investigación y otros han puesto de manifiesto la presencia de TNAP a nivel colónico [16], la cual parece ser secretada al lumen por los colonocitos en partículas tipo surfactante (*surfactant-like particles*, SLPs), disminuyendo la tensión superficial, aunque existe cierta controversia [55, 56].

Diversos estudios han puesto en evidencia que la modulación de la actividad TNAP puede deberse a procesos transcripcionales así como postranscripcionales [57]. La transcripción de la TNAP mediante el promotor Ia puede estar regulada por dexametasona, ácido retinoico y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) [58, 59]. Además, se ha observado que en ratón los tejidos que no expresan TNAP hipermetilan el promotor Ia *in vivo*, reprimiendo su expresión [60]. Por otro lado, el promotor Ib es activado por dexametasona [61], dibutilil AMP cíclico y el ácido holo-trans-retinoico [62, 63]. A nivel postranscripcional, 1,25-dihidroxitamina D3, el cual regula la mineralización ósea, puede actuar estabilizando el mRNA y aumentando su vida media [64]. También se han identificado varios factores de transcripción implicados en la regulación de TNAP: FKHR (*forkhead box O1*) [65], Sp3 (activador en células hematopoyéticas) [66] y dos miembros de la familia Smad: Smad 1 que inhibe el promotor de TNAP y Smad 3 que activa la expresión de TNAP y la mineralización en líneas celulares osteoblásticas [67, 68]. También en osteoblastos, BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) actúa induciendo la expresión de TNAP en un proceso dependiente de la vía Wnt y la cascada de β -catenina [69]. Esta vía es la responsable del incremento de la expresión de TNAP en las células del músculo liso vascular (VSCMs, *vascular smooth muscle cells*) en respuesta a diversas citoquinas (TNF- α o IL-1 β), mecanismo implicado en la calcificación vascular [70, 71]. También PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) está implicada en la regulación de la expresión de TNAP mediada por citoquinas tanto en VSCMs como en condrocitos, aunque en sentido opuesto en cada caso. Tanto TNF- α como IL-1 β provocan la inhibición de PPAR γ , dando como resultado la inducción o inhibición de TNAP en VSCMs y condrocitos respectivamente [72].

La AP embrionaria de ratón (EAP) [45], codificada por el gen *Akp5*, se expresa en el estadio embrionario blastocisto en niveles 10 veces superiores a la expresión de *Akp2* en el mismo estadio [73]. En el estadio adulto se expresa en los testículos y el intestino. En el feto humano es la isoenzima de AP de células germinales

(GCAP), y no la TNAP como en ratón, la que expresan las células primordiales germinales migratorias y las gónadas fetales [74, 75], aunque todavía no se ha establecido si las células embrionarias germinales expresan la GCAP. También se encuentra en testículos, pulmón, cervix y timo [76, 77].

La AP placentaria (PLAP) se expresa en gran cantidad en los sincitiotrofoblastos de la placenta sobre la semana ocho de gestación y a lo largo del resto del embarazo [78]. Se cree que está involucrada en la transferencia de la IgG materna al feto [79]. Por otro lado, es una de las primeras proteínas expresadas por células cancerosas, de forma ectópica [80].

Por último, la AP intestinal (IAP) se expresa en el intestino delgado de muchas especies. Los ratones coexpresan *Akp3*, *Akp5* y *Akp6* en el intestino, aunque *Akp3* es expresada desde justo antes del destete en el duodeno, mientras que *Akp5* y *Akp6* se expresan en todo el intestino desde el nacimiento y aumentan su expresión tras el destete [46]. Distintos componentes dietéticos, como la pimienta, la capsaicina [81], el zinc [82], el calcio libre [83], la lactosa [84], el fosfato esterificado [85] y factores de crecimiento y hormonales como el calcitriol [86], la cortisona, sola o con tiroxina [87], son capaces de estimular la actividad IAP. Uno de los principales factores de transcripción para la expresión génica de IAP es el factor KLF4 (*gut-enriched Kruppel-like*). En 2005 Alkhoury y col. identificaron dos factores de transcripción intestinales: Cdx1 que activa el gen IAP mientras que Cdx2 inhibe el efecto de Cdx1 [88]. Además, el butirato, un inhibidor de la desacetilación de histonas, regula epigenéticamente la expresión génica de la IAP potenciando la unión del factor KLF5 al promotor [89], acción que por otro lado las citoquinas IL-1 β y TNF- α impiden [90].

1.3. Estructura

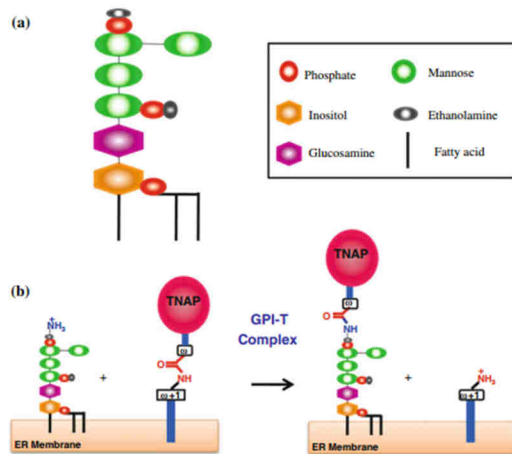
Durante mucho tiempo la estructura cristalográfica de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (ECAP) ha sido la única fuente de información de la estructura de las APs, sin embargo, en 2001 Le Du y col. consiguieron la primera estructura tridimensional de una AP mamífera, la AP placentaria (PLAP; 1EW2; Protein Data Bank) [91]. El núcleo central, muy similar al de ECAP, consta de una hoja β extendida y dos α -hélices rodeándola. En general, la estructura de la PLAP es dimérica, cada monómero consta de 484 residuos, cuatro átomos metálicos y un ión fosfato, así como una molécula de agua. La superficie de la proteína solo conserva un 8% de los residuos en común con la ECAP. Además, en el centro activo solo están preservados los residuos esenciales: la serina catalítica; los tres

sitios de los metales iónicos, M1 (ocupado por Zn^{2+} o $Zn1$), M2 (ocupado por $Zn2$) y M3 (ocupado por Mg^{2+}). Brevemente, el Zn^{2+} de M1 activa la serina catalítica, formando el intermediario fosfoserina, que será hidrolizado por una molécula de agua activada por el $Zn2$ de M2. El grupo fosfato será entonces liberado o transferido a un aceptor [92]. El Mg^{2+} del sitio M3 estabiliza la fracción de fosfato transferida en el estado de transición [93]. Asimismo, hay un sitio de unión no catalítico, M4, que contiene un metal, Ca^{2+} . La localización de este ión Ca^{2+} en el bucle sugiere una función relacionada con la estabilidad conformacional de las dos α -hélices de las zonas periféricas.

Las isoformas específicas de tejido PLAP, GCAP e IAP, muestran una homología de 90-98%, mientras la TNAP se parece en un 50% a las otras [94].

La fracción N-terminal de uno de los monómeros envuelve el segundo monómero confiriendo propiedades alostéricas al dímero de fosfatasa alcalina. Por otro lado, el dominio flexible que queda en la parte superior de la AP, "dominio corona", contiene residuos importantes para la estabilización de los inhibidores de AP (como E429 e Y367 [33, 95]) y determina las propiedades específicas de la isoenzima, como la estabilidad al calor o la unión a colágeno [96, 97]. La presencia de cadenas de carbohidrato no parece ser un impedimento para la actividad catalítica en las isoenzimas de AP específicas de tejido, sin embargo, sí tienen mucha importancia para la TNAP. Las isoformas de hueso, hígado y riñón de TNAP contienen la misma secuencia de aminoácidos (507), aunque su mRNA sea distinto al contener el exón I (no codificante) diferente (Ia en hueso y Ib en hígado y riñón), pero además difieren en las modificaciones de glucosilación postraduccionales [98]. La secuencia de cDNA de *ALPL* sugiere la presencia de 5 sitios de N-glucosilación. Además, la TNAP parece estar O-glucosilada en hueso pero no en hígado. De hecho, estas diferencias de glucosilación afectan a la actividad catalítica de las isoformas [99].

Finalmente, mientras la AP de *Escherichia coli* se localiza en el espacio periplásmico bacteriano, las APs mamíferas están ancladas a la membrana plasmática mediante glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en cada monómero [100]. GPI está formado por un grupo fosfatidilinositol unido a etanolamina mediante carbohidratos (glucosamina y manosa unidas por enlace glucosídico al inositol). La cadena nascente de AP se une por su C-terminal al GPI mediante transaminación (Esquema 2). Los ácidos grasos del GPI anclan la proteína a la membrana [101].



Esquema 2. Representación del anclaje de la AP con la molécula de GPI. (a) Estructura del GPI. (b) Reacción de transamidación que reemplaza el C-terminal de la AP con el GPI de la membrana. [101]

1.4. Propiedades enzimáticas

1.4.1. Especificidad de sustratos

Las APs de mamíferos tienen un amplio espectro de sustratos específicos y son capaces de hidrolizar o transfosforilar una amplia variedad de compuestos fosforilados *in vitro*. Sin embargo, solo unos pocos compuestos han sido confirmados como sustratos naturales en algunas isoenzimas de AP [102].

Uno de los principales sustratos de la TNAP es el pirofosfato inorgánico (PPi) presente en las vesículas de la matriz ósea, y que actúa como inhibidor de la mineralización ósea. Gracias a su acción, se forma el Pi necesario para la cristalización de la hidroxiapatita y el crecimiento óseo [103]. A nivel renal, también tiene como sustrato el inhibidor de la mineralización PPi, estando por tanto involucrada en la ratio fosfato inorgánico (Pi)/PPi renal que puede llevar a calcificación renal [104].

Otro de los sustratos importantes de TNAP es el piridoxal-5'-fosfato (PLP) presente en leucocitos [105] y en sangre periférica [100]. La TNAP actuaría como ectoenzima regulando los niveles extracelulares de PLP y permitiendo el acceso de la forma desfosforilada al SNC para la formación de neurotransmisores [106].

Además, las APs parecen estar involucradas en el metabolismo de nucleótidos como sugiere el hecho de que la TNAP de osteocitos es capaz de hidrolizar ATP, ADP, AMP, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, β -glicerolfosfato y bis-(*p*-nitrofenil)fosfato, así como el *p*-nitrofenilfosfato [107]. Además, la TNAP en ratón, junto a la fosfatasa ácida prostática y la 5-ectonucleotidasa, es una de las enzimas que genera adenosina desde AMP, con sus implicaciones a nivel del sistema nervioso [7] e inmunológico [108, 109]. Por su

parte, IAP es capaz de actuar previniendo el efecto inflamatorio causado por el nucleótido uridina difosfato, mediador de la liberación de citoquinas, mediante su hidrólisis [110].

Por último, APs han demostrado capacidad de desfosforilación de productos bacterianos, concretamente IAP es capaz de actuar sobre flagelina y CpG; mientras que tanto IAP como TNAP son capaces de hidrolizar el lipopolisacárido bacteriano (LPS) a nivel intestinal [11], hepático [111] y renal [112].

1.4.2. Inhibición enzimática

Desde los años 60 se han descubierto numerosos inhibidores de las distintas isoformas de AP. Entre ellos se incluyen L-aminoácidos como L-fenilalanina, L-triptófano, L-leucina y L-homoarginina, así como otros compuestos no relacionados como levamisol (L-tetramisol) y teofilina (derivado 1,3-dimetil xantina). La inhibición es de tipo incompetitiva, poco frecuente. El sitio exacto de unión y el mecanismo preciso de inhibición tan solo han sido dilucidados para L-fenilalanina y L-leucina en el sitio activo de la PLAP. Por otro lado, se ha visto que la teofilina puede actuar como inhibidor incompetitivo pero, también, inhibiendo el sustrato cuando este se encuentra a concentraciones altas [113, 114]. Además, hay que tener en cuenta que la teofilina aumenta la concentración intracelular de AMPc [115], lo que desencadenará un efecto adicional sobre la activación y proliferación de células T entre otras, pudiendo cambiar el perfil de inhibición [116].

Entre los L-aminoácidos, tanto L-homoarginina (L-hArg) como levamisol son inhibidores más específicos de la TNAP, siendo el levamisol alrededor de 100 veces más efectivo que L-hArg [114, 117]. L-fenilalanina (L-Phe) inhibe 25 veces mejor la PLAP y la IAP [118] que la TNAP [119].

1.4.3. Termoestabilidad

De todas las isoformas de AP, PLAP es la más termoestable, hasta el punto de que puede ser calentada a 65 °C durante tiempos superiores a una hora sin que eso suponga una pérdida de actividad. Sin embargo, aun cuando IAP es más termoestable que TNAP, ambas son inactivadas rápidamente a temperaturas superiores a 65 °C. Entre las isoformas de TNAP, se ha visto en plasma que el subtipo hígado es algo más termoestable que el subtipo hueso [120].

1.5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)

Dentro de las isoformas de AP, IAP es la más ampliamente estudiada. Su expresión y actividad están moduladas por la dieta, siendo esencial su papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Se le han atribuido diversas funciones, entre las que destacan:

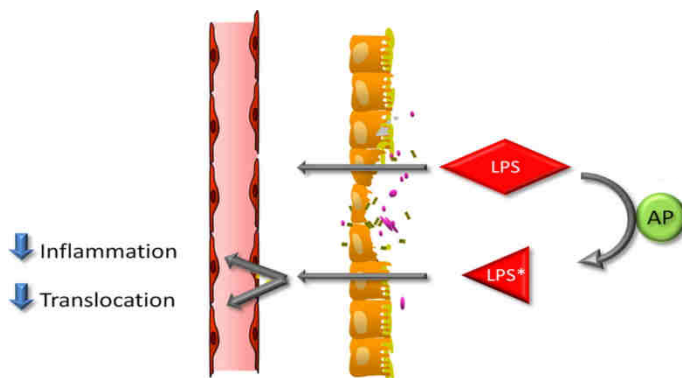
- Regulación duodenal de la secreción de bicarbonato y del pH superficial. Diversos autores sugieren un papel como quimiosensor (un bucle IAP, ATP extracelular y receptor P2Y₁ acoplado a proteína G) que regula el pH duodenal lo que confiere protección a la mucosa frente a los ácidos gástricos [9, 10].

- Regulación en la absorción de ácidos grasos. Se ha descrito que los niveles de IAP (en suero de rata) están aumentados tras la ingesta de comida rica en grasa [121], mientras que, por el contrario, sus niveles disminuyen drásticamente tras el ayuno [122, 123]. Diferentes investigadores han llevado a cabo ensayos que han tratado de dilucidar el papel de IAP en la absorción lipídica. Así, Nakano y col. mostraron que la administración oral del inhibidor de IAP L-Phe a ratones C57BL/6 inhibía notablemente el aumento postprandial de triacilglicerol en suero, indicando que éste se debía a la actividad de IAP [124]. Los estudios realizados en animales con delección de *Akp3* (dIAP) generados por Narisawa y col. pusieron de manifiesto en estos ratones una mayor ganancia de peso y un transporte de ácidos grasos (AG) incrementado respecto a ratones normales [8]. En un primer momento, por tanto, se otorgó un papel regulador negativo a dIAP en la absorción de grasa. Posteriormente, otros estudios han detectado un incremento de expresión de *Akp6* (gIAP) y de la translocasa fosforilada de AG (CD36), involucrada en el transporte de AG de cadena larga a la célula. La gIAP actuaría desfosforilando y modulando en consecuencia a CD36, lo que sugiere que son parte del mecanismo de incremento de absorción de AG en los ratones *Akp3*^{-/-} [125, 126]. Sin embargo, ensayos posteriores atribuyen a CD36 un efecto marginal sobre la absorción de la grasa, ya que ratones *knockout* del gen *Cd36* no presentaban alteración en la absorción de AG de cadena corta [127]. Los últimos datos sugieren que el aumento de AG observado en ratones *Akp3*^{-/-} podría ser resultado de una disminución del pH del lumen y un incremento del ATP libre [128].

- La IAP juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal entre el hospedador y la microbiota intestinal. En el pez cebra libre de bacterias (*germ-free*) la diferenciación epitelial intestinal no es completa, mostrando

una expresión de IAP baja, aunque la actividad aumenta con la introducción de bacterias Gram-negativas o LPS [11]. Por otro lado, la existencia en ratones *knockout* de IAP de una menor diversidad de bacterias anaerobias y aerobias en la microbiota, pone de manifiesto la importancia de IAP en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota intestinal [13]. En el caso de crías de rata, la disbiosis asociada a la ausencia de IAP se vio acompañada de un incremento en la permeabilidad y la translocación bacteriana [129]. Otros datos señalan que cuando se estimula la expresión de IAP, las células epiteliales intestinales (IECs) son capaces de regular negativamente la producción de IL-8 inducida previamente por bacterias gram-negativas como *E.coli* o *Salmonella typhimurim*, pero no de gram-positivas [130].

- Destoxificación mediante desfosforilación de la fracción lipídica A del lipopolisacárido bacteriano (LPS) de bacterias Gram-negativas. La toxicidad del LPS reside en el lípido A y en el grado de fosforilación [131]. En consecuencia, su acción evita que el LPS alcance la circulación sistémica, con lo que reduce la inflamación y el *shock séptico* [132]. Asimismo, al inactivar el LPS, la IAP previene la inflamación y la consecuente translocación bacteriana [11, 15, 123] (0).



Esquema 3. Destoxificación del LPS a nivel intestinal [15]

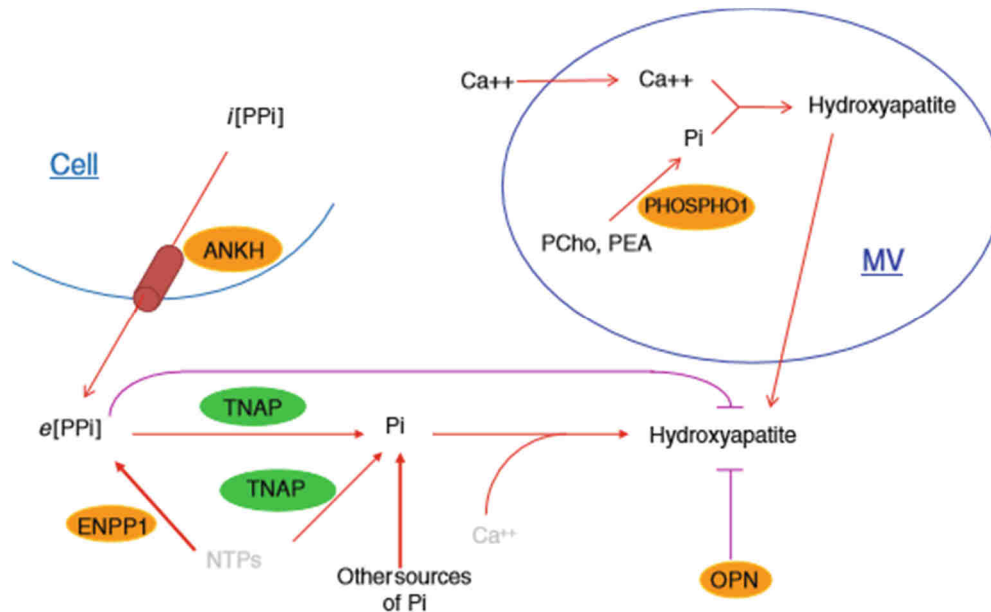
La administración exógena de IAP en diversos modelos animales ha mostrado efectos positivos, así, por ejemplo, en modelos de encefalomiелitis [133], NEC (enterocolitis necrotizante) [133, 134] y colitis [15] disminuyó las alteraciones neuronales, la inflamación sistémica e intestinal y la translocación bacteriana, respectivamente. En un modelo animal de peritonitis, la administración intraperitoneal de IAP incrementó la supervivencia, lo que llevó a proponer su uso como terapia para la sepsis intraabdominal [135]. Relacionado con la capacidad de destoxificación, IAP está ganando interés como tratamiento contra el síndrome

metabólico. La razón es que la endotoxemia crónica ha sido identificada como un factor clave causante de una respuesta inflamatoria de baja intensidad que, al fin, será la responsable de la aparición de este síndrome. En un estudio publicado en 2013, la suplementación de esta enzima consiguió prevenir e incluso revertir el síndrome metabólico [14].

- Desfosforilación de nucleótidos libres con papel proinflamatorio, como ATP [136] y UDP [110], así como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos, *pathogen-associated molecular patterns*), entre ellos, flagelina y CpG DNA, ligandos de TLR5 y TLR9 [130]. Estos hallazgos son importantes ya que tanto los nucleótidos libres como los PAMPs están asociados a la patología intestinal en enfermedades como fibrosis quística [128] y enfermedad inflamatoria intestinal [110].

1.6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)

El papel de la TNAP en la mineralización ósea ha sido ampliamente estudiado. La enzima hidroliza el PPI, que es un inhibidor de la mineralización, proporcionando Pi para la formación de hidroxiapatita (Esquema 4). La TNAP es una de las proteínas encargadas de mantener el ratio Pi/PPI extracelular, necesario para una correcta calcificación ósea. Existen, además, otras 4 proteínas que regulan este ratio: PC-1 (*plasma cell membrane glycoprotein-1*, expresada por el gen *ENPP1*, produce PPI a partir de dNTPs) [137], ANKH (*progressive ankylosis protein homolog*, canal que media la salida de PPI de la célula) [138, 139], osteopontina (OPN, otro inhibidor de la mineralización) [138] y PHOSPHO1 (*phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatasefosfatase*, encargada del primer paso de la mineralización en las vesículas de matriz) [140]. La modulación por desfosforilación de OPN por parte de TNAP es otro proceso que contribuye a la mineralización [141].



Esquema 4. Representación esquemática de los agentes claves en la mineralización ósea y su regulación. MV = vesícula de matriz; PEA = fosfoetanolamina; PPi = pirofosfato inorgánico (i = intracelular; e = extracelular); Pi = fosfato inorgánico; NTPs = nucleótidos trifosfato; ENPP1 = ectonucleotido pirofosfataasa/fosfodiesterasa 1; OPN = osteopontina; TNAP = fosfatasa alcalina no específica de tejido; ANKH = proteína homóloga del responsable de anquilosis progresiva; PEA = fosfoetanolamina; PCho = fosfocolina; PHOSPHO1 = fosfatasa huérfana 1. [Adaptación de [137, 138, 140, 142]].

La hipofosfatasa (HPP, OMIM 146300, 241500, 241510) es una enfermedad hereditaria caracterizada por una deficiencia de TNAP como resultado de mutaciones en el gen que la expresa, *ALPL*. Las manifestaciones de esta enfermedad son debidas al acúmulo de sus sustratos que están elevados tanto en pacientes con HPP como en modelos animales. Es el caso de PPi, que inhibe la mineralización ósea, lo cual deriva en raquitismo, al inhibir el crecimiento del esqueleto en niños, y en osteomalacia en el caso del adulto [2]. Por otro lado, hay altos niveles de PLP, fruto de una hidrólisis defectiva por la TNAP, lo que disminuye la disponibilidad de piridoxal (PL), capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y proporcionar PLP al cerebro [143]. Consecuentemente, la actividad TNAP está implicada en el metabolismo de diferentes neurotransmisores, como GABA y serotonina, cuya síntesis necesita PLP como cofactor [144]. En situación de ausencia de TNAP, como en caso de hipofosfatasa humana y en modelos animales de esta (*Akp2^{-/-}*), se ha observado el desarrollo de ataques epilépticos asociados a la deficiencia en el metabolismo de PLP y GABA [145-148]. El efecto anteriormente descrito destaca la importancia de TNAP en el sistema nervioso. Asimismo, en ratones *Akp2^{-/-}* se observó una disminución significativa de materia blanca en la médula espinal así como ausencia de axones

mielinizados en la corteza cerebral [5]. Además, la localización de la TNAP en la hendidura sináptica [52] y los nódulos de Ranvier [149] respalda el papel de la TNAP en la regulación de la actividad neuronal a nivel de corteza cerebral.

TNAP se considera un elemento clave en el origen de dos fenómenos contrapuestos a nivel cerebral, la diferenciación y la degeneración neuronal. Durante el desarrollo neuronal, la TNAP juega un papel esencial en el establecimiento de circuitos neuronales. Un estudio *in vitro* de 2011 puso de relieve un efecto pro-neurítico inducido por altos niveles de TNAP y bajos niveles de ATP correlacionados. Este efecto consistía en el incremento de la longitud del axón en el área del cono de crecimiento neural en neuronas del hipocampo [150]. Curiosamente, se ha visto que la TNAP también regula la diferenciación de las células madres neurales *in vitro* [6]. Además, la producción de adenosina mediante la actividad 5'-ectonucleotidasa en la médula espinal dorsal es esencial para el mantenimiento de un buen tono purinérgico en los circuitos nociceptivos [7]. Todos estos efectos están relacionados con la regulación de la señalización purinérgica a través de la hidrólisis del ATP. Por el contrario, nuevas evidencias apuntan a un efecto neurotóxico producido por la TNAP, cuya expresión y actividad se ven incrementadas en el hipocampo y en el suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con pacientes control [151, 152]. Díaz-Hernández y col. han descrito la capacidad de la TNAP de desfosforilar la proteína tau hiperfosforilada, componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares presentes en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, y que es liberada tras la muerte celular de neuronas afectadas [151]. Una vez desfosforilada, la proteína tau es agonista de los receptores muscarínicos M1 y M3, provocando un aumento del calcio intracelular que propagará la muerte neuronal [151-153].

En el hígado la eliminación de endotoxina circulante (LPS) es llevada a cabo principalmente por las células de Kupffer. Posteriormente, es excretada a la bilis por los hepatocitos [154]. De hecho, Poelstra y col. propusieron que la función de la TNAP en el hígado es la destoxicación de LPS circulante. Así, en situación de colestasis, la actividad de las células de Kupffer está suprimida y la ruta enterohepática de eliminación de toxinas obstruida y, como respuesta fisiológica, se potencia la actividad TNAP [102]. Además, Tuin y col. comprobaron que la administración de LPS en ratas estimula la expresión de TNAP en los hepatocitos *in vivo* [111].

Por otro lado, la función de la TNAP a nivel renal parece algo controvertida ya que hidroliza el PPI, el cual actúa como inhibidor de la mineralización en orina. De hecho, individuos con predisposición a la formación de piedras de oxalato cálcico presentan una menor excreción de PPI [155]. Hasta la fecha, la función de la TNAP en el riñón parece estar unida al metabolismo del PPI, pero también a la detoxificación de LPS y en consecuencia a la protección contra el daño del mismo sobre la microvasculatura glomerular.[112].

En neonatos, Pettengill y col. demostraron que la TNAP en sangre está involucrada en la producción de adenosina anti-inflamatoria [109]. Debido a la capacidad de hidrolizar PPI anteriormente comentada, la TNAP también desempeña una función relevante en la calcificación vascular. Las VSCMs desempeñan un papel clave en este proceso al expresar marcadores propios de condrocitos/osteoblastos, entre ellos, TNAP. Esta enzima se activa en este tipo celular en respuesta a citoquinas implicadas en el desarrollo de la placa de ateroma, como IL-1 β o TNF- α [39, 70]. De hecho, se han detectado altos niveles de TNAP en arterias humanas calcificadas [156]. En esta circunstancia, se ha planteado la posibilidad de utilizar inhibidores de TNAP. Sin embargo, los empleados tradicionalmente (levamisol, teofilina, homoarginina, discutidos anteriormente) no son específicos y presentan acciones adicionales que dificultan su utilización en el tratamiento de patologías como la aterosclerosis. En 2007, Narisawa y col. desarrollaron nuevos inhibidores específicos de TNAP que podrían ser un punto de partida para el desarrollo de fármacos útiles en patologías relacionadas con la calcificación de tejidos blandos [157].

La TNAP también está relacionada con el tejido adiposo. Los niveles plasmáticos de AP se correlacionan con la obesidad y el síndrome metabólico, encontrándose niveles más altos de la enzima en la población obesa respecto a la delgada [158]. Además, se ha observado en ratas Zucker obesas que el tratamiento con resveratrol atenúa la esteatosis hepática, reduce los ácidos grasos disponibles, el estrés oxidativo y los niveles plasmáticos de AP [159]. Por otro lado, estudios en células 3T3-L1 murinas y pre-adipocitos obtenidos de tejido adiposo mamario humano han puesto de manifiesto el papel de la TNAP en la diferenciación hacia adipocitos al actuar sobre la acumulación intracelular de lípidos [160]. Este mismo grupo ha descrito la existencia de diferencias étnicas en la acumulación de lípidos y la actividad AP en pre-adipocitos. Este estudio asocia la mayor prevalencia de obesidad en mujeres de raza negra a un mayor contenido lipídico paralelo a una actividad superior de TNAP en estas células [161]. Por otro lado, Hernández-

Mosqueira y col. han demostrado que el gen *Alpl* se expresa en la diferenciación terminal del adipocito, en la línea murina T3F442A, concluyendo que la TNAP podría estar involucrada en la regulación del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina a través de la síntesis y secreción de adipocinas [18]. Estos estudios sugieren que cambios en la actividad de esta enzima podrían estar correlacionados con los cambios del metabolismo lipídico en el organismo.

En el colon, nuestro grupo de investigación ha descrito un incremento en la expresión de TNAP en diversos modelos de enfermedad inflamatoria intestinal, debido tanto al flujo de leucocitos al sitio de la inflamación como del incremento en la expresión de esta enzima en las propias células epiteliales [15-17]. Estos cambios estaban asociados a un cambio en el patrón de glucosilación, de tipo hepático en condiciones normales a tipo óseo o renal tras la inflamación; mecanismo al que se le ha asignado una función protectora [17]

Por último, y de especial relevancia para esta tesis, es el papel de TNAP sobre la respuesta inmune. TNAP se expresa en diferentes células inmunes tanto del sistema inmune innato como adaptativo. En células B, la TNAP se localiza en la membrana, aunque también se ha encontrado en el sobrenadante de cultivos celulares, probablemente como resultado de su liberación por la actividad de la fosfolipasa C sobre el GPI. La TNAP ha sido asociada a procesos de diferenciación hacia células secretoras de anticuerpos o plasmocitos, lo que sugiere que puede tratarse de un marcador de diferenciación [29, 30, 162]. Además, se ha observado un aumento de la actividad TNAP y de la expresión de *Alpl* en linfocitos B de bazo de ratón estimulados con LPS, frente a linfocitos B no estimulados, así como en líneas celulares malignas de linfocitos B de ratón, U266 B1 [163]. En el año 2008, se identificó la isoforma presente en células B, que resultó ser la hepática [164]. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha estudiado el papel de la TNAP en linfocitos T, mostrando su capacidad de modular la función de este tipo celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, por medio de un mecanismo que posiblemente implique, de nuevo, cambios en la glucosilación de la enzima [32]. En células polimorfonucleares, la fosfatasa alcalina de neutrófilos (NAP) se encuentran en vesículas secretoras que se relocalizan en la membrana celular tras la estimulación [165]. En determinadas condiciones patológicas, como infección o enfermedad de Hodgkin, la actividad de TNAP se ve incrementada [31], sin embargo su papel no ha sido bien caracterizado hasta la fecha, como tampoco en otras células del sistema inmune como son los macrófagos.

1.7. Perspectivas en la utilización farmacológica de la AP

La administración de IAP por diferentes vías de administración ha sido muy estudiada debido a su actividad desfosforilante de endotoxinas como el LPS, con el consiguiente beneficio en patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Tuin y col. administraron comprimidos de IAP a ratas con colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS) [166], nuestro grupo de investigación la administró de forma oral e intrarrectal a ratas con colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) [15]; y Lukas y col. administraron 30 KU/día de IAP durante 7 días, de forma intraduodenal, a 21 pacientes con colitis ulcerosa [167]. En todos los casos se observó una mejora en el desarrollo de la colitis, en caso de animales, y una disminución en el índice Mayo, la proteína C reactiva y la calprotectina en heces, en caso de pacientes enfermos. También a nivel de inflamación intestinal, se ha comprobado que la administración de una dieta suplementada en IAP en un modelo de enterocolitis necrotizante en ratas ayudaba a mejorar los parámetros inflamatorios de la patología. Aunque no consiguió revertir el daño, se ha propuesto su utilización para prevenir la aparición de inflamación en recién nacidos en riesgo [168]. Rentea y col. han publicado que la administración oral de IAP (40 U/Kg) a ratas tras un tratamiento de irradiación hemicorporal baja (13 Gy) resulta beneficioso al mitigar el daño intestinal derivado de la radiación, demostrado por la mejora de la inflamación intestinal aguda y la normalización de la microbiota [169]. Considerando el papel de IAP como regulador de la microbiota, Yammime y col. llevaron a cabo una suplementación oral de IAP durante la exposición a antibióticos en ratones. Los resultados obtenidos indican que IAP mejoró la recuperación de la microbiota comensal así como la resistencia a la infección por *Clostridium difficile*, lo cual llevó a los autores a proponer la administración de IAP como una posible estrategia preventiva eficaz para evitar las diarreas asociadas a antibióticos o la infección por *C. difficile* [170]. Por otro lado, se ha asociado la administración de IAP a roedores con la prevención del síndrome metabólico [14].

Con el fin de evitar problemas asociados a endotoxemia y sepsis, ciertos grupos de investigación han realizado estudios con IAP en humanos. Kats y col. administraron IAP bovina de forma profiláctica a 32 pacientes para evitar la respuesta inflamatoria a la cirugía de bypass pulmonar en pacientes con bypass coronario [134]. Otro grupo ha estudiado la mejora de la función renal tras la administración intravenosa de IAP bovina a 36 pacientes con daño renal agudo asociado a sepsis en un estudio fase IIa [171]. También asociado a la sepsis, otros

autores han observado una mejora de la hiperreactividad plaquetaria asociada a esta patología (por formación de microtrombos y amplificación de la inflamación sistémica) tras el tratamiento *ex vivo* con AP recombinante humana en sangre total y sangre rica en plaquetas tanto de pacientes sanos como pacientes con daño renal agudo asociado a sepsis [172]. Por último, la administración de AP recombinante humana provocó una disminución de la respuesta inflamatoria en células del epitelio proximal renal indicativa de una función mitocondrial dañada o alterada [173].

Respecto a TNAP, se han publicado varios estudios en fase II de terapia de reemplazo enzimático de larga duración con TNAP recombinante humana en pacientes con HPP de inicio perinatal/infantil o juvenil para tratar las manifestaciones óseas de la enfermedad. En general, estos estudios son de naturaleza exploratoria y se necesitan estudios adicionales. Se han observado mejoras en la estatura, la fuerza y la agilidad muscular de los niños, así como una mejora de las manifestaciones óseas, aunque no de forma completa [174, 175]. La proteína recombinante de fusión de TNAP humana es una glucoproteína soluble compuesta por dos cadenas idénticas de polipéptidos, cada una de una longitud de 726 aminoácidos, elaborada a partir del dominio catalítico de la fosfatasa alcalina no específica de tejido humana, el dominio Fc de la inmunoglobulina humana G1, y un dominio péptido deca-aspartato (D10) como péptido de distribución preferente al hueso [176]. Fue designada inicialmente como sALP-FcD10, y como asfotasa alfa al inicio de los ensayos clínicos. La asfotasa alfa es bien tolerada y parece segura. Los efectos adversos tienen una intensidad entre leve y moderada, siendo los más comunes: reacciones en el lugar de inyección, lipodistrofia, calcificación ectópica y reacciones de hipersensibilidad. En 2015, la asfotasa alfa se convirtió en el primer tratamiento médico para la HPP aprobado en Japón y el único tratamiento médico para la HPP de inicio pediátrico aceptado en Canadá, la Unión Europea y EE.UU. [177].

1.8. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina

La determinación de fosfatasa alcalina en suero es una medida rutinaria en la clínica para la detección de enfermedades hepato-biliares (en condiciones basales su expresión es muy baja) y óseas (por su implicación en la formación de hueso), así como el seguimiento del tratamiento de dichas enfermedades.

El rango normal de varía entre 44 y 147 UI/L (Unidades Internacionales por litro, siendo UI la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por

minuto). Los valores pueden variar dependiendo de la edad y el sexo, así como entre laboratorios.

Hiperfosfatasa

Término utilizado para describir la elevación persistente de actividad fosfatasa alcalina en suero de forma aislada pero con importantes cambios bioquímicos asociados. El aumento de la actividad AP no es constitutivo, reflejando su liberación desde órganos dañados. Así, dependiendo del órgano dañado, la isoforma que se libere será diferente. Por ejemplo, la isoforma hepática de TNAP en colestasis hepática; la placentaria durante embarazo [178]; la ósea durante el crecimiento repentino en pubertad [179]; la intestinal en casos de enfermedad inflamatoria intestinal severa o perforación intestinal entre otros [180] o incluso de tumores (Nagao o AP de células germinales) [181]. Normalmente este aumento de AP es debido, de forma primaria, a un aumento de liberación de dímeros o tetrámeros anclados a la membrana plasmática de células que expresan AP.[182].

Por otro lado, la hiperfosfatasa aislada persistente sin daño de órganos es más rara. Se ha observado en condiciones hereditarias que cursan con un incremento constitutivo del recambio óseo, como la enfermedad de Paget juvenil (mutaciones en el gen *TNFRSF11B*- OMIM *602643) [183].

Finalmente, se ha descrito una hiperfosfatasa persistente asociada a un desorden neurodegenerativo posnatal moderado-severo, caracterizada por la aparición de ataques epilépticos y déficit cognitivo. Se conoce como síndrome de Mabry (OMIM #239300) y es consecuencia de mutaciones en genes responsables de la síntesis y anclaje de la AP a la membrana (GPI) [184].

Hipofosfatasemias:

Los valores de AP en plasma inferiores a los normales puede deberse a una desnutrición proteica, deficiencia de magnesio, hipotiroidismo, escorbuto e hipofosfatasa [185].

1.9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP

Los ratones genéticamente modificados son una potente herramienta para entender la función de genes y proteínas, además de tener utilidad como modelos de enfermedades humanas. Entre los modelos más comunes de manipulación se encuentran los animales *knockout* y *knockin*.

Entre los ratones *knockout* para TNAP se encuentran:

- Convencionales: Hay dos ratones *knockout* para TNAP denominados $Alpl^{tm1Sor}$ y $Alpl^{tm1Jlm}$, que fueron independientemente desarrollados por los grupos de Soriano [49] y Millán [186], mediante recombinación homóloga. Ambos presentan altos niveles de sustratos naturales de TNAP, PPI y PLP, que son eliminados por orina. Aproximadamente, a los 6 días de vida manifiestan un crecimiento deficiente, desarrollan ataques epilépticos como consecuencia de los niveles altos de PLP en sangre, apnea y finalmente mueren alrededor de las 2 semanas [146]. Respecto a esto, inyecciones intraperitoneales diarias de piridoxal a ratones $Alpl^{-/-}$ consiguen una mejora en los ataques epilépticos, doblando la esperanza de vida, como mínimo [145]. Además presentan una mineralización ósea disminuida y tienen un timo apoptótico, raíces de nervios descendentes finas, menor número de leucocitos en sangre y acúmulo de gases en el intestino delgado [186], imitando la HPP infantil. Por otro lado, los ratones $Alpl^{+/-}$ son sanos y fértiles, sin presentar anomalías en condiciones normales.
- Químicamente inducidos: mutantes generados por mutagénesis inducida por N-etil N nitrosourea (ENU), para obtener modelos animales de HPP adulta, la mayoría con mutaciones puntuales de nucleótidos [187, 188]. Es una herramienta importante para entender las variaciones en la severidad de la HPP. Estos ratones tienen un desarrollo esquelético inicial normal, al igual que su crecimiento y esperanza de vida. Además, no padecen ataques epilépticos. No obstante, presentan un inicio tardío de enfermedad esquelética, con osificación endocontral y mineralización ósea defectuosa que conduce a artropatías de rodillas y hombros.
- Condicionados: La generación de una línea de ratones floxados, $Alpl^{flox/flox}$ por parte del grupo de Millán, es una herramienta con futuro prometedor para entender la función de la TNAP en células neuronales, endoteliales, renales e incluso leucocitarias, al cruzar con líneas transgénicas Cre apropiadas [189]. Hasta el momento solo se ha generado una línea específica para estudios de TNAP en hueso [$Alpl^{flox/flox}; Col1a1-Cre$]. *Col1a1* codifica la cadena pro- α 1 del colágeno tipo 1.

Los transgénicos con sobreexpresión de TNAP o knockin están siendo empleados en el estudio de la mineralización ósea (mediante expresión de cDNA de TNAP humano bajo el control del promotor *Col1a1* [141]) y de la calcificación vascular de la media, debida a la transdiferenciación de células del músculo liso vascular hacia un fenotipo osteogénico [190] (insertando

cDNA de TNAP humano por recombinación homóloga en el locus Hprt y cruzado con una línea Cre específica de musculo liso, SM22-Cre) [191].

2. SISTEMA INMUNOLÓGICO

El propósito principal del sistema inmunológico (SI) es la protección del cuerpo humano frente a enfermedades infecciosas, para lo que ha ido evolucionando a la vez que lo han hecho los microorganismos. Las respuestas de este sistema implican el reconocimiento de patógenos y la reacción correspondiente para tratar de eliminarlos. Por otra parte, el SI ayuda al hospedador a eliminar no solamente microorganismos, sino también sustancias alergénicas o tóxicas que penetran a través de las mucosas del organismo, así como células tumorales [192, 193].

Tradicionalmente la respuesta inmunológica se ha dividido en dos categorías:

-Respuesta inmune innata: representa la primera línea de defensa del organismo. Genera una respuesta inmediata frente a infecciones microbianas, además de ser crucial para la activación del SI adaptativo. Las células involucradas en el sistema inmune innato son: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y células epiteliales [194]. Se desarrollará en mayor detalle a continuación.

-Respuesta inmune adaptativa o adquirida: mediada por linfocitos T, que son activados por células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*), y los linfocitos B, productores de anticuerpos. Es capaz de generar células de memoria frente a un antígeno. Su principal diferencia con la respuesta innata reside en que a diferencia de la primera, y como se discutirá más adelante, posee una enorme diversidad de receptores capaces de reconocer virtualmente cualquier antígeno. Otra particularidad que la diferencia es el hecho de que la respuesta es más lenta, pues se requiere una expansión clonal de los linfocitos T y B con receptores específicos para ese antígeno, lo cual determina que se requiera aproximadamente unos 5 días para que la respuesta adaptativa sea capaz de eliminar al patógeno en cuestión [195].

2.1. Respuesta inmune innata

La importancia como mecanismo de defensa de la respuesta inmune innata se puede deducir por el hecho de que es una respuesta no solamente confinada a

vertebrados, como es el caso de la respuesta adaptativa, sino que está presente en todo tipo de plantas y animales [196]. La primera línea de defensa del organismo son las barreras anatómicas y fisiológicas entre las que se encuentran la piel y otras superficies epiteliales, destacando aquellas que revisten el pulmón o el intestino. Aparte de esta barrera física, las superficies están recubiertas de una capa de moco que protege contra patógenos. Otros mecanismos primarios de defensa incluyen el aclaramiento mucociliar o un pH gástrico bajo [197]. Formando parte también de esta respuesta nos encontramos con componentes humorales bien caracterizados como son las proteínas del sistema del complemento, la proteína de unión a LPS (LBP, *LPS binding protein*) o diversas defensinas, péptidos antimicrobianos presentes en la capa de moco. Finalmente, participan diversos tipos celulares, concretamente: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, todos los cuales tienen un precursor mielóide común (HSC, *haematopoietic stem cells*), y células epiteliales [195]. Por su interés en este trabajo nos vamos a centrar en dos de ellas: monocitos/macrófagos y neutrófilos.

Como ya se ha comentado con anterioridad, una de las principales diferencias existentes entre la respuesta inmune innata y adaptativa reside en la rapidez de la respuesta. Considerando, por un lado, el tiempo que conlleva la expansión clonal de células T y B, y, por otro lado, que una bacteria tiene un tiempo de duplicación de una hora (lo que implica 20 millones en un solo día), es preciso reconocer que durante las críticas primeras horas y días de exposición a un nuevo patógeno, dependemos del sistema inmune innato para nuestra protección [197]. Otra diferencia estriba en la estrategia empleada en el reconocimiento de antígenos. A diferencia de la adaptativa, la respuesta innata cuenta con un repertorio reducido de receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *pattern-recognition receptors*) (los principales tipos así como sus sustratos aparecen recogidos en la Tabla 2), que tienen la peculiaridad de que detectan estructuras comunes y conservadas presentes en gran número de patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Estos receptores también van a reconocer moléculas que son indicativas de un daño celular por estrés o infección (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) [198]). El reconocimiento puede tener lugar por un mecanismo celular intrínseco, mediado por receptores citosólicos que operan en cualquier célula susceptible de ser infectada (detectan por ejemplo RNA viral); o extrínseco, mediada por PRRs que son expresados en células especializadas en el reconocimiento de patógenos. Existen tres grandes tipos de receptores tipo PRR: los TLRs (receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*), los NLRs

(receptores tipo NOD; *NOD-like receptors*) y los RLRs (receptores tipo RIG; *RIG-1-like receptors*). Otra estrategia de reconocimiento es la detección de características funcionales, es decir, aquellas que permiten indicar indirectamente la presencia de un patógeno, como los factores de virulencia. Un ejemplo es la activación del inflamasoma en respuesta a exotoxinas formadoras de poros. El resultado, en conjunto, es la inducción de respuestas inflamatorias y de las defensas innatas del organismo [195, 199].

Tabla 2. Principales tipos de receptores del sistema inmune innato [200]

PRRs	Localización	Ligando
TLRs		
TLR1	Membrana	Triacil-lipoproteína
TLR2	Membrana	Lipoproteína
TLR3	Endolisosoma	dsRNA
TLR4	Membrana	LPS
TLR5	Membrana	Flagelina
TLR6	Membrana	Diacil-lipoproteína
TLR7 (TLR8 humano)	Endolisosoma	SsRNA
TLR9	Endolisosoma	CpG-DNA
TLR10	Endolisosoma	Desconocido
TLR11	Membrana	Moléculas tipo profilina
NLRs		
NOD1	Citoplasma	iE-DAP
NOD2	Citoplasma	MDP
RLRs		
RIG-1	Citoplasma	dsRNA (corto)
MDA5	Citoplasma	DsRNA (largo)

TLRs= toll-like receptors, NLRs= nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, dsRNA= doubled stranded RNA, SsRNA= single stranded RNA; iE-DAP= D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid, MDP= muramyl dipeptide

2.1.1. Monocitos

En términos generales, los monocitos circulan en sangre, aunque también se encuentran en médula ósea y bazo. Cuando estas células migran a los tejidos se pueden diferenciar en células dendríticas o macrófagos [201]. En situación basal, existen dos poblaciones de monocitos en sangre de ratón: Ly6C^{hi}, inflamatorios o clásicos (que equivalen a CD14⁺⁺ CD16⁻), los cuales expresan altos niveles de CCR2 (*C-C chemokine receptor type 2*); y Ly6C^{low} (equivalente a CD14⁺ CD16⁺⁺ en humanos) o alternativos, que responden a CXCRCL1 (*chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*) [202]. Estos monocitos presentan funciones fagocíticas y efectos antiinflamatorios

respectivamente. En el caso de los humanos, se distingue un tercer subtipo conocido como intermedio (CD14⁺ CD16⁺), con características a medio camino entre los subtipos clásico y alternativa [203]. A diferencia de los monocitos alternativos, que pueden vivir entre 5 y 7 días, los Ly6^{hi} tienen una vida corta de tan solo unas 8 horas [204]. Un resumen de sus funciones aparece recogido en la Tabla 3. Los monocitos Ly6C^{low} se pueden considerar como células totalmente diferenciadas, cuya función será la de patrullar el endotelio vascular y monitorizar su integridad. Es frecuente que se les conozca también como macrófagos vasculares, aunque son similares al resto de monocitos y no expresan los genes característicos de macrófagos maduros [205]. Su activación no desencadena una respuesta inflamatoria de gran intensidad, sino que permite regenerar el endotelio. De hecho, son poco respondedores a productos bacterianos pero si actúan ante señales de daño. Por su parte, los monocitos *bona fide* se encuentran también en sangre, médula ósea y bazo, y aunque no puedan generar una respuesta inflamatoria, están preparados para ser reclutados hacia distintos tejidos. Existe dentro de esta última categoría un tipo especial de monocito, recientemente descrito, que se conoce como monocitos tisular. Tiene la capacidad de entrar en órganos no linfoides sin que ello implique su diferenciación bien a macrófago o a célula dendrítica. Una vez aquí, regulan positivamente el MHC tipo II, recirculando a continuación a órganos linfoides donde actuarán como APC, conservando genes propios de los monocitos [206].

Tabla 3. Funciones de los monocitos en condiciones estables y en inflamación [202]

Poblaciones	Función	
	Estado estacionario	Inflamación
Ly6C ⁺	Reposición de macrófagos derivados de monocitos (intestino, piel, corazón y pulmón)	Diferenciación a M1 e iniciación de la respuesta inflamatoria
	Diferenciación a Ly6C ⁻ en sangre y médula ósea	Monocitos tisulares
Ly6C ⁻	Patrullar y vigilar el endotelio vascular	Promueven la reparación tisular en isquemia de miocardio e infección por <i>Listeria monocytogenes</i>
	Detección de ácidos nucleicos virales	

2.1.2. Macrófagos

Con el paso de los años, las investigaciones llevadas a cabo en macrófagos han puesto de manifiesto su enorme complejidad y heterogeneidad, la cual trasciende su caracterización inicial como mera célula fagocítica. De especial interés merecen los estudios recientes relativos a su origen así como su plasticidad.

Los macrófagos residentes pueden encontrarse prácticamente en cualquier tejido del organismo. De hecho, en cada tejido, encontramos macrófagos con un perfil transcripcional diferente, consecuencia, precisamente, del microambiente presente en ese tejido. Esto determina la gran heterogeneidad de los macrófagos residentes, que adquieren nombres distintos en función de su localización, por ejemplo, osteoclastos (hueso), macrófagos alveolares (pulmón), histiocitos (tejido conectivo) o células de Kupffer (hígado) entre otros [202]. Sin embargo, las funciones que desempeñan, en general, son comunes a todos los tipos descritos e incluyen el mantenimiento de la homeostasis mediante la respuesta a cambios internos y externos en el organismo, no solamente ejerciendo su acción como fagocitos frente a patógenos y células muertas o senescentes, sino también a través de acciones reguladoras y reparadoras [207]. En 2013, Wang y col. realizaron una caracterización de tres fuentes relevante de macrófagos para estudios *in vitro*, concretamente, bazo, médula ósea y cavidad peritoneal. El estudio de la proliferación, morfología, capacidad de fagocitosis y de presentación de antígenos y producción de citoquinas, reveló diferencias notables entre estas tres poblaciones, lo que llevó a considerarlas como poblaciones con diferentes funciones biológicas [208]. Una investigación más reciente ahondó aún más en la caracterización de estas diferencias al estudiar su polarización [209]. En esta línea, esta tesis doctoral pretende aportar algunas evidencias que subrayan las diferencias entre estos tipos de macrófagos.

Tradicionalmente, se ha considerado que el origen de estos macrófagos son los monocitos circulantes, pero estudios realizados en los últimos años han puesto en duda esta teoría al revelar dos propiedades hasta hace poco desconocidas: la existencia de progenitores embrionarios y la capacidad de los macrófagos residentes de proliferar a nivel local. La hematopoyesis primitiva tiene lugar en el saco vitelino, donde se generan macrófagos sin necesidad del precursor monocítico; y la definitiva en el embrión tiene lugar en el hígado, donde llegan los progenitores hematopoyéticos del saco vitelino. Por tanto, en este órgano se van a producir monocitos circulantes a partir de HSCs durante la embriogénesis. Estos precursores alcanzarán y colonizarán el bazo y la médula ósea, órganos en los que

van a diferenciarse. Tras el nacimiento, la hematopoyesis se traslada definitivamente a la médula ósea. A la vista de esto, se puede concluir que los macrófagos residentes pueden tener como origen bien el saco vitelino, el hígado fetal o la médula ósea. Prácticamente en todos los tejidos es posible detectar la existencia de macrófagos de diferente origen, con la salvedad del intestino, en el que todos los macrófagos derivan de monocitos circulantes. Tras la estimulación o el daño tisular, los monocitos son capaces de reemplazar los macrófagos de origen embrionario. Respecto a las localizaciones de mayor interés en este trabajo, se ha descrito un origen embrionario en los macrófagos residentes presentes en la cavidad intraperitoneal y en la pulpa roja esplénica [202, 203, 210, 211].

2.1.2.1. Activación y polarización de macrófagos

El incremento del número de macrófagos en los tejidos puede ser debido a un mayor reclutamiento a partir de monocitos circulantes, o bien por la propia proliferación de los macrófagos residentes [212]. En caso de inflamación, el mecanismo predominante es la llegada de células procedentes de la médula ósea. El estímulo inflamatorio va a provocar el reclutamiento de monocitos circulantes, tras lo cual los monocitos Ly6C⁻ van a dar lugar a macrófagos con un fenotipo similar a los macrófagos tipo 2 (M2), mientras que los monocitos Ly6C⁺ darán lugar a macrófagos tipo 1 (M1) que inician una respuesta inflamatoria y van a actuar como APCs [202, 204]. Esta distinción entre poblaciones M1/M2 fue adoptada por equivalencia con las nomenclatura empleada en linfocitos (Th1/Th2).

La activación y polarización en macrófagos es un proceso dependiente de las vías IRF (*Interferon regulatory factors*) y STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) canónica, que se encuentra regulado por miembros de la familia SOCS (*suppressor of cytokine signaling*). A continuación, se detallan los mecanismos moleculares (ver Esquema 5 y Esquema 6):

-M1: Este fenotipo se caracteriza por una alta expresión de citoquinas proinflamatorias, producción de especies reactivas de nitrógeno (NO) y oxígeno (ROS), promoción de las respuestas Th1 y una intensa actividad microbicida y antitumoral [213]. *In vitro*, este fenotipo se induce por LPS y por citoquinas como TNF- α e IFN- γ [214, 215]. La estimulación por TLRs motiva una señalización en la que intervienen dos adaptadores: Myd88, que conduce a la activación de NF- κ B y la consecuente expresión de genes proinflamatorios (TNF- α , IL1- β , IL-6, COX-2); y TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), que a su vez activa el factor de transcripción IRF3 y desemboca en la producción y secreción de

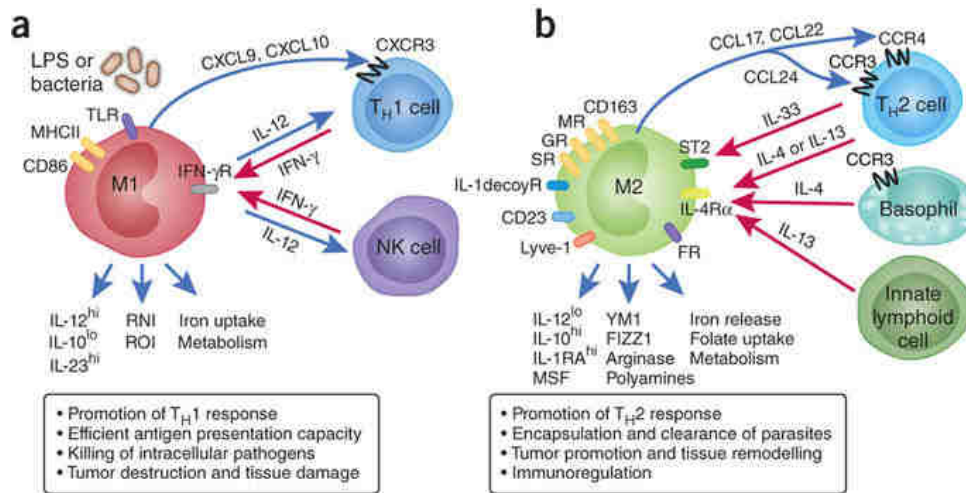
interferón de tipo I, como IFN- γ e IFN- β . Por su parte, IFN puede unirse a su receptor IFNAR (*Type I interferon receptor*) originando la activación de STAT1. Por esta vía se producen quimioquinas y citoquinas como Cxcl9, Cxcl10 o IL-12, importantes para la polarización hacia Th1. Ambos estímulos conducentes a M1 regulan positivamente SOCS3, capaz de inhibir STAT3, vía activada en M2 inducidos por IL-10 [214, 216, 217].

Desde el punto de vista metabólico, los macrófagos M1 se caracterizan por una glucólisis y síntesis de ácidos grasos incrementada, unido a un funcionamiento defectivo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), perfil que determina las características funcionales de estos macrófagos [218-220].

-M2: a diferencia de la actuación de M1, las respuestas de tipo M2 están asociadas al estado estacionario o a las respuestas de curación desencadenadas tras la inflamación. Por este motivo, los macrófagos residentes tienen un perfil de M2 y son encargados de mantener la homeostasis. Son también responsables de la respuesta a parásitos y de la angiogénesis, y están implicados en la progresión de tumores además de tener funciones inmunoregulatoras [213]. La polarización se consigue *in vitro* mediante la estimulación con IL-4, IL-13 e IL-10 [214, 215]. Los dos primeros por medio de una vía que implica la activación de STAT6 a través del receptor alfa de IL-4 (IL-4R α), mientras que IL-10 al unirse a su receptor (IL-10R) activa a STAT3. En paralelo, intervienen los factores de transcripción PPAR γ y PPAR δ que controlan una serie de genes asociados a M2 y al metabolismo oxidativo. Concretamente, STAT6 coordina y actúa de manera sinérgica con PPAR γ y KLF4 (*Krüppel-like factor 4*). El resultado es la inducción de genes como *Arg1*, que codifica la arginasa-1 y es la responsable de la producción de urea y L-ornitina a partir de L-arginina, que en M1 es empleada por la óxido nítrico sintasa para producir NO. Sin embargo, en M2, L-ornitina sirve de base para la síntesis de colágeno y de poliaminas, que serán útiles para la reparación de lesiones y la proliferación celular. También se ven inducidos otros genes como *Mrc1* (*mannose receptor C type-1*) o el propio *Pparg*. Entre las quimioquinas producidas por M2 destacan CCL17, CCL22 o CCL24, mientras que al mismo tiempo presentan una baja expresión de IL-12 y alta de IL-10, características que contribuyen a respuestas polarizadas de tipo Th2. La activación por IL-4 tiene un efecto inhibitorio sobre M1, al activarse SOCS1, un inhibidor de la vía de STAT1 característica de este tipo de macrófagos [214, 216, 217].

Si los macrófagos M1 se caracterizaban principalmente por una rápida inducción de la glucólisis e incremento en la síntesis de ácidos grasos, en el caso de los M2, encontramos una respiración mitocondrial aumentada, apoyada por una mayor oxidación de ácidos grasos. Este tipo de metabolismo es el que permite una supervivencia a más largo plazo que los M1 y las funciones típicas asociadas a macrófagos M2 [218-220].

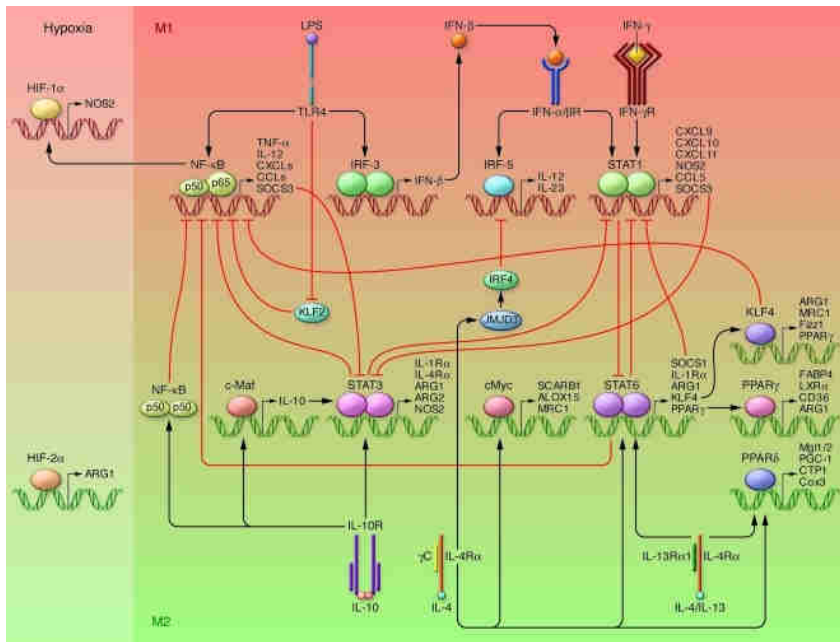
Hay que tener en cuenta que M1 y M2 representan fenotipos extremos y que en la realidad lo más probable es encontrar células con características intermedias, dados los continuos cambios en el ambiente en el que se encuentran y la continua interacción con otras vías inmunológicas. Por otra parte, es bien conocida la llamada plasticidad de los macrófagos, lo que les permite, hasta cierto punto, modificar su fenotipo, *in vivo* e *in vitro*. Incluso los macrófagos residentes diferenciados, como el caso de los presentes en la cavidad intraperitoneal, muestran cierto grado de plasticidad y pueden ser reprogramados tanto a nivel epigenético como transcripcional en respuesta a un nuevo ambiente. Sin embargo, parece que la flexibilidad es menor para M1, y que solo ocurre en circunstancias concretas, como inflamación leve. Algunos autores tienden a considerar a M1 más bien como un estado final, ya que la respuesta inflamatoria que genera, con producción de NO va a provocar la muerte celular [202, 221]. En una revisión posterior, se ha propuesto tres posibles hipótesis sobre la génesis de estas subpoblaciones, bien que subpoblaciones específicas de monocitos den lugar a macrófagos con un fenotipo específico; o que los monocitos sean reclutados en oleadas durante la respuesta inflamatoria, con lo que su polarización dependerá del microambiente concreto que se encuentren; o la última hipótesis, reforzada por los resultados de los propios autores, que defiende que los macrófagos pueden diferenciarse hacia M1 o M2 según diversas señales presentes en el ambiente [222].



Esquema 5. Características básicas de los fenotipos M1 y M2 [217]

Los macrófagos van a desempeñar un papel clave en el inicio de la respuesta inflamatoria, pero también en la fase de resolución. Esta fase se inicia con la apoptosis de los neutrófilos, que a continuación, son eliminados por macrófagos. La fagocitosis de neutrófilos apoptóticos provoca en los macrófagos un proceso de adaptación o “*re-programming*” de un fenotipo de activación clásico (M1) al alternativo (M2). Se trata de un proceso crucial para el mantenimiento de la homeostasis y para el control de la respuesta inmune [223-225].

Aunque hasta no hace mucho el concepto de memoria inmunitaria era aplicado casi en exclusividad a la respuesta inmune adaptativa, criterio que además era utilizado para distinguirla de la inmunidad innata, hoy se sabe que la respuestas innatas son de mayor intensidad en un segundo contacto con el agente patógeno. A este fenómeno se le ha dado el nombre de inmunidad innata entrenada. Una posibilidad lógica es que los microorganismos con los que entra en contacto el hospedador contribuyan al establecimiento de una reserva de “macrófagos de memoria”, que muestren una mayor reactividad al estímulo infeccioso. El mecanismo no está suficientemente descrito, pero parece que implica cambios epigenéticos relacionados con la acetilación de histonas [202, 226, 227].



Esquema 6. Vías de señalización implicadas en la polarización M1/M2 [216]

2.1.3. Neutrófilos

Los neutrófilos son un tipo de leucocito polimorfonuclear, bien conocido por su papel durante la inflamación aguda. En sangre humana, este tipo celular representa un 50-70% del total de células circulantes, mientras que en ratón el porcentaje es marcadamente menor, entre un 10-30% [228]. Se generan en la médula ósea bajo la influencia de determinados factores de crecimiento y citoquinas que conducen a las células pluripotenciales hematopoyéticas a diferenciarse en mieloblastos. Conforme este tipo celular madura hacia el estado final de neutrófilo, va a acumular una serie de proteínas en distintos tipos de gránulos, cuyas características aparecen resumidas en la Tabla 4, ordenadas según orden de liberación [229]. Tras la activación, los gránulos se movilizan y fusionan con la membrana plasmática o con fagosomas liberando su contenido. La movilización de los gránulos está regulada por el calcio [230]. En estos gránulos, según su composición, podemos diferenciar [231, 232]:

- Péptidos catiónicos antimicrobianos, que incluyen las defensinas y catelicidinas como LL-37. También incluye proteínas de gran longitud, como BPI (*Bactericidal/permeability increasing protein*), capaz de unirse al LPS y en consecuencia aumentar la permeabilidad bacteriana mediante la hidrólisis de fosfolípidos.

-Enzimas proteolíticas: una de las más comunes es la lisozima, presente en varios tipos de gránulos, cuya acción permite la destrucción de la pared bacteriana, aunque, sorprendentemente, es un efecto independiente de la acción enzimática. Además tenemos las serprocidinas, entre las que se incluyen la elastasa, catepsina G o PR3 (*Proteinase 3*).

-Proteínas que actúan como quelantes de metales que son esenciales para los microorganismos, ejemplo de actuación de la lactoferrina, que secuestra hierro o la calprotectina, que hace lo propio con el zinc.

Sin embargo, las acciones mediadas por los neutrófilos no se limitan solamente a la producción de estos péptidos, sino que emplean otros mecanismos para llevar a cabo sus acciones. Uno de los más potentes es la activación del complejo NADPH oxidasa. Los componentes del mismo se encuentran en estado latente en células en reposo, pero se activan en respuesta a mediadores proinflamatorios, por la presencia de microorganismos, la fagocitosis o la activación de PRRs. Un proceso clave será la fusión de gránulos específicos con el fagosoma, cuando NADPH oxidasa se ensambla con el flavocitocromo b558, el cual se localiza en la membrana de estos gránulos y constituye el centro catalítico. Este complejo lleva a cabo la producción de ROS como el anión superóxido, el cual, a su vez, sirve de precursor para la obtención del peróxido de hidrógeno, entre otros. También pueden reaccionar con NO en el sitio de la inflamación, lo que genera peroxinitrito, un oxidante muy potente. Por acción de la mieloperoxidasa (MPO) se obtiene ácido hipocloroso que al reaccionar con grupos aminos da lugar a las cloraminas, agentes antimicrobianos de especial relevancia en el fagosoma [233-235]. Por otra parte, los neutrófilos son fagocitos, y como tales pueden captar restos celulares y microorganismos que serán reconocidos por un mecanismo directo, mediado por reconocimiento de PAMPs, o de opsoninas (inmunoglobulinas o componentes del sistema del complemento) que son reconocidos mediante receptores [236]. Finalmente, ante determinados estímulos, los neutrófilos forman trampas extracelulares (NET, del inglés *neutrophil extracellular traps*), por medio de un proceso que se conoce como NETosis, el cual conduce a la liberación de cromatina descondensada en el espacio extracelular. Suele conducir a la muerte del neutrófilo pero también pueden liberarse las NET en una forma más rápida (conocida como NETosis vital). Las fibras que se generan contienen histonas y numerosos componentes de los gránulos con actividad microbicida, como elastasa, MPO, catepsina G, lactoferrina, LL-37 o gelatinasa entre otros. Curiosamente, tanto la cromatina como las histonas poseen una

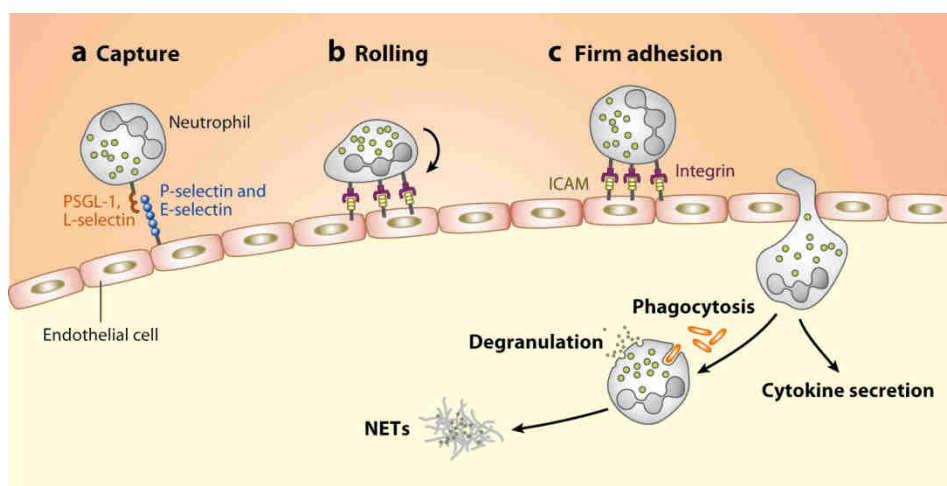
capacidad antimicrobiana intrínseca en el núcleo. El DNA puede actuar como un agente quelante por su esqueleto de fosfodiéster [237]. Sin embargo, la NETosis parece desempeñar un papel negativo en algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, glomerulonefritis y el lupus eritematoso entre otros, al exponer moléculas propias a nivel extracelular [238, 239].

Tabla 4. Composición y características de los gránulos de los neutrófilos, en orden de liberación tras su activación

Nombre	Composición	Función
Secretores	Moléculas de adhesión (integrinas- β 2) Fosfatasa alcalina	Permiten la unión fuerte
Gelatinosos	Metaloproteasas	Ayudan romper la lámina basal y a la extravasación
Específicos	Lactoferrina Flavocitocromo b558	Función antimicrobiana. La fusión permite el ensamblaje de la maquinaria NADPH oxidasa y la producción de ROS
Azurófilos	MPO Elastasa Catapsina G BPI PR3	Función antimicrobiana

La migración de neutrófilos a lugares de infección o inflamación se produce como consecuencia de la liberación de señales bacterianas así como otras producidas por el propio organismo. En esta situación, el endotelio responde produciendo una serie de moléculas de adhesión de la familia ICAMs (*intracellular adhesion molecules*), como P-selectina y E-selectina. Los neutrófilos que se encuentran circulando en sangre expresan de manera constitutiva proteínas que van a unirse a estas selectinas: PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) y L-selectina. Cuando se da esta unión, el neutrófilo comienza a desplazarse unido al endotelio en un proceso denominado “rodamiento”. Durante este proceso, se activan una serie de quinasas, como Src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*), Syk (*Spleen tyrosine kinase*), PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinases*) o p38 (*p38 mitogen-activated protein kinases*). A continuación, se produce la “unión firme” del neutrófilo al endotelio, etapa que está mediada por las integrinas β 2 y que tiene

como resultado el “arresto” de la célula. La célula se aplana y adopta una forma polarizada que permite la migración lateral a lo largo del endotelio en busca del lugar idóneo para la transmigración o diapédesis. La transmigración puede producirse por vía paracelular o transcelular, siendo el primer mecanismo el empleado preferentemente. Las integrinas se unen a sus receptores endoteliales pertenecientes a la superfamilia ICAM-1. Si a este proceso sumamos la continua producción de quimioquinas y citoquinas en el foco de la inflamación, tenemos como resultado cambios en el citoesqueleto del neutrófilo y movimiento del mismo a lo largo de un gradiente quimiotáctico. El neutrófilo se va a desplazar hacia el microorganismo invasor siguiendo citoquinas como IL-8 y quimioquinas derivadas del patógeno. La unión de estas moléculas a sus receptores desencadena la activación de las vías AMPK/ERK, se libera ATP que de manera autocrina actúa sobre sus receptores purinérgicos en un proceso crítico para la respuesta efectiva. Cuando se alcanza el pico en la concentración de quimioquinas, es decir, no existe ya gradiente, la célula se detiene y libera todo su arsenal antimicrobiano [232, 240, 241]. El proceso se resume en el Esquema 7. Entre las sustancias quimioatrayentes destacan algunos de naturaleza lipídica, como el leucotrieno B₄, el más potente de los que se conocen; pueden ser péptidos N-formilados, como FMLP (*N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*); anafilotoxinas del complemento como C5a y, por último, quimioquinas, una familia de citoquinas de bajo peso molecular. La respuesta a estas quimioquinas se hace siguiendo una jerarquía, lo que permitiría distinguir quimioquinas que actúan en una fase inicial y otra tardía [242].



Esquema 7. Esquema de la migración y activación del neutrófilo [232]

La regulación de la actividad de los neutrófilos ha de ser muy precisa, debido a que son muy efectivos para eliminar al agente patógeno, pero igualmente producen daños en el organismo. Aunque se consideraba al neutrófilo como una célula de vida corta (6-8 horas), estudios recientes señalan que pueden persistir durante más tiempo hasta que alcanzan la senescencia y son eliminadas por bazo, hígado o médula ósea. En situación de inflamación, la supervivencia del neutrófilo se puede ver aún más incrementada por la liberación de determinados factores provenientes de macrófagos como GM-CSF, G-CSF o TNF- α , capaces de inhibir la apoptosis de neutrófilos [196]. Precisamente la relación entre macrófagos y neutrófilos es muy estrecha, y así lo demuestra el hecho de que los neutrófilos sean esenciales para el reclutamiento y la polarización de los monocitos [243]. Ambos tipos celulares desempeñan conjuntamente una labor fundamental en la regulación de la inflamación. Así, los neutrófilos en inflamación inducen un fenotipo M1, pero, a su vez, los macrófagos pueden también inducir la apoptosis del neutrófilo cuando así se requiera, el cual será eliminado por macrófagos residentes. Este mecanismo de fagocitosis va a provocar la adquisición de un fenotipo M2 en los macrófagos, lo que contribuye a la resolución de la inflamación [196].

Comúnmente consideradas simplemente como células efectoras destinada a realizar la fagocitosis antes de entrar en apoptosis, los neutrófilos han demostrado flexibilidad para ajustarse a las condiciones del ambiente y para desempeñar diferentes funciones [244]. Estudios llevados a cabo en neutrófilos humanos *in vitro*, en pez cebra y en ratón, han mostrado que los neutrófilos pueden realizar una migración transendotelial inversa, es decir, un desplazamiento desde tejidos inflamados de vuelta hacia la circulación. Estos neutrófilos parecen ser más resistentes a la apoptosis, con lo que permanecen más tiempo en la circulación. Los neutrófilos que experimentan esta migración podrían representar un mecanismo para preservar los neutrófilos cuando no son necesarios aunque también podrían actuar diseminando la inflamación a otros órganos [245, 246]. Por otra parte, se han detectado en algunos tejidos poblaciones de neutrófilos que permanecen en ellos de forma transitoria, como en el pulmón, son los llamados neutrófilos marginales. Incluso se ha hablado de la existencia de poblaciones especializadas y se han descrito neutrófilos N1/N2 por paralelismo con los macrófagos, representativos de un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio respectivamente. Sin embargo, no se sabe con certeza si estos neutrófilos son de hecho poblaciones distintas, estados de activación diferentes o si, simplemente, sus características

cambiantes se deben a la interacción con otras células del sistema inmune [247, 248]. Los neutrófilos han suscitado un creciente interés en los últimos años, fruto de lo cual, ahora se conocen nuevas funciones además de su conocida actividad contra bacterias, hongos y en el desarrollo de la reacción inflamatoria. Así, los neutrófilos parecen desempeñar una labor en la defensa antiviral y contra patógenos intracelulares y contribuir al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Respecto a esta última, los neutrófilos facilitan la producción de anticuerpos y la maduración de células B de la zona marginal esplénica en respuesta a señales microbianas, aunque no ha quedado demostrado en humanos. También regulan la función de las células T dada su capacidad para actuar bien regulando la activación de células dendríticas, bien comportándose ellos mismos directamente como APC [249].

3. PANCREATITIS AGUDA

3.1 Generalidades

La pancreatitis aguda es un proceso de inflamación reversible y agudo del páncreas. Es una patología muy común en la que puede verse afectado no solo el páncreas, sino que puede conducir a la afectación de otros órganos e incluso al fallo multiorgánico. Sin embargo, en la mayoría de casos (80%) la patología se presenta como un cuadro moderado y autolimitado, y solo en determinadas ocasiones puede presentar un curso rápido e incluso fulminante, con un substancial incremento de la mortalidad [20, 250]. Tiene una enorme relevancia clínica ya que se trata de una de las enfermedades digestivas que más comúnmente van a requerir la hospitalización con una incidencia, además, que va en aumento [19]. Un estudio publicado en 2017 mostró una incidencia de pancreatitis aguda en Europa que oscilaba entre 4,6 a 100 casos por cada 100.000 habitantes, siendo más elevada en los países del este frente a los del norte [251]. La mortalidad asociada a esta enfermedad es menor del 5%, sin embargo, este porcentaje asciende hasta un 20-25%, en el caso de pancreatitis severa que requiera cuidados intensivos [252].

El diagnóstico de la pancreatitis aguda se basa en la Clasificación Revisada de Atlanta (2012), la cual establece que deben de cumplirse al menos dos de estos tres criterios diagnósticos: 1) existencia de dolor abdominal sugerente de pancreatitis aguda; 2) actividad lipasa o amilasa plasmática al menos tres veces mayor que el

límite superior establecidos para valores normales; 3) evidencias características de pancreatitis aguda obtenidas por tomografía computerizada (TC) con contraste, o menos frecuentemente, resonancia magnética o ecografía transabdominal [253, 254]. En cuanto a la gravedad de la patología, comúnmente se diferencia entre pancreatitis aguda leve, moderada, severa y crítica. Esta clasificación (Tabla 5), importante para identificar a aquellos pacientes que necesiten un tratamiento rápido agresivo o ser transferidos a cuidados especializados, tiene en cuenta la existencia de complicaciones locales y sistémicas, así como la existencia de fallo orgánico transitorio o persistente [255].

Tabla 5. Clasificación de los distintos grados de severidad de la pancreatitis aguda [255]

Categoría	Complicaciones locales		Complicaciones sistémicas
Leve	No complicación pancreática	+	No fallo orgánico
Moderada	Complicación pancreática estéril	o	Fallo orgánico transitorio
Severa	Complicación pancreática infecciosa	o	Fallo orgánico persistente
Crítica	Complicación pancreática infecciosa	+	Fallo orgánico persistente

En la epidemiología de PA se pueden identificar algunos factores:

Edad y sexo

Igual proporción de hombres y mujeres desarrollan pancreatitis aguda, sin embargo, difieren en cuanto a la causa más frecuente de la misma. En los hombres la causa más probable es el consumo de alcohol, pero en las mujeres lo más común es que sea debida a cálculos biliares, enfermedades autoinmunes o que sea idiopática [256, 257]. La incidencia de pancreatitis aguda aumenta con la edad, especialmente a partir de los 65 años [258].

Raza

Se han descrito algunas diferencias en la incidencia de pancreatitis aguda en función de la raza y el grupo étnico. El riesgo es entre 2-3 veces mayor en individuos de raza negra respecto a los de raza blanca. Las causas concretas no se conocen, pero parecen estar relacionadas con la dieta o la genética entre otros [257, 259].

Factores genéticos

Todos los genes descritos hasta la fecha que se asocian con una mayor susceptibilidad a la pancreatitis aguda están relacionados con el mecanismo de regulación del tripsinógeno y la función de las células acinares. Es el caso de las mutaciones en los tres genes del tripsinógeno (*PRSS1*, 2 y 3); *CTCR*, que codifica la quimotripsina C, encargada de destruir el tripsinógeno activado de manera prematura; *PSTI* (*pancreatic secretory trypsin inhibitor*) una proteína de fase aguda que actúa como inhibidor específico de la tripsina, entre otros [260, 261].

Obesidad

La existencia de obesidad es un factor pronóstico de mortalidad, de complicaciones locales y sistémicas, así como de la severidad de la pancreatitis, como se demostró en un meta-análisis publicado en 2004. La obesidad amplifica la respuesta inflamatoria observada en esta patología, favoreciendo la aparición de complicaciones asociadas a la pancreatitis [262, 263].

Diabetes y otras enfermedades

La relación entre diabetes tipo II y pancreatitis aguda ha sido puesta de relieve por varios estudios, que mostraron un riesgo incrementado en pacientes diabéticos. El riesgo se veía reducido por el tratamiento con insulina [264, 265]. El riesgo de padecer pancreatitis aguda es también mayor en pacientes celíacos [266] o con enfermedad inflamatoria intestinal [267].

Hipertrigliceridemia

Aunque los casos de pancreatitis provocados por la hipertrigliceridemia no son muy frecuentes (9%), la existencia de esta condición aumenta el riesgo de sufrir pancreatitis aguda aproximadamente en un 14% [268]. Un estudio reciente establece que este riesgo aumenta especialmente cuando el rango de triglicéridos se encuentra entre 500-1000 mg/dL [269].

Cálculos biliares

Son la principal causa de pancreatitis. El riesgo de padecer pancreatitis aguda asociada a los cálculos biliares aumenta con la edad y es de mayor severidad en el caso de hombres ancianos [270].

Tabaco

El tabaco puede aumentar el riesgo de pancreatitis. Uno de los posibles mecanismos se relaciona con dos de los principales metabolitos de los cigarrillos: nicotina y nitrosamina, capaces de alterar la acción de las células acinares y afectar la secreción de zimógenos [271]. El incremento del riesgo se ha descrito que es dosis dependiente [272].

Consumo de alcohol

El consumo de alcohol se considera una de las principales causas de la pancreatitis aguda, concretamente la segunda causa por detrás de los cálculos biliares. Es frecuente en estos pacientes la progresión de episodios agudos que conducen a una pancreatitis crónica [273]. Un consumo por debajo de 40 g/día supone una reducción de este riesgo en mujeres. Por encima de este nivel, el riesgo de padecer cualquier tipo de pancreatitis se incrementa [274]. El mecanismo por el cual el alcohol puede provocar esta enfermedad no se conoce con exactitud. Entre otras acciones, el etanol tiene efectos tóxicos sobre las células estrelladas pancreáticas; incrementa el contenido enzimático en las células acinares, al tiempo que desestabiliza los orgánulos que las contienen, facilitando su activación prematura; y favorece la precipitación de proteínas y la sensibilización del páncreas a otros factores de riesgo, entre otros mecanismos [275].

Fármacos

Algunos fármacos pueden inducir la aparición de pancreatitis aguda que en la mayor parte de los casos suele ser leve o moderada. Representan un 2% de los casos. El mecanismo por medio del cual pueden inducir la pancreatitis incluye efectos citotóxicos y metabólicos, acumulación de metabolitos tóxicos, reacciones de hipersensibilidad u obstrucción del conducto biliar [276]. Entre otros fármacos, se han descrito estos efectos con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina [277], estatinas [278] o diuréticos [279].

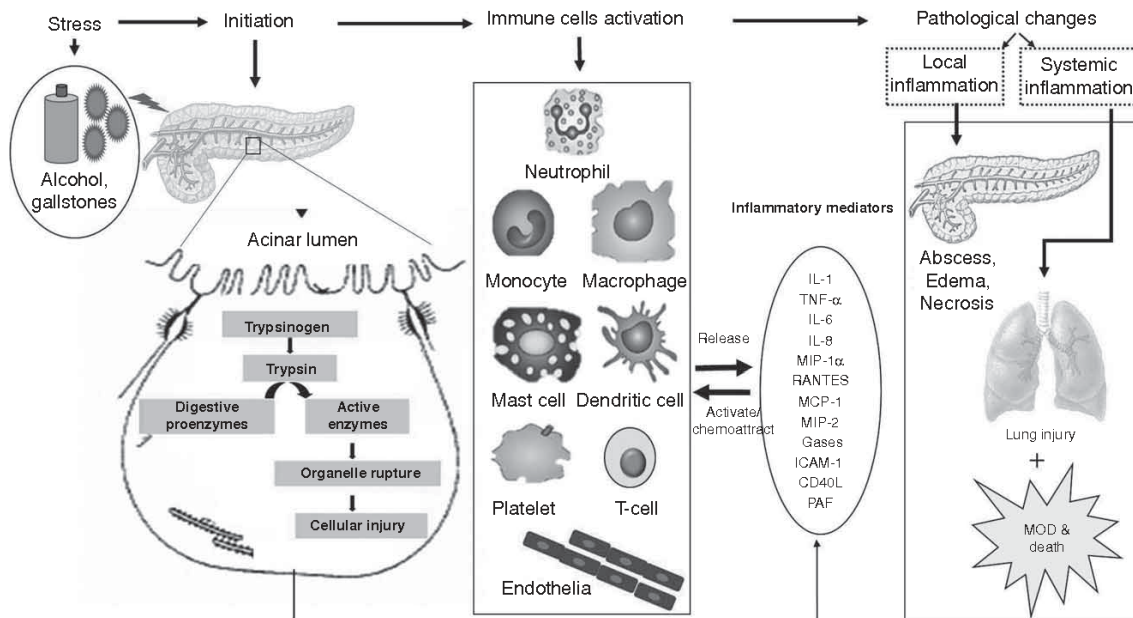
4.2. Patogénesis de la pancreatitis aguda

La pancreatitis aguda es un proceso patológico caracterizado por la existencia de procesos inflamatorios que afectan no solamente al páncreas sino también a órganos distantes. En condiciones normales, la mayor parte de enzimas pancreáticas son producidas en forma de zimógenos, acumulados además en gránulos para evitar su contacto con otros compartimentos celulares y prevenir su activación prematura. Con la excepción de amilasa y lipasa que se secretan ya en forma activa, la activación de los zimógenos en el duodeno comienza con la

conversión del tripsinógeno a tripsina por acción de la enteroquinasa. A continuación, la tripsina se encarga de convertir el resto de zimógenos en sus formas activas requeridas para la correcta digestión [280, 281]. Otros como el pepsinógeno, al contacto con el ácido clorhídrico procedente del jugo gástrico generan su forma activa, en este caso, pepsina. La secreción de estos zimógenos se encuentra controlada por el calcio citosólico. Cuando se produce un incremento sostenido del mismo se puede producir una activación y secreción prematura de estas enzimas. Esta circunstancia se ha identificado como una de los primeros eventos de la pancreatitis aguda [282]. Las respuestas patológicas que desencadenan las células acinares van tener un papel central en la evolución de esta patología. Una de las primeras características observadas es la reducción de la secreción pancreática hacia el intestino. La ruptura de las uniones apicales intercelulares y la exocitosis basolateral (inhibida en situación normal) permiten la entrada de enzimas en el espacio intersticial, mecanismos que en conjunto justifican el incremento en los niveles plasmáticos de las enzimas observadas en los primeros estadios de la pancreatitis [283]. La formación excesiva de enzimas digestivas va a generar un proceso de autodigestión del páncreas exocrino que tendrá como resultado la necrosis de los acinos y de los islotes pancreáticos, vasculitis necrotizante y la esteatonecrosis intersticial [284].

Serán estas células acinares las que generen en respuesta las primeras señales inflamatorias responsables de la activación de la respuesta inmune (los mecanismos involucrados aparecen recogidos en el Esquema 8). Estudios experimentales han revelado que la activación de diversas vías de señalización en estas células, principalmente NF- κ B, AP-1 (*Activating factor 1*), STAT, p38, ERK, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), conduce a la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, [285]. Se ha comprobado que TNF- α induce de manera prematura la activación de proteasas y la necrosis de células acinares [286]. Pero también se generan quimioquinas que atraen a células del sistema inmune, especialmente neutrófilos y macrófagos, siendo CXCL1, CXCL2, IL-8, MCP-1, MIP-1 α y MIP-2, las más importantes. La muerte de células acinares, juntamente con la participación de los mediadores anteriormente descritos, va a motivar la activación de células del sistema inmune gracias al reconocimiento de los DAMPs liberados por estas células por diversos PRRs, como TLRs o NLRs, los cuales actúan conjuntamente con el complejo del inflammasoma [287]. Para favorecer la infiltración en el tejido de los leucocitos activos, se produce un incremento en la expresión de moléculas de adhesión de la familia ICAM-1 en el endotelio, fundamental para la adhesión y

migración de los neutrófilos. Junto a esta, P-selectina y LFA-1 (*lymphocyte function antigen 1*) también van a desempeñar un papel importante [22].



Esquema 8. Mecanismos de la inmunidad innata implicados en la PA [22]

El resultado de todos estos procesos es una amplificación de la respuesta inflamatoria, con afectación de otros órganos e incluso fallo multiorgánico en los casos más severos, en la que van a desempeñar un papel primordial las células del sistema inmune innato:

Neutrófilos

Constituyen la primera línea de defensa. Son las primeras células que van a migrar al espacio pancreático intersticial tras la inducción de la pancreatitis. Su importancia en la patogénesis de la pancreatitis aguda se demuestra por el hecho de que la reducción de su número, motivada por la administración del anticuerpo anti-Gr-1, tiene un efecto protector notable en varios modelos experimentales de esta patología [288, 289]. Son atraídos y activados por medio de quimioquinas que proceden de los propios acinos o de leucocitos infiltrados. Entre esas quimioquinas destacan CXCL2 y MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), cuyas acciones están medidas por CXCR2. Utilizando ratones *knockout* de este receptor se comprueba una menor infiltración de neutrófilos y un menor daño en los acinos. La inhibición

de la quimiotaxis de los neutrófilos en este modelo fue suficiente también para prevenir la infiltración de los monocitos, lo cual refleja el papel de los neutrófilos en la quimiotaxis de estas células [25]. Los neutrófilos juegan un papel patológico en la pancreatitis aguda en parte por medio de la producción de ROS [290]. Además, la liberación del contenido de sus gránulos inducido por MIP-2 a nivel local y la capacidad para activar de forma prematura el tripsinógeno potencian el daño tisular en la fase temprana de la pancreatitis aguda [22]. Los neutrófilos contribuyen también al desarrollo de la pancreatitis aguda severa porque son capaces de extender su tiempo de vida, incrementando la producción de citoquinas y la migración celular, y retrasando la apoptosis que facilitaría la resolución de la inflamación [23].

Monocitos/macrófagos

El flujo de monocitos/macrófagos hacia el páncreas está mediado mayoritariamente por MCP-1, el cual es producido por las células acinares o bien por los neutrófilos infiltrados. El proceso de migración y activación de los macrófagos es un evento secundario a la llegada de los neutrófilos [22]. La activación de los macrófagos está mediada principalmente por MCP-1, MIP-1 α , y RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), y de esta activación se deriva en gran medida la severidad de la pancreatitis, pues sus acciones están relacionadas con la apoptosis y necrosis de células acinares [24]. Una vez activos, producen citoquinas proinflamatorias y mediadores como TNF- α , IL-6, IL-1 β , PAF (*platelet activatin factor*) o MCP-1. Su importancia en esta patología se ha comprobado en estudios experimentales, en los que ratones con menor número de macrófagos o *knockout* de *Ccl2* (MCP-1) presentan un cuadro más leve respecto a sus controles [291].

Durante la progresión de la pancreatitis aguda desde un daño local a una inflamación sistémica, varias poblaciones de macrófagos van a ejercer una acción relevante. Los macrófagos de la cavidad peritoneal están en contacto con el fluido ascítico, el cual, a consecuencia de la inflamación, contiene una concentración anormalmente alta de citoquinas y enzimas. La exposición a este ambiente motiva, por tanto, una potente activación de estas células hacia un fenotipo M1 y los mediadores liberados contribuyen a la toxicidad del fluido ascítico además de poder alcanzar el torrente sanguíneo por medio de la absorción mesentérica [292, 293]. También desempeña un papel de interés las células de Kupffer, que se activan por medio de citoquinas y otros mediadores que llegan por la vena porta.

Algunos estudios revelan su contribución en la amplificación de las señales inflamatorias iniciadas por el páncreas [294]. Por último, los macrófagos alveolares podrían estar detrás del daño pulmonar asociado a la pancreatitis aguda, por medio de un mecanismo que involucra al NO [295, 296].

Mastocitos

Tras su activación, los mastocitos participan en la disfunción endotelial a través de la producción de histamina o serotonina, acción que no se limita solo al páncreas. Esta acción contribuye al fallo multiorgánico que puede asociarse a la pancreatitis aguda [297]. Los mastocitos parecen actuar también amplificando la respuesta inflamatoria en el inicio de la pancreatitis. Alguno de los mediadores producidos por este tipo celular, como PAF, histamina o prostaglandina D₂ están involucrados en la patofisiología de la pancreatitis aguda [298].

Células dendríticas

Como consecuencia de la pancreatitis, las células dendríticas intrapancreáticas modifican su fenotipo, caracterizado por una producción aumentada de IL-6, TNF- α , así como una expresión mayor de MHC II y CD86 (molécula co-estimuladora), indicativo de una mayor madurez. La reducción del número de células dendríticas en un modelo experimental provocó una notable necrosis del páncreas exocrino y muerte del animal en unos días. Estos datos revelan un papel protector de las células dendríticas. Los resultados obtenidos en este estudio llevaron a los autores a plantear la existencia de un mecanismo protector de las células dendríticas basado en la mayor capacidad de presentación antigénica así como de eliminación de restos celulares, de células necróticas y apoptóticas [299].

Linfocitos

Menos información se dispone acerca de la participación de las células del sistema inmune adaptativo en la progresión de la pancreatitis aguda. Sin embargo, algunos estudios muestran que los linfocitos deben desempeñar también un papel importante. Así lo indica el hecho de que ratones RAG^{-/-} (deficientes en linfocitos T y B), así como ratones *nu/un* (deficientes en linfocitos T) presenten una pancreatitis menos severa [291, 300].

Plaquetas

Durante la pancreatitis aguda, las plaquetas circulantes se activan, identificándose PAF como el mediador más importante para esta activación [301].

Una vez activas, las plaquetas van a producir ROS y mediadores proinflamatorios. Las plaquetas facilitan además el reclutamiento de leucocitos. Las plaquetas parecen tener, en concreto, un papel importante en la regulación de la infiltración de neutrófilos, probablemente por medio de la producción de MIP-2 [302]. Relacionada con esta función sobre la infiltración de neutrófilos, en un estudio publicado en 2012, se observó que la reducción del número de plaquetas motivaba una expresión reducida de P-selectina, una de las moléculas de adhesión esenciales para la migración de los neutrófilos [303].

4.4. Modelos animales de pancreatitis aguda

Los modelos animales de los que se dispone hoy en día suelen realizarse en roedores. Los estudios dedicados a reproducir en modelos animales las características clínicas y etiológicas de la pancreatitis se han centrado en los mecanismos celulares responsables. En este sentido, los modelos animales han resultado especialmente satisfactorios en la caracterización de procesos intracelulares que preceden al daño tisular [304]. Los modelos animales de pancreatitis aguda se pueden clasificar en invasivos y no invasivos:

- Pancreatitis aguda inducida por secretagogos (no invasivo): la ceruleína es un análogo de la colecistoquinina (CCK), capaz de inducir la secreción pancreática. La pancreatitis se induce tras la administración intraperitoneal en una dosis única o repetida a intervalos de una hora. La severidad del modelo dependerá de la dosis empleada y del número de administraciones. La dosis empleada suele ser de 50 µg/kg peso corporal [305]. El mecanismo de acción está mediado por la interacción con los receptores de CCK. La recuperación comienza 24 horas después de la administración de la última dosis, alcanzándose la normalidad una semana después [306]. Es el modelo de pancreatitis más ampliamente empleado, altamente reproducible y económico. Al igual que ocurre en humanos, este modelo animal manifiesta hiperamilasemia, infiltración de células inflamatorias en el páncreas, vacuolización de las células acinares, edema pancreático y presencia de enzimas activas en el páncreas. El daño se limita a las células acinares, no encontrándose afectación de las células endocrinas o ductales. Aunque no reproduce todas las características de la pancreatitis humana se considera un modelo adecuado de pancreatitis leve [307].

Otros secretagogos empleados incluyen el carbacol, que origina una pancreatitis edematosa, con hiperamilasemia y daño celular. Es un modelo que reproduce la pancreatitis por veneno de escorpión [306].

- Pancreatitis inducida por nutrientes (no invasivo): dentro de estos se emplea la dieta deficiente en colina y suplementada con etionina. En este caso, solo causa pancreatitis de manera selectiva en hembras jóvenes, que se caracteriza por ser de tipo hemorrágica. Es frecuente la aparición de esteatonecrosis intraperitoneal y efectos sistémicos como hipovolemia, acidosis o hipoxia. Causa daño en otros órganos de manera independiente a la pancreatitis, como el hígado, lo cual es un inconveniente para el estudio de las complicaciones sistémicas asociadas a esta patología [304, 308].

Más empleado es el modelo de pancreatitis aguda inducido por L-arginina, en la que se administra en una sola dosis (a veces se emplea dosis doble) por vía intraperitoneal. Los efectos dependen de la cepa de ratón empleada y la dosis utilizada [309]. El mecanismo puede estar relacionado con la óxido nítrico sintasa y el estrés oxidativo. Por sus características se asimila a la pancreatitis necrotizante en humanos, aunque su relevancia clínica es cuestionable (por ejemplo, no hay complicaciones extrapancreáticas en tejidos como el pulmón) [306, 310].

- Infusión ductal retrógrada: es un método invasivo en el que pueden administrarse diversas sustancias (ácidos biliares, tripsina), pero la más empleada es una solución de taurocolato sódico (3-5%). La severidad puede ser controlada por medio de la dosis administrada. Este modelo se aproxima al cuadro clínico característico de la pancreatitis de origen biliar y pancreatitis severa necrotizante [311]. El hecho de que los animales hayan de ser sometidos a una intervención, incluyendo los controles, hace complejo la interpretación de los efectos extrapancreáticos [312].

- CDL (*closed duodenal loop*): este modelo invasivo se aplica en ratas. El duodeno se obstruye mediante dos ligaduras, lo que crea un segmento intestinal que se comunica con el conducto pancreático. El resultado es el reflujo del contenido duodenal, incluyendo secreciones biliares y pancreáticas, hacia el conducto biliopancreático. La inflamación que produce es normalmente leve o moderada, solo cuando se asocia a sepsis es

severa [313]. A las 24 horas aparece una pancreatitis hemorrágica, con incremento de la amilasa sérica, necrosis acinar, edema pancreático, hemorragia y necrosis del tejido adiposo intraabdominal [314]. A nivel intestinal, se produce atrofia de la mucosa y alteración de la función barrera, conjuntamente con el sobrecrecimiento y la translocación bacteriana, debido a una menor motilidad intestinal [308].

- Ligación/obstrucción del conducto: método invasivo en el que la pancreatitis se induce al ligar el conducto biliar común. Como consecuencia, se evita la secreción pancreática y se genera un reflujo biliar hacia el conducto pancreático, efectos que en conjunto serán responsables de la aparición de pancreatitis moderada caracterizada por la existencia de edema, inflamación y hemorragia, esteatonecrosis y necrosis leve de las células acinares. En ratas se origina una pancreatitis parecida a la inducida por cálculos biliares en humanos, pues el cuadro se acompaña de colangitis y colestasis hepática [305, 308].

4. SEPSIS

4.1. Generalidades

De acuerdo con la definición del “Tercer Consenso Internacional para la Sepsis y el *Shock Séptico*” (Sepsis-3), se considera la sepsis como una disfunción orgánica capaz de poner en riesgo la vida y que está provocada por una respuesta inmune alterada a una infección [27]. Esta nueva definición prescinde de las denominaciones comúnmente empleadas de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en la identificación de la sepsis, así como de la denominación de sepsis severa [315]. Este cambio se debe a que los criterios existentes hasta este momento eran demasiado amplios y englobaban múltiples procesos patológicos que no se corresponden realmente con la sepsis.

La sepsis es una de las principales causas de muerte en la Unidad de Cuidados Intensivos. En países industrializados provoca tantos fallecimientos como el infarto de miocardio. Se calcula que se producen 377 casos por cada 100.000 habitantes (The World Sepsis Day Fact Sheet, September 13, 2012), situándose la mortalidad de los pacientes con sepsis en un 20-30%, que puede llegar hasta un

50% en su forma más severa [316, 317]. A largo plazo, la sepsis produce también consecuencias importantes, presentando una mortalidad en torno al 20% al año, así como un deterioro significativo de la calidad de vida [318]. En algunos casos en los que los pacientes sobreviven inicialmente a la sepsis, estos desarrollan una enfermedad crónica conocida como síndrome de inflamación, inmunosupresión y catabolismo persistente (PICS) [319]. Pero lo que es incluso más alarmante es que se espera un incremento en las próximas dos décadas, debido al aumento de la población anciana, caracterizada por las comorbilidades, fragilidad fisiológica y senescencia del sistema inmune. Tampoco las terapias existentes, que en general tienden a reducir la respuesta inmune mediante el bloqueo de IL-1 o TNF- α , son muy eficaces, hasta el punto de que la FDA no ha aprobado ningún tratamiento capaz de mejorar la supervivencia a la sepsis. El tratamiento por tanto se basa en medidas de apoyo hemodinámico y cardiovascular conjuntamente con el empleo de antibióticos [320].

Siguiendo estos nuevos criterios, se considera que existe disfunción orgánica cuando se produce un incremento en el índice SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) de 2 puntos o más, el cual está asociado a un aumento de la mortalidad hospitalaria de un 10%. Los criterios que se tienen en cuenta para el índice SOFA se recogen en la Tabla 6. En función de los valores de los criterios aquí recogidos, cada categoría recibe una puntuación entre 0 y 4. Además, el *shock séptico* queda definido como un tipo de sepsis en el que las alteraciones circulatorias, celulares y metabólicas están asociadas a un riesgo de mortalidad superior al de la sepsis. Desde un punto de vista clínico, se identifica por la imposibilidad de mantener la presión arterial media a 65 mmHg o más sin la administración de vasopresores, así como por tener niveles de lactato en plasma altos (> 18 mg/dL) en ausencia de hipovolemia, con una mortalidad hospitalaria mayor del 40% [321].

Tabla 6. Criterios SOFA para el diagnóstico de sepsis [321]

SOFA	Respiración	Bajo ratio PaO ₂ /FiO ₂
	Coagulación	Reducción plaquetas
	S. Nervioso central	Menor score en la escala de coma de Glasgow
	Hígado	Aumento bilirrubina
	Riñón	Aumento creatinina Menor eliminación de urea
	Circulación	Hipotensión o uso de vasopresores

Se han descrito una serie de factores que influye en la incidencia de la sepsis:

Sexo y raza

Algunos estudios han puesto de relieve una menor incidencia de sepsis en mujeres. No se conoce el motivo pero se apunta al efecto de las hormonas sexuales sobre la inmunidad innata y adaptativa, al igual que sobre la respuesta cardiovascular a las citoquinas [322, 323]. En un estudio publicado en 2011 se observó una severidad reducida de sepsis en ratones hembras. Este hecho se relacionó con un menor reclutamiento de neutrófilos hacia el peritoneo, lo cual fue atribuido al diferente contenido de células inmunes en la cavidad peritoneal [324].

En relación con la raza, estudios realizados en EE.UU. pusieron de relieve una mayor incidencia de sepsis en individuos afroamericanos y, en general, en aquellos que no eran de raza caucásica. Una posible explicación a estas diferencias es la desigualdad en el acceso al sistema sanitario, la pobreza o la inmunización. Hay que tener en cuenta que existen también diferencias a nivel de sexo y raza en la presencia de comorbilidades, por ejemplo, diabetes, enfermedad crónica renal, VIH o consumo de sustancias de abuso. Por último, a pesar de controlar todos estos factores, los individuos de ascendencia africana seguían mostrando una incidencia aumentada de infección y disfunción orgánica [27]. Sin embargo, estudios recientes ponen en duda estos hallazgos y hacen necesario nuevas investigaciones que permitan dilucidar la influencia, si existe, de la raza en el desarrollo de la sepsis [325, 326].

Edad

En EE.UU., la sepsis es la décima causa de muerte en pacientes con edad superior a los 65 años. Los pacientes de edad avanzada tienen un mayor riesgo de sufrir sepsis, fenómeno que ha sido asociado a la presencia de comorbilidades y tratamientos prolongados; un estado funcional alterado por la inactividad, la sarcopenia subsiguiente, alteraciones neurológicas o cambios en el metabolismo proteico; la malnutrición y desórdenes endocrinos. En estos pacientes el riesgo de mortalidad es 2,3 veces superior. La muerte ocurre de manera más temprana tras la hospitalización, pero aquellos que sobreviven normalmente requerirán atención a largo plazo en residencias para ancianos con el fin de recuperar el estatus funcional [27, 327, 328].

Variantes genéticas

Diversos estudios han puesto de relieve que determinados polimorfismos (SNP) se asocian con un mayor riesgo de sepsis. Algunos se han detectado en los PRRs de las células presentadoras de antígenos, en genes de citoquinas e inmunoglobulinas. Por ejemplo, existe varios SNPs en el gen de *CD14*, *TLR2*, *TNF- α* e *IL-6* asociados a una mayor susceptibilidad a la sepsis [329, 330].

Factores de riesgo modificables

Los datos referentes a la influencia del tabaco sobre la sepsis son controvertidos y los estudios muy limitados. Respecto al consumo de alcohol, se ha demostrado su relación con la sepsis y que es capaz de aumentar el riesgo de mortalidad. También se ha descrito una mayor susceptibilidad a la sepsis en pacientes con deficiencia en vitamina D, posiblemente debido a los efectos pleiotrópicos que esta desempeña en el sistema inmune [331-333].

Inmunosupresión y cáncer

Aquellas situaciones que provocan una supresión de la respuesta innata o adaptativa se asocian a mayor riesgo de sepsis. Entre estas condiciones destacan VIH, cirrosis o enfermedades autoinmunes [334-336]. Por otra parte, la inmunosupresión en pacientes con cáncer es frecuente, bien a consecuencia de la propia patología o a causa del tratamiento. En estos pacientes, el riesgo de mortalidad es un 52% superior. Los peores pronósticos se asocian a cáncer de pulmón y hematológicos [27, 337].

4.2. Etiología

El origen de la sepsis puede ser un proceso infeccioso o no infeccioso. En el segundo caso, algunas condiciones de inflamación estéril pueden progresar hacia el *shock* y el fallo multiorgánico. Es el caso de la pancreatitis, isquemia tisular, trauma e intervenciones quirúrgicas, quemaduras, tromboembolismo, vasculitis y procesos autoinmunes y neoplásicos como el linfoma. Más común es que detrás de la sepsis se encuentre una infección claramente identificada. Según un estudio publicado en el que se analizaron más de 14000 pacientes, el foco de infección más frecuente son los pulmones (64%), seguido del abdomen (20%), circulación sanguínea (15%) y tracto renal o genitourinario (14%). En individuos infectados, se identificó la presencia de Gram positivos en el 57% de los casos (*Staphylococcus aureus* representa un 20%), Gram negativos en un 62% (20% provocados por *Pseudomonas spp.* y 16% por *E. coli*) y hongos en un 19% [338].

4.3. Patogénesis

A medida que la sepsis progrese desde una infección localizada hacia una inflamación sistémica, comenzarán a producirse alteraciones en diversos órganos y sistemas. Uno de los más afectados es el sistema cardiovascular, que presenta un gasto cardíaco incrementado. Los niveles de lactato en sangre se ven aumentados, lo cual se ha atribuido a la hipoxia tisular motivada por la hipoperfusión o bien a la glucólisis aerobia producida por el mayor tono adrenérgico. La sepsis va a provocar importantes alteraciones a nivel endotelial, que incluyen el aumento de la adhesión de leucocitos por incremento en la expresión de moléculas de adhesión, la transición a un estado procoagulante, vasodilatación y alteración de la función barrera, acciones que, en conjunto, son responsables del edema tisular. Es posible que sufran procesos de apoptosis, aunque las evidencias son más consistentes *in vitro* [27, 339].

Las alteraciones hemostáticas son muy frecuentes en pacientes con sepsis, en los cuales se puede detectar tanto una activación sutil de la coagulación hasta un fenómeno conocido como coagulación intravascular diseminada (CID). En casos de *shock* séptico, la incidencia de CID es alta y oscila entre un 30 y un 50%. Este cuadro es consecuencia de la expresión incrementada de factores tisulares, del depósito de fibrina y la alteración de los mecanismos de coagulación. Se relaciona, además, con disfunción orgánica, sangrado (debido al consumo de plaquetas y factores de coagulación) y la mortalidad. De manera general, el estado procoagulante observado en la sepsis se debe a la producción de trombina

mediada por el factor tisular (FT), alteración de los mecanismos anticoagulantes (antitrombina, inhibidor de la vía de FT y proteína C activada) y funcionamiento incorrecto del sistema fibrinolítico, lo que reduce la eliminación de fibrina [27, 340].

La alteración de la función barrera es otras de las características que presentan los pacientes con sepsis. De hecho, la afectación conjunta del endotelio y las barreras epiteliales van a provocar la expansión de la disfunción orgánica. La alta producción de citoquinas que acompaña a la sepsis incrementa la permeabilidad intestinal, lo cual crea un círculo vicioso de translocación bacteriana, daño por componentes presentes en el lumen (como enzimas pancreáticas) y exacerbación de la respuesta sistémica inflamatoria, lo que perpetúa la disfunción orgánica [27]. Durante bastante tiempo, el intestino se ha considerado el motor de la sepsis y del síndrome de disfunción multiorgánica. Aunque los mecanismos responsables de la conexión entre e intestino han demostrado ser complejos, lo que ha motivado que esta teoría haya perdido popularidad hasta cierto punto, lo cierto es que la composición de la microbiota está significativamente alterada en la sepsis. Esta disbiosis puede contribuir al desarrollo del fallo multiorgánico, al predisponer a un estado de inmunosupresión. En los últimos años, en consecuencia, se están investigando diversas alternativas para el restablecimiento de la microbiota como tratamiento adicional de la sepsis [341, 342].

El hígado muestra una capacidad reducida de eliminación de bilirrubina, pero también otra serie de alteraciones que incluyen la afectación de la función de detoxificación y de eliminación de lípidos procedentes de patógenos entéricos, lo que contribuye a una mayor respuesta inflamatoria. La disfunción hepática se asocia a altos niveles de transaminasas y bilirrubina, los cuales parecen tener su origen en la necrosis y apoptosis de los hepatocitos [343]. A nivel metabólico, se detectan altos niveles de glucosa plasmática, situación conocida como diabetes del estrés, los cuales reducen la función de los neutrófilos, en especial su actividad bactericida. Los altos niveles de ROS producidos por la respuesta inflamatoria dañan las mitocondrias, lo que se traduce en un descenso de los niveles de ATP, responsable de conducir a las células a un estado de “hibernación”, situación que conduce y exagera la disfunción orgánica.

Una de las manifestaciones más típicas de la sepsis es el incremento de la frecuencia respiratoria o taquipnea. Junto a esta puede aparecer hipercarbia, hipoxemia y fatiga de los músculos respiratorios. Este cuadro puede requerir

intubación endotraqueal. El mecanismo responsable de las manifestaciones pulmonares es el daño en las membranas alveolo-capilares producido por mediadores inflamatorios [343]. El daño renal agudo también se asocia a la sepsis y es un factor que aumenta el riesgo de muerte, posiblemente asociado a las citoquinas y otros mediadores inmunes que provocan disfunción vascular y tubular. A veces, es posible que exista también fallo adrenal, por lo que algunos pacientes requieren terapia de reemplazo de corticoides [344-348].

El sistema nervioso desempeña también un papel importante en el desarrollo de la sepsis. Este es sobre todo antiinflamatorio, debido a la estimulación a través del nervio vago que inhibe la producción de citoquinas inflamatorias por parte de células del sistema inmune en bazo e intestino, entre otros. Sin embargo, ante una alteración de la función barrera intestinal, este órgano produce grandes cantidades de catecolaminas, neurotransmisores con un papel también relevante sobre la inflamación, pues a través de la circulación llegarán al hígado, donde, en su caso, actúan promoviendo la síntesis de mediadores proinflamatorios que contribuyen al fallo en la función hepática. Otros de los hallazgos clínicos en la sepsis es la encefalopatía, que puede ser resultado de la infección del propio sistema nervioso central o bien ser consecuencia de la alteración de la barrera hematoencefálica por citoquinas como IL-1 β y TNF- α , que actúan sobre las uniones estrechas y la permeabilidad endotelial. El resultado es la llegada de citoquinas y otros mediadores que causarán edema tisular, estrés oxidativo y alteraciones en los neurotransmisores. En casos de especial gravedad, la coexistencia de coagulopatía y alteración del flujo sanguíneo cerebral genera hemorragias y zonas isquémicas [349, 350].

Finalmente, resulta clave la participación del sistema inmune en la patogénesis de la sepsis. La respuesta inflamatoria inicial a una agresión puede prolongarse y provocar una disfunción de esta respuesta, lo que justifica que en sepsis que se prolongan en el tiempo exista una tendencia a padecer nuevas infecciones incluso por microorganismos menos virulentos. Hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba que la respuesta inflamatoria en la sepsis tenía dos fases, una primera inflamatoria que podía provocar una mortalidad temprana en los primeros días, la cual era seguida de una segunda fase antiinflamatoria, que es la que conducía al fallo orgánico, inmunosupresión y mortalidad algunas semanas después. Investigaciones posteriores han identificado una dinámica diferente en la que las respuestas inflamatorias y antiinflamatorias se dan de forma simultánea y prolongada [351]. La disfunción del sistema innato y la respuesta inmune

adaptativa suprimida culminarían en un daño orgánico persistente y la muerte del paciente [321]. Los pormenores de la respuesta van a ser detallados a continuación.

4.3.1. Inmunología de la sepsis

Cuando el organismo es incapaz de contener una infección a nivel local, se ve expuesto a microorganismos y productos procedentes del daño tisular, iniciándose las respuestas que conducen a la sepsis. El reconocimiento inmune inicial se lleva a cabo por medio de PRRs, que van a reconocer tanto PAMPs (procedentes de bacterias y hongos) como DAMPs. Las tres grandes familias de PRR incluyen los TLRs, los NLRs y los RLRs. Los TLR reconocen patógenos a nivel de la membrana celular y en endosomas, mientras que NLR y RLR los detectan en el citosol [352, 353]. Los TLR están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de PAMPs. La estimulación no controlada de TLR conduce a una inflamación desproporcionada y al daño tisular, como ocurre durante la sepsis. NLRs desempeñan un papel clave en esta patología, pues llevan a la activación del inflammasoma, capaz de amplificar la respuesta inflamatoria, lo cual puede ser beneficioso o perjudicial, según la duración y extensión de dicha activación. El reconocimiento de los diversos componentes por parte del sistema inmune innato conduce a la fosforilación de MAPKs, JAKs, STATs y NF- κ B entre otros [343].

La activación sistémica de estos receptores conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias, que incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-8, IL-12 e IFN- γ . En conjunto se conoce como la “tormenta de citoquinas”, responsable en conjunto de la hiperinflamación y de la sepsis cuando se sobrepasa un determinado nivel [354]. Otra citoquina importante es MIF. La secreción de MIF desde el neutrófilo puede verse inducida por TNF- α , IFN- γ o C5a, pero también es producida por los propios macrófagos. Se trata de una citoquina proinflamatoria que promueve las respuestas inmunes innatas y adaptativas por medio de la activación de macrófagos y células T. Por otra parte, regula positivamente la expresión de TLR4 en los macrófagos y potencia la producción de otras citoquinas proinflamatorias [355]. La citoquina proinflamatoria HMGB-1 (*high-mobility grupo box 1 protein*) es producida principalmente por macrófagos, monocitos y neutrófilos, pero también por células necróticas. Se caracteriza por su capacidad de interactuar con RAGE, TLR2 y TLR4, además de otros mediadores inflamatorios, dando como resultado la generación de respuestas análogas al LPS, así como la promoción de la actividad

de mediadores proinflamatorios como IL-1 β [349, 356]. En conjunto las acciones de estas citoquinas se resumen en:

- Aumentan el número, tiempo de vida y estado de activación de células de la inmunidad innata
- Incrementan la expresión de moléculas de adhesión y de quimioquinas en el endotelio
- Inducen la expresión de proteínas de la fase aguda en el hígado
- Provocan la liberación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), las cuales además de su acción antimicrobiana, sirven de soporte para la activación plaquetaria
- Estimulan la liberación de micropartículas desde distintos tipos celulares, las cuales contienen lípidos y proteínas inflamatorios, pro-oxidantes y coagulantes, como el factor tisular o el factor de Wildebrand
- Contribuyen a la inmutrombosis al incrementar la expresión del factor tisular en los monocitos, en combinación con los efectos anteriormente descritos

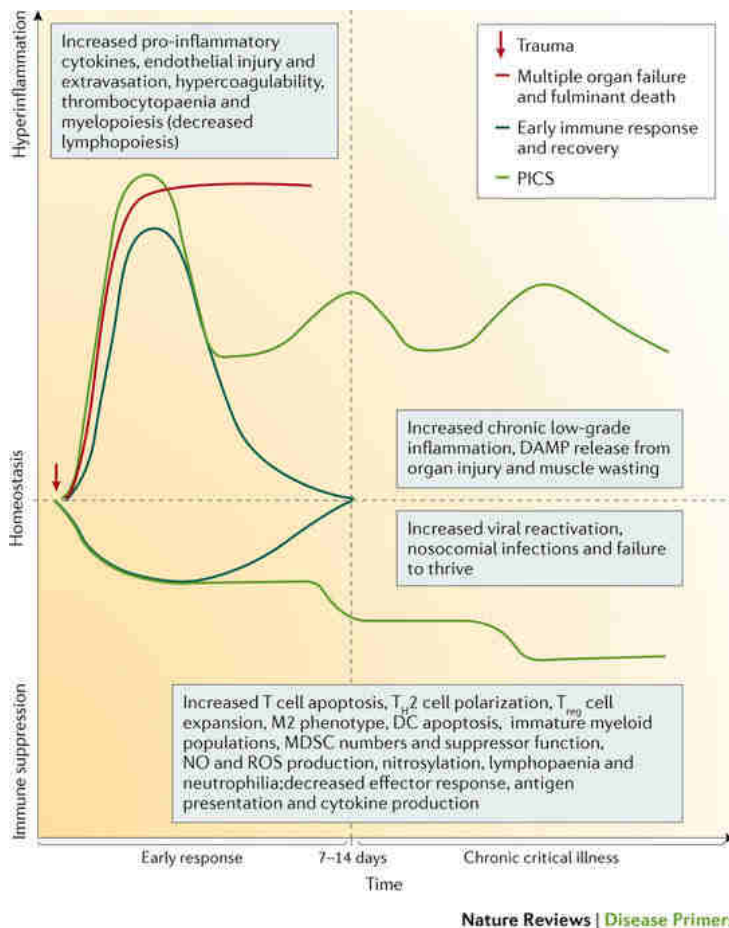
También se produce la activación excesiva del complemento, uno de los aspectos más distintivos de la sepsis [357]. El sistema del complemento contiene una serie de factores que son liberados como parte de la respuesta a la infección. En sepsis se pueden detectar altos niveles de las anafilotoxinas C3a y C5a, que se une a sus receptores con gran afinidad, los cuales están presentes no solamente en fagocitos, también en células no mieloides, como es el caso de las células endoteliales. El resultado es una cascada de señalización que supone entre otras acciones la liberación de gránulos, producción de ROS o preparación de las células para un segundo estímulo. Su activación excesiva es perjudicial y contribuye a la mortalidad asociada a la sepsis, al provocar fallo multiorgánico, apoptosis celular, alteración del sistema de coagulación o parálisis inmune entre otros [340, 349, 358]. Otro de los mediadores que merecen atención en el desarrollo de la sepsis son ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Son producidos por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células epiteliales o por vía mitocondrial. El mecanismo por el cual contribuye a esta patología se relaciona con la interferencia con las cascadas de señalización de NO así como la oxidación y nitrosilación de proteínas y ácidos nucleicos lo cual resulta perjudicial para su función molecular [321, 359].

En un principio se pensaba que la resolución de la cascada hiperinflamatoria comenzaba días después de que pasara el episodio inicial de sepsis. Sin embargo,

las respuestas compensatorias antiinflamatorias están activas poco después del inicio. Aunque ambas coexisten, hay un predominio inicial de las respuestas proinflamatorias, cuya magnitud depende de factores como la virulencia, la carga bacteriana, así como factores genéticos, comorbilidades o la edad del paciente [360]. Las potenciales respuestas inflamatorias se recogen en el Esquema 9.

Las acciones antiinflamatorias principalmente actuarán a través de IL-10, producida por diversos leucocitos, la cual suprime la producción de IL-6 e IFN- γ , al tiempo que incrementa la producción del receptor soluble de TNF- α y el antagonista del receptor de IL-1. En conjunto, conseguiría neutralizar la señalización por ambas citoquinas. El proceso de resolución de la inflamación incluye también la eliminación de restos celulares y células en apoptosis, mediante la fagocitosis mediada por macrófagos, y que conduce a la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (*transforming growth factor β*) [225, 361]. También desempeñan un papel relevante los lípidos bioactivos lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas, los cuales reducen ROS, la permeabilidad endotelial y el reclutamiento de leucocitos, al tiempo que potencian la fagocitosis [362]. Finalmente, células T reguladoras (Treg) y células mieloides supresoras serán fundamentales para la producción de citoquinas antiinflamatorias y la eliminación de células citotóxicas [27, 321].

De manera general, las estrategias terapéuticas en la sepsis se han encaminado a tratar la fase de hiperinflamación, sin embargo, la inmunosupresión coexiste con la hiperinflamación. De hecho, un estudio realizado en leucocitos circulantes de pacientes con sepsis reveló que, a nivel transcripcional, no era posible distinguir entre las tradicionales fases proinflamatorias y antiinflamatorias [363]. La inmunosupresión es la principal responsable de la aparición de infecciones nosocomiales, persistentes y recurrentes, las cuales empeoran el pronóstico y de la mortalidad de la sepsis. La inmunosupresión aparece como consecuencia de defectos en diversos tipos celulares.



Esquema 9. Respuesta características de la sepsis [343]. La reanimación es cada vez más frecuente y permite a los pacientes una recuperación y el alta hospitalaria (línea azul). Algunos pacientes presentan respuestas inflamatorias tempranas que pueden conducir a fallo multiorgánico y muerte (línea roja) Otros sobreviven a esta fase, pero experimentan un estado crítico crónico (línea verde) caracterizado por inflamación, inmunosupresión y catabolismo persistente (PICS).

Linfocitos

En el caso de la respuesta inmune adaptativa, se ha observado una intensa apoptosis, evidenciada por un número reducido de CD4+ y CD8+ en bazo tanto en humanos como en ratones [364]. El fenotipo de las células T vira hacia Th2. Diversas investigaciones defienden que las señales recibidas de las APC a través de las moléculas co-estimuladoras están alteradas y producen anergia y apoptosis. También los linfocitos B se encuentran reducidos [365, 366]. Respecto a las células Treg, desempeñan un papel clave en la supresión de la respuesta inmune adaptativa. Se ha comprobado que su número, a diferencia de las otras poblaciones linfocitarias, se encuentra incrementado. Esta población contribuye a

la anergia y apoptosis de las células T, mediante un mecanismo que podría involucrar la señalización por TGF- β 1 [343, 367, 368].

Células dendríticas

El aumento de la apoptosis también se ha descrito en células dendríticas. Sin embargo, al mismo tiempo que se produce este incremento, la diferenciación de monocitos a células dendríticas está acelerada. Estas células muestran una capacidad reducida de co-estimulación de células T. Además, manifiestan un patrón aberrante en la respuesta a bacterias y en la secreción de citoquinas, todo lo cual genera un estado de tolerancia [369, 370].

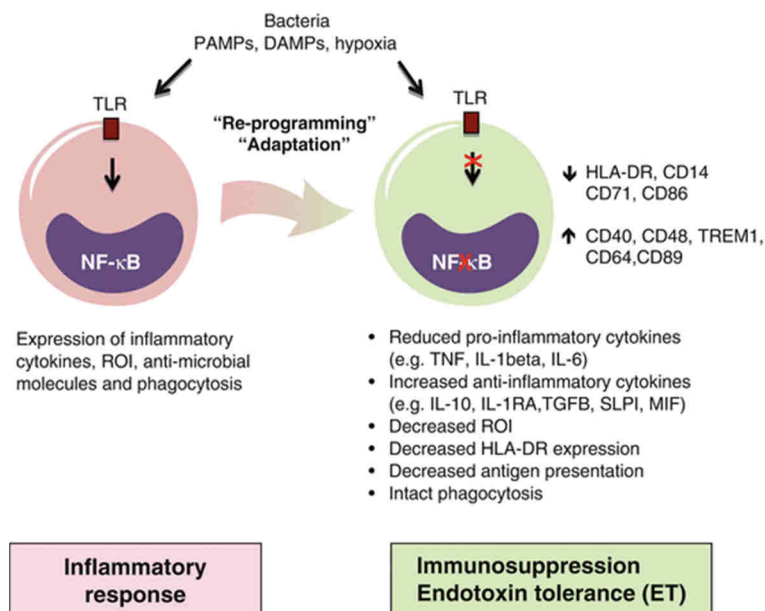
Neutrófilos

Una de las principales alteraciones descritas en este tipo celular es un aumento del tiempo de vida, motivado por una mayor resistencia a la apoptosis. El mecanismo responsable es la activación de la vía NF- κ B, que a su vez se asocia con una actividad menor de las caspasas 3 y 9 [371]. Pero las modificaciones van más allá, afectando a múltiples aspectos de la función de los neutrófilos. Así, se ha descrito una mayor liberación desde médula ósea, tanto de células maduras como inmaduras, estas últimas con menos capacidad fagocítica [372]. También se ha comprobado que los neutrófilos ostentan una menor capacidad de rodamiento y de deformación, características que provocan el secuestro en los capilares y, en consecuencia, promueven la oclusión vascular, la isquemia y la disfunción de distintos órganos [373]. La NETosis en pacientes con sepsis se encuentra incrementada, lo cual facilita también la coagulación y la formación de trombos [374]. Por otra parte, la exposición repetida a quimioquinas conduce a la desensibilización de los receptores, siendo la consecuencia una menor transmigración al foco de la inflamación. En concordancia con esto, esta migración alterada ha sido descrita tanto en humanos como en ratones, así como también una expresión reducida de CXCR2 y una menor respuesta a quimioquinas [375]. A nivel de función, la activación de TLRs en la fase temprana de la sepsis conlleva la producción de grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias, sin embargo, la exposición persistente y prolongada a componentes bacterianos va a provocar una tolerancia a las endotoxinas. Esta se define como la incapacidad de un organismo o sus células para responder a las endotoxinas como resultado de una exposición previa. Es un mecanismo de adaptación a una inflamación excesiva. Existen evidencias que muestran que el inhibidor de la señalización de TLR, IRAK-M está sobreexpresado en neutrófilos de pacientes con sepsis, lo que justificaría la menor

producción de citoquinas proinflamatorias [376]. También los altos niveles de C5a, fruto de la activación del complemento, contribuyen a la menor migración, fagocitosis y producción de ROS en neutrófilos [375].

Monocitos/macrófagos

Los macrófagos desempeñan un papel esencial en el desarrollo de la sepsis. En respuesta a PAMPs y DAMPs, producen citoquinas que contribuyen a la llamada “tormenta de citoquinas”. Al mismo tiempo, los macrófagos sufren un proceso de adaptación, por medio del cual comienzan a manifestar un perfil inmunosupresor [377]. Sus características aparecen recogidas en el Esquema 10. Así, los monocitos de pacientes con sepsis presentan una capacidad reducida de producción de citoquinas, pero mantienen la capacidad fagocítica y exhiben una producción incrementada de NO y ROS [378]. En macrófagos, se ha descrito una expresión reducida de HLA-DR (también descrito en células dendríticas) junto con un descenso de los marcadores característicos de M1 y un aumento paralelo de los de M2, tanto en humanos como en modelos animales de sepsis [379]. De manera similar a como ocurre con los neutrófilos, los macrófagos exhiben tolerancia a la endotoxina. El mecanismo es similar al descrito previamente en los neutrófilos [377]. Un aspecto a tener en cuenta y que ha sido estudiado en esta tesis doctoral es que el comportamiento difiere entre las distintas poblaciones de macrófagos.



Esquema 10. Adaptación o “re-programming” de los macrófagos durante la sepsis [377]

4.4 Modelos animales de sepsis

El desarrollo de una terapia efectiva para la sepsis se ve lastrada por el hecho de que no existe ningún modelo animal que sea realmente predictivo a nivel clínico [380]. Los diferentes modelos animales empleados tienen cada uno sus limitaciones y fortalezas. Pueden clasificarse en función del mecanismo en tres grupos:

- Administración de una toxina exógena: el más común es el modelo de administración de LPS. Se trata de un modelo de toxemia no quirúrgico por medio del cual se administra por vía intraperitoneal o intravenosa una dosis única de LPS. El mecanismo está mediado únicamente por TLR4. Si se compara con los humanos, los diferentes animales empleados muestran una sensibilidad al LPS muy inferior, por lo que se hace necesario administrar dosis comparativamente mayores. Rápidamente tras la administración van a aparecer signos clínicos sistémicos como piloerección, letargia, temblores e incluso hipotermia [381]. El LPS también va a provocar un incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas, como IL-1 o TNF- α de manera transitoria, siendo además este efecto más rápido y de mayor magnitud que el observado en el ser humano. De igual manera, el curso clínico de la patología ocurre de modo más veloz en animales, es decir, la cinética que sigue la sepsis difiere entre ratones y humanos. Ello supone una limitación de este modelo, unido a la existencia de diferencias en la respuesta entre cepas de roedores. A pesar de ello, es muy empleado por ser bastante reproducible y técnicamente sencillo [382-384].

Otra posibilidad consiste en la administración intraperitoneal de zimosán, un glucano presente en la superficie celular de los hongos, el cual induce una fuerte respuesta inflamatoria. Se trata de un modelo trimodal, con una primera fase de respuesta inflamatoria que se extiende varios días, y en la que se puede producir cierta mortalidad asociada a la dosis. A continuación hay una etapa de inflamación leve crónica que conduce a un estado final de fallo multiorgánico y muerte [384].

- Administración de patógenos viables: este modelo varía en función de la ruta de infección seleccionada (sangre, cavidad peritoneal, pulmones), la frecuencia en la administración, la especie bacteriana utilizada y el tamaño del inóculo. Uno de los microorganismos más empleados es *E. coli*.

Este modelo reproduce alguna de las condiciones clínicas descritas en humanos, como reclutamiento de leucocitos, trombosis en vasos pequeños, congestión vascular, hemorragia focal y microabscesos [385]. Sin embargo, como ocurre con el modelo anterior, el curso clínico difiere del observado en humanos. También se argumenta que la administración de una especie única y de forma repentina no representa lo que ocurre en humanos. A pesar de ello, tiene como ventajas que la dosis y la cepa bacteriana pueden estandarizarse [381].

- Alteración de las barreras endógenas para permitir la invasión bacteriana: Dentro de este grupo se emplean varios modelos. El modelo de ligado-punción cecal (LPC) es considerado el método de referencia en la investigación de la sepsis abdominal. Técnicamente se realiza mediante el ligado de una porción de aproximadamente 1 cm, excluyendo la unión ileocecal, y posterior perforación de la sección aislada con una aguja de un diámetro determinado (determinante de la intensidad y la mortalidad del modelo) [386]. Como consecuencia se genera una respuesta inmune exacerbada contra la infección polimicrobiana. Presenta como ventajas su capacidad para reproducir condiciones que se dan en el humano y que son relevantes desde el punto de vista clínico. El perfil de citoquinas y su evolución temporal es bastante similar al observado en humanos, con presencia de apoptosis de linfocitos [387]. También reproduce la hemodinámica y las fases metabólicas de la sepsis humana [388]. Un inconveniente es la tendencia del animal a formar abscesos intraabdominales [384].

El CASP (*Colon Ascendent Stem Peritonitis*) es otro modelo de desarrollo más reciente y altamente estandarizado de sepsis abdominal polimicrobiana en roedores. Mediante laparoscopia, se expone el colon ascendente y un pequeño *stent* se inserta quirúrgicamente, lo que abre una conexión entre el lumen intestinal y la cavidad abdominal. En consecuencia se produce una fuga continua de bacterias intestinales hacia la cavidad intraperitoneal [389]. Esto conduce a la aparición de bacteriemia sistémica, peritonitis difusa (a diferencia de la peritonitis focal del modelo anterior, causante de los abscesos), infección de órganos por bacterias intestinales, así como liberación de citoquinas pro- y antiinflamatorias. La letalidad del modelo puede ser controlada más fácilmente que en modelos anteriores por

el diámetro del *stent* insertado, aunque técnicamente es más complejo que el LPC [390].

La inducción de sepsis polimicrobianas, especialmente en ratones neonatales, puede conseguirse también mediante la inyección intraperitoneal de una cantidad medible de contenidos cecales, desde un ratón donante a un receptor. La respuesta inflamatoria inicial es de mayor intensidad que en el modelo LPC, aunque persiste menos en el tiempo [384].

Finalmente se encuentran el modelo de implantación, método quirúrgico por medio del cual un coágulo de fibrina se impregna de bacterias, actuando como arraigo al foco de infección. A partir de este coágulo, implantado en la cavidad intraperitoneal, las bacterias se van diseminando, lo cual recuerda lo que se observa en la sepsis abdominal. Tiene además una ventaja esencial para estudios, por ejemplo, relativos a la administración rápida de antibióticos, ya que la muerte no se produce de manera rápida, siendo capaces de sobrevivir varios días [391, 392].

OBJETIVOS

1. Estudiar la función de la TNAP en enfermedades que cursen con inflamación: pancreatitis aguda y endotoxemia/sepsis
2. Caracterizar el papel inmunomodulador de la TNAP en células del sistema inmunológico

MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España).

2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

2.1. Animales de experimentación

En los experimentos *in vivo*, así como *ex vivo*, se emplearon ratones B6.129S7-Akp2^{tm1Sor}/J de la cepa C57BL/6, heterocigotos para el gen *Alpl* (a los que nos referiremos como TNAP^{+/-}) mientras que sus compañeros de camada *wild type* (WT, TNAP^{+/+}) fueron usados como controles. Los ratones *Alpl knockout* homocigotos no son viables, más allá de unos pocos días [146]. Los ratones fueron suministrados por Jackson Laboratory® (Sacramento, CA, EE. UU.) y criados en la Unidad de Mantenimiento de la Universidad de Granada.

Los ratones se genotiparon por PCR convencional (REDEExtract-N-AmpTM PCR REady MixTM #R4775, Sigma-Aldrich) con el fin de detectar aquellos que fueran heterocigotos. El DNA genómico fue extraído a partir del tejido que se obtiene en el proceso de marcar las orejas de los ratones para su identificación en el animalario (del inglés *ear punch-outs*). El genotipo de los ratones transgénicos se estableció por medio de la detección del casete de Neomicina (Neo), y como control interno se empleó el gen *Il2*. Los cebadores fueron: Neo sentido 5'-GGG TGG AGA GGC TAT TCG GCT ATG A-3', antisentido 3'-CCC ATT CGC CGC CAA GCT CTT CAG C-5'; *Il2* sentido 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3', antisentido 3'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-5'.

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones con una edad comprendida entre las 8 y 12 semanas, con un peso medio de 20-25 gramos. Dichos animales fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon® (hembras y machos separadamente) sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014, Harlan Ibérica, Barcelona) y agua esterilizada *ad libitum*.

Los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo siguiendo la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de los animales de experimentación utilizados con fines científicos.

2.2. Estimulación de macrófagos *in vivo* mediante LPS

La administración por vía intraperitoneal de lipopolisacárido bacteriano (LPS) conduce a la activación de la respuesta inmune innata. La inflamación sistémica que se origina está mediada, en su mayor parte, por la interacción del LPS con el *Toll-Like Receptor 4* (TLR4), expresado en la superficie de células inmunes, como monocitos y macrófagos, aunque también en otros muchos tipos celulares [380]. Este modelo de endotoxemia se empleó principalmente para el estudio de la estimulación de macrófagos *in vivo*, y, para llevarlo a cabo, se administró intraperitonealmente una única dosis por ratón de 1 mg/kg de LPS (LPS-B5, procedente de *Escherichia coli* 055:B5, Ultrapure, Invivogen®, California, EE.UU.), utilizando PBS (tampón fosfato salino) estéril como vehículo. La inyección de LPS produce hipotermia e hipoglucemia [393-395], por lo que la monitorización del estado de los animales fue llevada a cabo mediante la determinación de la temperatura y la glucemia al comienzo y final del experimento (6 horas después).

Los ratones TNAP^{+/-} y sus controles WT fueron divididos en cuatro grupos. Dos grupos fueron tratados con LPS (n=10): WT LPS y TNAP^{+/-} LPS; y a otros dos grupos se les administró, por la misma vía, el vehículo (PBS) (n=10): WT vehículo y TNAP^{+/-} vehículo. El experimento fue realizado tanto con machos como con hembras. A las 6 horas los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de: sangre para contador hematológico y obtención de plasma; el bazo, que se empleó para obtener células que serían marcadas para citometría y para la obtención de macrófagos; el hígado y el yeyuno para la extracción de RNA; y, por último, se realizó una extracción de macrófagos intraperitoneales para su siembra.

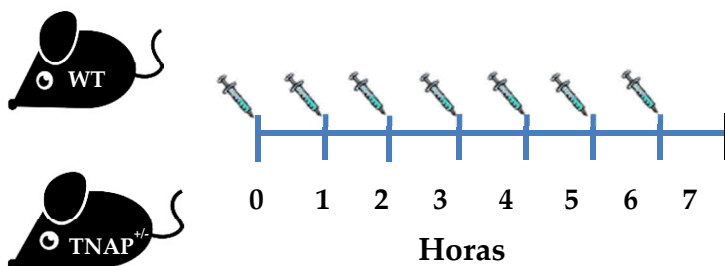
2.3. Inducción de pancreatitis aguda por administración intraperitoneal de ceruleína

Tras 12 horas de ayuno con libre acceso a agua, se llevó a cabo la inducción de pancreatitis aguda mediante la administración de la ceruleína a una dosis de 50 µg/kg de peso corporal disuelta en PBS estéril. Dicha administración fue realizada por vía intraperitoneal y seriada, en intervalos de una hora, hasta un total de siete dosis.

Todos los animales empleados fueron machos y se dividieron en cuatro grupos (n=8 para cada uno de ellos). A los ratones controles se les administró el vehículo (PBS) (0).

La ceruleína es un análogo de la colecistoquinina (CCK), una hormona producida en el intestino delgado que induce la secreción de enzimas pancreáticas y de bilis desde la vesícula biliar. El mecanismo por medio del cual la ceruleína produce la pancreatitis no está del todo caracterizado, aunque algunos estudios sugieren que induce la localización anormal de zimógenos e hidrolasas lisosomales. Aunque también pueden ser secretadas en su forma protegida al lumen acinar, el mecanismo predominante es la activación en el interior de las células acinares [305]. Diversos estudios con antagonistas muestran que el mecanismo de acción, más que debido a un efecto tóxico inespecífico, está mediado por la acción sobre el receptor CCK [396].

Una hora después de la administración de ceruleína, se va generando de manera progresiva un edema intersticial que alcanza su pico a las 12 horas [397]. La severidad del modelo dependerá del número veces que se administre la ceruleína al animal. A su vez, las manifestaciones dependerán de dicha gravedad y entre ellas, se observa la existencia de edema, hemorragia, necrosis del parénquima y de la grasa, infiltración leucocitaria e incluso fibrosis [398].



Esquema 11. Diseño experimental en el modelo de pancreatitis aguda por administración intraperitoneal de ceruleína. Los animales fueron sacrificados 7 horas después del inicio del experimento.

Una vez transcurridas las 7 horas, los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución de ketamina (Ketamidor[®], Richter Pharma, Viena, Austria) y xilacina (Nerfasin, FATRO, Barcelona, España), preparados a una concentración de 24 mg/ml y 1,6 mg/ml respectivamente. Tras ello, se les extrajo sangre vía intracardiaca y se sacrificaron por dislocación

cervical. En la necropsia posterior se procedió a la extracción del páncreas, que fue utilizado tanto para la evaluación histológica como para la obtención de RNA y la medida de citoquinas; hígado y yeyuno para la extracción de RNA.

En otro experimento posterior, la pancreatitis aguda fue inducida a ratones machos WT y TNAP^{+/-}, los cuales fueron sometidos previamente a una depleción de sus neutrófilos. Con este fin, 24 horas antes de la administración de ceruleína, se inyectó a los animales una sola dosis de anti-Ly6G o del control de isotipo IgG_{2a} (BioXcell, West Lebanon, New Hampshire, EE.UU., 200 µg por ratón). Los animales empleados se dividieron en cuatro grupos (n=4 cada uno), dos de los cuales recibieron el control de isotipo IgG_{2a} (WT IgG_{2a} y TNAP^{+/-} IgG_{2a}) y los dos restantes anti-Ly6G (WT Ly6G y TNAP^{+/-} Ly6G).

2.4. Evaluación patológica de los modelos *in vivo*

2.4.1. Necropsia del páncreas

El páncreas fue extraído inmediatamente después del sacrificio, tras lo cual se procedió a lavarlo con PBS. Tras eliminar los restos de sangre que pudieran quedar, el órgano fue dividido en tres secciones transversales. De la porción más cercana al duodeno se obtuvo un fragmento, el cual fue destinado al estudio histológico (ver apartado 2.4.2 de Material y Métodos). La zona central fue congelada a -80 °C hasta ser empleada con el fin de medir citoquinas en el sobrenadante. Finalmente, la última porción del páncreas se procesó para la extracción de RNA. Para evitar la degradación del RNA por acción de las RNAsas pancreáticas, se inyectó repetidas veces RNAlater en el tejido e inmediatamente después se congeló a -80 °C.

2.4.2. Estudio histológico

Para la evaluación histológica en el modelo de pancreatitis aguda, después del sacrificio de los animales, una pequeña porción del páncreas próxima al duodeno fue conservada sumergiéndola en formaldehído al 4% (p/v) durante 24 horas. A continuación, estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para, posteriormente, realizar cortes de un grosor de 5 µm empleando un microtomo. Los cortes realizados fueron montados en portas y empleados para inmunohistoquímica (IHC, del inglés *immunohistochemistry*) así como para llevar a cabo la tinción de rutina con hematoxilina-eosina, que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio.

Se utilizó el siguiente baremo para obtener un índice histológico que indicase el estado de las muestras: infiltración leucocitaria (0-3) y edema de células acinares (0-3) [399]. No se detectó la presencia de necrosis o hemorragia en el tejido. Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos, y su valoración fue realizada de forma independiente y objetiva por dos investigadores que desconocían los grupos experimentales.

Mediante IHC se detectó la presencia de células MRP8+ empleando para ello anticuerpos específicos. En primer lugar, las muestras se desparafinaron y rehidrataron mediante incubaciones en xileno primero y, después, etanol a un porcentaje decreciente (99%, 90% y 70%). La recuperación antigénica se llevó a cabo exponiendo las secciones de tejido al tampón citrato sódico 10 mM (pH 6) durante 30 minutos a 100 °C. Una vez enfriados y lavados los cortes con TBS (Tris 50 mM y NaCl 0.15 M), las peroxidases endógenas se bloquearon con un tratamiento de H₂O₂ al 3% en metanol durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron bajo agua corriente y se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas empleando R.T.U. Animal Free Blocker™ and Diluent (VECTOR Laboratories® Burlingame, California, EE.UU.), que se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente y en humedad. A continuación, se añadió el anticuerpo primario, anti-MRP8 [EPR3554] (1/250) (ab92331, Abcam®, Cambridge, Reino Unido) que fue incubado a 4 °C, de nuevo en atmósfera húmeda, durante toda la noche. Al día siguiente, las secciones se lavaron tres veces con TBS antes de incubarse con el anticuerpo secundario biotinilado provisto en Vectastain®ABC kit (VECTOR Laboratories®) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en humedad. Tras lavar de nuevo tres veces con TBS, se incubaron las secciones durante otros 30 minutos, en idénticas condiciones, con el complejo enzimático avidina/biotina de Vectastain®ABC kit (VECTOR Laboratories®). Finalizada la incubación y tras realizar 3 lavados en TBS y un último en agua destilada, las secciones fueron reveladas utilizando DAB+chromogen (1/50 en Substrate buffer) (DAKO Real™, Agilent®, Santa Clara, California, EE.UU.). Tras lavar con agua del grifo, se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina de Harris durante 3 segundos. Por último, las secciones son deshidratadas con etanol de creciente concentración y, finalmente, xileno antes de proceder a su montaje final. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Leica DMI3000 B con aumento de 40x. La evaluación de la infiltración neutrofílica se realizó examinando diversos

campos a este aumento, valorando la extensión de zonas infiltradas así como el número de células, puntuando ambos parámetro de 0 a 3.

2.4.3. Análisis sanguíneo general

La extracción de sangre se realizó directamente del corazón en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI/ml). Con objeto de evaluar diferentes parámetros de interés en sangre, tales como hemoglobina, hematocrito, eritrocitos, plaquetas, leucocitos totales, linfocitos, monocitos y neutrófilos, se analizó una muestra (30 μ l) en un contador hematológico (Mythic[®]22CTC2 Diagnostics).

2.4.4. Obtención del plasma sanguíneo

El resto de sangre obtenida fue sometida a una centrifugación a 857 x g durante 10 minutos a 4 °C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su uso posterior.

En el modelo de pancreatitis aguda, la actividad en plasma de las enzimas glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT), así como la concentración de bilirrubina total y directa, se determinaron empleando kits comerciales específicos (Spinreact[®], Gerona, Spain) en el BS-200 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics[®] Co., LTD Shenzhen, China.). La actividad amilasa plasmática se estudió mediante un ensayo colorimétrico empleando el kit distribuido por Abcam[®] (ab102523).

2.4.5. Determinación de glucosa en sangre

La confirmación de la hipoglucemia característica asociada a la endotoxemia se llevó a cabo utilizando tiras reactivas y un glucómetro (Accu-Chek Aviva[®], Roche, Barcelona, España) tomando una pequeña muestra de sangre del extremo distal de la cola del animal.

2.4.6. Determinación de la temperatura

La temperatura de los ratones se determinó en la zona abdominal, previamente rasurada para evitar la interferencia del pelaje. Para ello, se usó un termómetro por radiación infrarroja específicamente desarrollado para roedores (Bioseb[®], Francia).

3. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

3.1. Diseño experimental *ex vivo*

En todos los experimentos *ex vivo*, excepto en aquellos en los que se indica lo contrario, se siguió el mismo protocolo experimental. Las placas de cultivo utilizadas en todos los casos, excepto donde se indica, fueron de polipropileno con tratamiento superficial para células adherentes, las cuales fueron suministradas por Thermo Scientific NUNC™ (Roskilde, Dinamarca).

3.2. Aislamiento de células acinares

Se siguió el siguiente protocolo previamente descrito con algunas modificaciones [400]. Antes de proceder al aislamiento de las células acinares, el medio utilizado, DMEM sin FBS (*fetal bovine serum*), se calentó a 37 °C y burbujeó con una mezcla 5% CO₂/95% O₂ durante aproximadamente 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó el inhibidor de la tripsina de la soja (SBTI, del inglés *soybean trypsin inhibitor*) a una concentración final de 0,1 mg/ml. Una vez disuelto, el medio se dividió con el fin de preparar 4 soluciones, con volúmenes adecuados para 1-3 ratones:

Solución de digestión: contiene 10 ml del medio anterior, 25 mg de albúmina sérica bovina (BSA) y 1,6 mg de colagenasa tipo IV (C5138, procedente de *Clostridium histolyticum*, 625 U/mg)

Solución de lavado: 10 ml del medio inicial y 100 mg de BSA

Solución de centrifugado: 50 ml de medio inicial y 2 g de BSA

Solución para incubación: 100 ml de medio inicial y 100 mg de BSA

Una vez preparadas las soluciones anteriores, se procedió al sacrificio de los animales y a la extracción de los páncreas, que una vez lavados con *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) y libres de restos de sangre, se cortaron en pequeños fragmentos que fueron incubados con la solución de digestión. Dicha incubación se prolongó durante 30 minutos, y, cada 5 minutos, el contenido se hizo pasar varias veces por una pipeta serológica de volumen decreciente (20 ml, 10 ml y 5 ml). Finalizado el tiempo de la incubación, el contenido se hizo pasar a través de un filtro de 100 µM (Falcon® 431752, Corning®, Nueva York, EE.UU.). Para arrastrar los restos de células acinares que pudieran quedar en el filtro se añadió solución de lavado. La suspensión celular resultante se dividió en 4 tubos, dejando

caer el líquido lentamente por la pared. A cada uno de estos tubos se le añadió 6 ml de la solución de centrifugado, y se sometieron a centrifugación a 50 x g durante 2 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue retirado y el botón de células acinares fue resuspendido cuidadosamente en otros 6 ml de la solución de centrifugado. En este momento, los tubos con el mismo origen se combinaron 2 a 2. Tras volver a centrifugar, las células fueron resuspendidas en 5 ml de la solución de incubación y los dos tubos restantes fueron combinados en uno solo. Después de una nueva centrifugación, las células se resuspendieron en 25 ml de solución de incubación y la suspensión celular fue estabilizada mediante incubación a 37 °C, al tiempo que fue burbujeada de nuevo con la mezcla 5% CO₂/95% O₂ durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron de nuevo y resuspendieron en 75 ml de solución de incubación, tras lo cual pudieron ser sembradas en placas de 6 pocillos, 2 ml por pocillo. La estimulación de las células acinares se llevó a cabo con ceruleína a 5 µM. Tras 3 horas, el sobrenadante se centrifuga a 381 x g durante 5 minutos a 4 °C, y las células sedimentadas, así como aquellas que hubieran quedado adheridas en la placa, se procesan para la extracción de RNA.

En el experimento de inhibición *in vitro* de TNAP, el procedimiento fue análogo al descrito con anterioridad. Sin embargo, las células acinares fueron incubadas con el inhibidor de TNAP levamisol a una concentración de 1 mM durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se retira, se lavan las células y estas se incuban con ceruleína en las mismas condiciones.

En el caso de la obtención de células acinares a partir de ratones con pancreatitis aguda inducida mediante la administración intraperitoneal de ceruleína, se siguió el protocolo anteriormente descrito, con la salvedad de que el periodo de digestión fue reducido a 15 minutos, y, puesto que no era necesario el cultivo de las células extraídas, una vez llevada a cabo la filtración y el proceso de lavado, las células fueron recogidas y procesadas para obtener el RNA.

3.3. Obtención de organoides de yeyuno de ratón

El desarrollo de organoides es una técnica relativamente reciente. En ella, a partir de las células madre intestinales se generan unas estructuras tridimensionales que contienen todos los tipos celulares existentes a nivel intestinal. Los organoides, que contienen estructuras tipo criptas y en las que el lumen se localiza hacia el interior, son considerados la mejor aproximación para el estudio del epitelio intestinal *in vitro*.

Para su obtención, tras sacrificar el ratón, el yeyuno se extrae y se limpia con PBS frío. A continuación, se abre longitudinalmente y se corta en fragmentos pequeños de aproximadamente 0,5 cm. Para completar el lavado, se pasan a un tubo de 15 ml con 5 ml de PBS, el cual se mantiene en agitación durante 5 minutos en frío. Transcurrido este tiempo, se retira el PBS y se añaden otros 10 ml de PBS con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración final de 2 mM. En este medio, los fragmentos se mantienen en agitación durante 30 minutos a 4 °C. Tras la incubación, se dejan sedimentar los fragmentos de tejido antes de retirar el sobrenadante. El tejido sedimentado se resuspende en 10 ml de DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM, para, tras ello, realizar una agitación a mano durante 2 minutos. Este proceso es suficiente para extraer las criptas, en las que se encuentran las células madre. Después de filtrar a través de un filtro de 70 µm (Falcon®, 352350, Corning®), se procede a contar las criptas. Se sembrarán en unas pequeñas gotas de un volumen total de 50 µl, compuestas por un volumen igual de suspensión de criptas en medio (750 criptas por pocillo) y de Matrigel™ (Corning®). Las placas se introducen en el incubador durante 15 minutos, dado que a 37 °C el matrigel va a solidificar. Una vez la gota es estable, se adicionan 500 µl de IntestiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL®, Vancouver, Canadá). Los experimentos llevados a cabo sobre los organoides se realizaron tras dos pases y en el día 6 después de la siembra, tiempo suficiente para el completo desarrollo de los mismos.

Los organoides procedentes de ratones WT y/o TNAP^{+/-} fueron tratados con LPS (1 µg/ml) o bien con las citoquinas IFN-γ (100 ng/ml), TNF o IL-1β (10 ng/ml) (eBiosciences®, San Diego, California, EE.UU.). Tras 24 horas de incubación, el sobrenadante se descarta y los organoides son procesados para la extracción de RNA.

3.4. Obtención de macrófagos del bazo

Para la obtención de poblaciones purificadas de macrófagos del bazo, se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania). Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo que fue dispuesto en medio de cultivo DMEM, suplementado con L-glutamina (2 mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomina [0,1 mg/ml] y anfotericina B [2,5 µg/ml]). Una vez eliminada la grasa adherida al órgano, los bazos fueron presionados mecánicamente con la parte posterior del émbolo de una jeringa de 5 ml estéril, con objeto de desorganizar su estructura y obtener una suspensión celular. A continuación, dicha suspensión fue centrifugada a 161 x g

durante 5 minutos a 4 °C. El botón de células se sometió a lisis de eritrocitos, utilizando un tampón de lisis celular (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max), el cual se dejó actuar durante 30 segundos a temperatura ambiente antes de proceder a lavar rápidamente las células para evitar cualquier daño celular. El siguiente paso consistió en obtener una suspensión monocelular y eliminar restos del órgano de procedencia utilizando un filtro de 70 µm. A continuación, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0,04% (p/v).

Se utilizó el kit *CD11b MicroBeads mouse/human* (130-049-601, Miltenyi Biotec®) siguiendo el protocolo del fabricante, mediante el cual se realiza una purificación positiva de estas células. Se marcan magnéticamente las células CD11b+ (empleando *CD11b microbeads*) y, a continuación, la suspensión celular se hace pasar por unas columnas sometidas a un campo magnético (*MS columns*, 130-042-201, Miltenyi Biotec®). Las células marcadas quedarán en consecuencia retenidas en la columna, mientras que la población negativa pasará a través de la misma. Tras retirar la columna, las células retenidas se pueden eluir y obtener la fracción celular seleccionada positivamente, cuya pureza fue determinada mediante citometría de flujo utilizando un FACS Calibur™ (BD Biosciences®, California EE. UU.). Éstas fueron marcadas con el anticuerpo FITC-CD45 (1/150, 130-102-491, Miltenyi Biotec®) (marcador común en leucocitos) y con PE-CD11b (1/200, 553311, BD Biosciences®). La pureza obtenida fue de alrededor del 90%.

3.5. Obtención de macrófagos intraperitoneales

La cantidad de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal es reducida, sin embargo, su número se puede incrementar drásticamente mediante la administración intraperitoneal de medio tioglicolato al 3% [401] (211716, BD Biosciences®). El procedimiento se lleva a cabo inyectando a los ratones 2,5 ml de medio tioglicolato, que fue preparado, al menos, dos meses antes de llevar a cabo los experimentos. No se suele utilizar el medio recién preparado debido a que, con el tiempo, tienen lugar reacciones no enzimáticas entre proteínas y azúcares reducidos que favorecen la producción de productos finales de glucosilación avanzada. Estos productos han sido relacionados con un incremento en la respuesta inflamatoria [402]. Tras 3 o 4 días, los ratones fueron sacrificados. Con cuidado de no seccionar el peritoneo, se retira la piel del abdomen. Posteriormente, se inyecta en la cavidad peritoneal 10 ml de HBSS frío y se masajea el abdomen. Tras esto, se procede a aspirar el fluido del interior del peritoneo lentamente. El líquido resultante se incuba en una atmósfera de CO₂ (5%) a 37 °C durante 2 horas en placas de cultivo para bacterias (no tratadas)

(Falcon®, 351146, Corning®), tiempo suficiente para que los macrófagos se peguen a la placa. Pasadas las 2 horas, se retira el sobrenadante y la placa se lava con PBS estéril. A continuación, las células se despegan incubando con EDTA 10 mM en PBS durante 10 minutos. Tras ser despegadas, las células se recogen y se centrifugan a 161 x g durante 5 minutos a 4 °C. En caso de detectarse presencia de glóbulos rojos, se puede realizar la lisis siguiendo el protocolo anteriormente descrito. La pureza de las células aisladas fue verificada mediante un marcaje análogo al seguido con las células del bazo, obteniendo una pureza de, aproximadamente, un 85%.

3.6. Obtención de macrófagos procedentes de médula ósea

La médula ósea es una de las fuentes más utilizadas para la extracción de macrófagos tras un proceso de diferenciación a partir de sus células precursoras. Una vez sacrificados los ratones, se extraen la tibia y el fémur de ambas patas traseras, una vez limpias de piel y músculo. Estos se sumergen en medio RPMI completo (FBS al 10%, L-glutamina (2 mM) y antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomina [0,1 mg/ml] y anfotericina B [2,5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol), momento a partir del cual se manejan en condiciones estériles (en campana). En primer lugar, se lavan los huesos con etanol y, a continuación, se someten a tres lavados con PBS frío. Después, se cortan las epífisis de ambos huesos y con una jeringa se introducen 10 ml de RPMI completo con EDTA 2 mM en su interior. El líquido, que arrastrará la médula del interior del hueso, se hace pasar a través de un filtro de 100 µm (Falcon®, Corning®). Al final, los huesos deben quedar blancos, es decir, sin restos de médula, para lo cual resulta de utilidad raspar con la aguja el interior al tiempo que se introduce líquido. Con unas tijeras, se trocean los restos de hueso en pequeños fragmentos que serán presionados con el émbolo de la jeringa sobre el filtro, el cual es inmediatamente lavado con 2 ml de RPMI completo que incorpora EDTA 2 mM. La suspensión celular resultante se centrifuga a 427 x g durante 7 minutos a 4 °C, tras lo cual, se realiza la lisis de glóbulos rojos siguiendo el protocolo anteriormente detallado. Finalmente, se resuspenden en RPMI completo y se cuentan empleando una solución de azul tripán al 0,04% (p/v). Las células se siembran en placas de Petri no tratadas, 15 millones por placa, las cuales se estimulan con M-CSF (*Macrophage colony-stimulatin factor*) (576404, Biolegend®, California, EE.UU.) a una concentración de 20 ng/ml. Las células se incuban en una atmósfera de CO₂ (5%) a 37 °C. El día 2, se añaden 10 ml más de medio RPMI completo con M-CSF a la misma concentración; no se quita todo el medio de una vez porque las células, en

el proceso de diferenciación, producen señales autocrinas, que no conviene eliminar. El cuarto día, momento en el que las células ya están adheridas a la placa, se quitan 10 ml de medio y se añaden otros 10 ml de medio fresco con M-CSF. Finalmente, el sexto día, las células estarán completamente diferenciadas y pueden emplearse para posteriores experimentos. Se despegan empleando EDTA a 10mM en PBS siguiendo el mismo protocolo detallado con anterioridad. De nuevo, se determinó la pureza de las células aisladas, siendo esta de más de un 90%.

3.7. Aislamiento de neutrófilos de la médula ósea

Los neutrófilos presentes en la médula ósea pueden ser aislados mediante gradiente de densidad. Para llevar a cabo el aislamiento, primero las células se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo empleado para la obtención de los macrófagos de la médula ósea (ver punto anterior). Una vez se ha obtenido el botón de células, estas se resuspenden en 1 ml/ratón de PBS estéril. A continuación, se ponen 3 ml de Histopaque® 1119 en el fondo de un tubo de 15 ml, y, sobre este, 3 ml de Histopaque® 1077. Ambos reactivos deben estar a temperatura ambiente. Sobre ambas fases, se procedió a pipetear la suspensión celular con precaución para evitar alterarlas. Tras centrifugar a 872 x g durante 30 minutos, sin freno y a temperatura ambiente, las células, las cuales forman un halo en la interfase, son recogidas y lavadas dos veces con RPMI completo.

La pureza de las células obtenidas fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACS Calibur™ (BD Biosciences®). Las células fueron marcadas con el anticuerpo FITC-CD45 (Miltenyi Biotec®), con PE-CD11b (BD Biosciences®), PercP-Ly6G (1/150, 130-103-861, Miltenyi Biotec®) y APC-CD4 (1/200, 553051, BD Biosciences®). Los neutrófilos fueron definidos por el doble marcaje CD11b+ Ly6G+. La pureza obtenida fue de alrededor del 75%, siendo la presencia de monocitos o linfocitos residual.

3.8. Cultivo celular

Una vez obtenidos los macrófagos o neutrófilos, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0,04% (p/v).

Los macrófagos obtenidos de las tres fuentes anteriormente descritas, así como los neutrófilos procedentes de la médula, fueron cultivados en RPMI suplementado (completo) con FBS al 10%, L-glutamina (2 mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0,1 mg/ml] y anfotericina B [2,5 µg/ml])

y 50 μ M de β -mercaptoetanol, a una densidad celular de 1 millón de células/ml. El cultivo se realizó en una atmósfera de CO₂ (5%) a 37 °C, empleándose como estímulo LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas. En el caso de los estudios de inhibición de la TNAP, los macrófagos se incubaron 2 horas a 37 °C antes de su estimulación con LPS en medio de cultivo RPMI completo con los inhibidores: levamisol (1 mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1 mM). Las muestras de medio de cultivo obtenidas fueron centrifugadas a 381 x g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

En el experimento de administración intraperitoneal de LPS *in vivo*, los macrófagos intraperitoneales que fueron extraídos se sembraron sin aplicar ningún estímulo adicional durante 24 horas.

En el caso de los medios condicionados, en primer lugar se estimularon los macrófagos WT y TNAP^{+/-} de bazo, cavidad peritoneal o médula ósea con LPS durante 24 horas. El medio condicionado se obtuvo tras centrifugar la placa de cultivo a 381 x g durante 5 minutos a 4°C y fue conservado a -80 °C hasta su posterior utilización. Los medios condicionados fueron luego empleados (previa comprobación por ELISA de sus niveles de citoquinas) solamente en macrófagos WT de su origen correspondiente (bazo, cavidad peritoneal o médula ósea) a una proporción 1/10 en RPMI completo.

3.9. Ensayo de diferenciación de monocitos/macrófagos hacia M1 y M2

Para la realización de este ensayo, los monocitos/macrófagos fueron obtenidos del bazo, médula ósea y de la cavidad peritoneal según se ha descrito previamente. Las células purificadas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI suplementado con 2% FBS, L-glutamina (2 mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0,1 mg/ml], anfotericina B [2,5 μ g/ml]) y 50 μ M 2-mercaptoetanol, a 37 °C y 5% de CO₂ atmosférico en placas de 6 pocillos sin tratar y a una densidad de 0.5 x 10⁶ células/ml. Tras 24 horas, las células fueron estimuladas con diversos antígenos y citoquinas para su diferenciación a las distintas poblaciones M1 y M2. Para la polarización M1, las células se estimularon con IFN- γ (100 ng/ml) (eBioscences®) y LPS (20 ng/ml); mientras que la polarización hacia M2 se consiguió tras estimular con IL-4 (20 ng/ml) (Biolegend®). Pasadas otras 24 horas, las células fueron despegadas incubando la placa de cultivo con EDTA 10 mM en PBS durante 10 minutos. Tras este tratamiento, las células pueden ser fácilmente despegadas con la pipeta. La polarización M1/M2 se

verificó mediante citometría de flujo tras el marcaje de marcadores superficiales e intracitoplasmáticos característicos. Para el estudio de la polarización hacia M1 se utilizó un marcaje de FITC-CD45 (1/150, Miltenyi Biotec®), PE-CD11b (1/200, BD Biosciences®), APC-CD38 (1/25,130-103-030, Miltenyi Biotec®). Por su parte, para la comprobación de la polarización hacia M2 se empleó como marcaje de FITC-CD45 (1/150, Miltenyi Biotec®), PE-CD11b (1/200, BD Biosciences®), PercP-PD-L2 (1/25, 130-102-873, Miltenyi Biotec®) y marcaje intracelular tras permeabilización con APC-CD206 (1/50, 17-2061-80, ThermoFisher®, Massachusetts, EE.UU.)

3.10. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada

Los macrófagos de diversa procedencia fueron sembrados en placas de 6 pocillos sin tratar. Las células fueron tratadas con M-CSF (100 ng/ml) y fueron expuestas a [³H]-timidina (1 µCi/ml; GE Healthcare, España) de la siguiente manera: en el caso de los macrófagos procedentes de bazo así como los intraperitoneales, se sembraron 400.000 células, que fueron expuestas a la timidina durante 7 días desde la extracción, cambiando el medio y la timidina cada 48 horas; en el caso de los obtenidos de la médula ósea, se sembraron 4 millones de células procedentes de la médula ósea y se incubaron con timidina desde la siembra hasta el séptimo día (en el cual las células ya están diferenciadas), cambiando la timidina al mismo tiempo que el medio (según lo descrito con anterioridad). Tras dicho periodo de incubación, las células fueron recolectadas empleando EDTA a 10 mM en PBS y sometidas a varios lavados con PBS y una solución de ácido tricloroacético al 10% (v/v). Seguidamente, se realizó la lisis celular mediante una solución 1 N de NaOH que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron dispuestas en viales adecuados a los que se les añadió 5 ml de líquido de centelleo (Beckman Coulter, Madrid, España). La radioactividad contenida en el vial y debida a la incorporación de la timidina tritiada en las células fue cuantificada mediante un analizador de centelleo líquido Beckman LS-6000 (Madrid, España). Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm).

4. TÉCNICAS GENERALES

4.1. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en distintos tejidos/células y actividad mieloperoxidasa en colon

La actividad fosfatasa alcalina fue caracterizada en el plasma de ratones con pancreatitis aguda, así como con endotoxemia. En este último experimento, también se midió la actividad en hígado y yeyuno. Tras extraer los tejidos, estos fueron homogeneizados mecánicamente (utilizando un sistema de bolitas que golpean y homogeneizan las muestra, Bullet Blender®, Next Advance®, Troy, Nueva York, EE.UU.) en un tampón (pH 6) compuesto por Tris Base (0.2 M) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (p/v). A continuación, se sometió a sonicación y el homogenado se centrifugó a 16089 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividad enzimática en los distintos tejidos, así como el plasma. La actividad fosfatasa alcalina (AP) fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sabokbar y col., y ampliamente utilizado en nuestro grupo de investigación, en el cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el *p*-nitrofenilfosfato sódico en tampón glicina 50 mM con MgCl₂ 0,5 mM (pH 10,5) [16, 403]. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína.

4.2. Ensayo de toxicidad por ensayo de MTT

En ensayo MTT es un análisis colorimétrico que permite estudiar la actividad metabólica de las células e, indirectamente, la viabilidad celular. El experimento se basa en la formación de formazán, un compuesto de color violáceo e insoluble (teóricamente proporcional al número de células viables) a partir de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Este ensayo fue utilizado para la determinación de la toxicidad de los macrófagos a los inhibidores de TNAP: levamisol (1 mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1 mM). En este ensayo, tras lavar con PBS dos veces la placa con las células adheridas, se añaden a las células 300 µl de “*MTT working solution*” (1/10 en DMEM sin suero, a partir de una solución madre a 5 mg MTT/ml H₂O₂). Tras aproximadamente 30 minutos de incubación a 37 °C, se retira el medio completamente y se añaden 100 µl de isopropanol acidificado (40 mM de HCl en 100% de isopropanol), el cual va a solubilizar el colorante producido por las células. Tras 5 minutos en agitación, el contenido de la placa se transfiere a una

placa de 96 pocillos. Finalmente, se mide la absorbancia a 570 nm. Los resultados se expresan como porcentaje frente al promedio de las células control.

4.3. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular, en plasma y en homogenado de páncreas mediante ELISA

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares, el sobrenadante se obtuvo tras centrifugar a 381 x g durante 5 minutos a 4 °C lo cual permitió eliminar los restos celulares. Hasta su posterior utilización, el sobrenadante fue conservado a -80 °C. La detección de citoquinas de ratón mediante ELISA se realizó mediante los kits IL-6, TNF suministrados por Thermo Fisher®.

Se estudió la concentración de citoquinas en un fragmento de páncreas del experimento de pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Para ello, se homogeneizó mecánicamente (Bullet Blender®) en un tampón compuesto por Tris Base (0,2 M) y HTAB al 0,5% (p/v) a una concentración final de 50 mg/ml. Una vez centrifugado a 9520 x g y 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante fue recogido y conservado a -80 °C hasta su utilización. La detección de las citoquinas se realizó mediante ELISA empleando los kits IL-6, IL-1 β (Thermo Fisher®) y MCP-1 (BD Biosciences®).

4.4. Extracción y cuantificación del contenido proteico

Con el fin de determinar el contenido en proteínas, tanto los tejidos como las células fueron sometidos a un proceso de homogeneización en tampón de lisis (RIPA) frío, el cual está compuesto de SDS al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y Tritón X-100 al 1% en PBS. A este tampón de lisis se le añaden un inhibidor de proteasas comercial en proporción 1/200 e inhibidor de fosfatasa (Santa Cruz, Biotechnology®, Dallas, Texas, EE.UU.) a una proporción 1/100. A continuación, el homogenado fue sometido a ultrasonidos con el fin de completar la lisis celular, tras lo cual, se procedió a centrifugar la muestra a 9520 x g durante 10 minutos a 4 °C. Así eliminados los restos celulares, el sobrenadante, el cual contiene la totalidad de las proteínas celulares, se conservó a -80 °C hasta su utilización. Dicho contenido proteico fue cuantificado mediante el método del ácido bincinchónico [404], en el cual se emplea la albúmina sérica bovina como estándar.

4.5. Western Blot

Las muestras obtenidas siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se mezclaron en la proporción adecuada con el tampón de carga comercial 4X suministrado por BioRad® (California, EE.UU.) y fueron calentadas a 100 °C

durante 5 minutos. La posterior separación de las proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida comerciales (Criterion TGX, BioRad®, Hercules, California, EE.UU.). A continuación se procedió a la transferencia de las proteínas separadas a membranas de nitrocelulosa (TransBlot® Turbo™, BioRad®). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M y Tween-20 1% (v/v)). Finalizado el bloqueo, las membranas fueron expuestas a los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C en agitación. Los anticuerpos empleados fueron: P-STAT3, STAT3, P-AKT, AKT, P-IkB α e IkB α , a una concentración de 1/1000, con la excepción de P-STAT3 que fue utilizado a 1/2000 (Cell signaling®, Massachusetts, EE.UU.). Todos los anticuerpos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica al 5%. Los anticuerpos secundarios fueron preparados en leche desnatada al 5% en TBS-T, e incubados durante 1 hora. Este anticuerpo está conjugado con una enzima peroxidasa, de modo que las bandas fueron detectadas usando un reactivo generador de quimioluminiscencia (Perkin Elmer, Life Sciences®, Massachusetts, EE.UU.). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Image J, siendo expresados como la relación directa entre la expresión de la proteína fosforilada y la de la proteína total.

4.6. Extracción de RNA y reacción de retrotranscripción

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

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

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando SYBR®Green como fluoróforo (GoTaq®qPCR Supermix, Promega®, Francia) para el análisis de la expresión de diversos genes. El gen de referencia elegido fue la subunidad 18S del RNA ribosómico (18s) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*). Las

muestras se analizaron por triplicado. Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la Tabla 7, teniendo en cuenta que en todos los casos la especie de interés fue el ratón.

4.8. Citometría de flujo

Para el análisis de la expresión de determinados marcadores celulares y, por tanto, el estudio de la abundancia relativa de diferentes subpoblaciones celulares de carácter inmunológico, se hizo uso del citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences®). Las células fueron marcadas y preparadas para su análisis de la siguiente manera. Tras su obtención, fueron lavadas con tampón de marcaje para citometría de flujo (FACS: PBS, 2% albúmina (p/v), EDTA 10 mM, Azida sódica 0,1% (p/v)). Seguidamente, se realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos suministrados por BD Biosciences® o Miltenyi Biotec®. Se utilizaron diluciones que oscilan entre 1/100 y 1/200, excepto el anti-mouse PercP-PD-L2 y APC-CD38 (Miltenyi Biotec®) que se emplearon a 1/25; y APC-CD301 (130-110-288, Miltenyi Biotec®), que se utilizó a 1/50. En la misma solución de marcaje se incluye mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 (eBiosciences®), a una dilución de 1/500. Transcurridos 30 minutos de exposición a anticuerpos superficiales a 4 °C, las células fueron lavadas y fijadas en PBS-paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 4 °C, lavadas una vez y, finalmente, resuspendidas en tampón de marcaje hasta su adquisición. Para la polarización M1 se empleó como marcaje: FITC-CD45, PE-CD11b, APC-CD38; para M2: FITC-CD45, PE-CD11b, PercP-PD-L2, APC-CD206. En el experimento *in vivo* con LPS, se empleó el siguiente marcaje superficial: FITC-CD45, PE-CD11b, Percp-CD11c (1/150, 130-103-876, Miltenyi Biotec®), APC-CD301 (1/50).

En el caso del marcaje de CD206, de localización predominante citoplasmática, una vez realizado el marcaje de moléculas superficiales, las células fueron permeabilizadas usando el kit específico de permeabilización nuclear (*Foxp3 transcription factor fixation/permeabilization*, eBiosciences®), marcadas usando el anticuerpo APC-206 (ThermoFisher®) a 1/50 e incubadas durante toda la noche a 4 °C.

Los datos arrojados por el citómetro de flujo fueron analizados mediante la herramienta informática FlowJo (Tree Star, California, EE. UU.).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). Los valores obtenidos representan el valor medio entre hembras y machos, a excepción de los experimentos de pancreatitis y relacionados, en los cuales solamente se emplearon machos. Para determinar la significación estadística, se utilizó, según el caso, un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) y un test de significación *a posteriori* (Fisher LSD). En caso de comparación de muestras apareadas se utilizó el análisis t-Student. La significación estadística se consideró para un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática GraphPad Prism 6. (GraphPad Software Inc, California, EE. UU.).

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

<i>Gen</i>	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 3'-5'
<i>18s</i>	ACACGGACAGGATTGACAGATTG	GCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG
<i>Acta2</i>	CATCTTTCATTGGGATGGAG	TTAGCATAGAGATCCTTCCTG
<i>Akp3</i>	GAAAGCAGGAAAATCCGTAG	CATGTTGGAGATGAGTTGTG
<i>Alpi</i>	CATGGACATTGATGTGATCC	AGACTGGTTACTGTCACTTG
<i>Alpl</i>	ATTCCCACTATGTCTGGAAC	CTCAAAGAGACCTAAGAGGTAG
<i>Amy2a1</i>	GAATTCAGAGACATGGTGAC	CCCTGTTATTTGGATTGAGG
<i>Bax</i>	CCTTTTTGCTACAGGGTTTC	ATATTGCTGTCCAGTTCATC
<i>Ccl2</i>	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TTGGTGACAAAACTACAGC
<i>Cd14</i>	GAATCTACCGACCATGGAG	AAGTTGCAGGAACAACCTTC
<i>Cxcl1</i>	CCGAAGTCATAGCCCACTCAAG	ACCAGACAGGTGCCATCAGAG
<i>Cxcl10</i>	AAAAAGGTCTAAAAGGGCTC	AATTAGGACTAGCCATCCAC
<i>Cxcl2</i>	GGGTTGACTTCAAGAACATC	CCTGCCTTTGTTCAAGTATC
<i>Cxcl9</i>	GAGGAACCCTAGTGATAAGG	GTTTGATCTCCGTTCTTCAG
<i>Hprt</i>	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG

<i>Ifng</i>	TGAGTATTGCCAAGTTTGAG	CTTATTGGGACAATCTCTTCC
<i>Il10</i>	CAGGACTTTAAGGGTACTTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
<i>Il1b</i>	GGATGATGATGATAACCTGC	CATGGAGAATATCACTTGTTGG
<i>Il6</i>	AAGAAATGATGGATGCTACC	AGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
<i>Itgam</i>	AAGATCTTTGCAATTGAGGG	CTCTGGTTGTGTTGATGAAG
<i>Itgax</i>	AGTCTGTTGGTTCTGTAAG	ACAGTTCTGTTATGACATGC
<i>Lbp</i>	CACTCCCCAGATATACAAAAAG	AGGCAAATACATTAGTGACC
<i>Mrc1</i>	AAATGATGAGCTGTGGATTG	CCATCCTTGCCTTTCATAAC
<i>Nos2</i>	GGTCTTTGAAATCCCTCTCG	CAGAAGTCTCGAACTCCAATC
<i>Ocln</i>	ACGGACCCTGACCACTATGA	TCAGCAGCAGCCATGTACTC
<i>Selplg</i>	CATGTCCTGCTTCTCTGATTC	ATGTTTATTGGATGCCTGTG
<i>Tgfb1</i>	GGATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAAATATAG
<i>Tjp1</i>	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
<i>Tlr4</i>	GATCAGAAACTCAGCAAAGTC	TGTTTCAATTCACACCTGG
<i>Tnf</i>	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN UN MODELO DE PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR CERULEÍNA

Con el fin de estudiar la posible implicación de la TNAP en la pancreatitis aguda, se emplearon ratones heterocigotos para la expresión de esta enzima debido a que los knockout homocigotos no son viables, consecuencia de las alteraciones previamente descritas y que consisten en una defectuosa mineralización ósea y en el desarrollo de ataques epilépticos asociados a un metabolismo imperfecto de piridoxal 5'-fosfato (aumentando sus niveles en plasma y dando lugar a bajos niveles de GABA en el cerebro) [146]. El fenotipo de los ratones heterocigotos (TNAP^{+/-}) es en principio totalmente normal, de forma que en cuanto a apariencia y comportamiento general son indistinguibles de los ratones *wild type* (WT; TNAP^{+/+}), lo que hace necesario su genotipado. En un artículo publicado previamente por nuestro grupo de investigación, se analizó la expresión de TNAP en diversos tipos celulares [32], pero hasta la fecha no se ha descrito el posible papel de TNAP en páncreas y células acinares. Por este motivo, estudiamos el papel de la TNAP en un modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína a una dosis de 50 µg/kg de peso corporal. La administración se llevó a cabo por vía intraperitoneal, en intervalos de una hora hasta un total de 7. La ceruleína es un análogo de la colecistoquinina (CCK), cuya acción está mediada por la unión a sus receptores (más que a un efecto tóxico directo). En principio, CCK y sus análogos estimulan una secreción enriquecida de proteínas, pero cuando la estimulación es supramáxima se genera una secreción reducida y una acumulación de proteínas que conduce al daño en el páncreas [405].

La administración repetida de ceruleína generó un cuadro de pancreatitis caracterizado por la existencia de edema e infiltración celular, como puso de manifiesto la evaluación histológica. Sin embargo, el análisis del índice de daño no mostró diferencias entre los ratones WT y TNAP^{+/-} (Figura 1A/B).

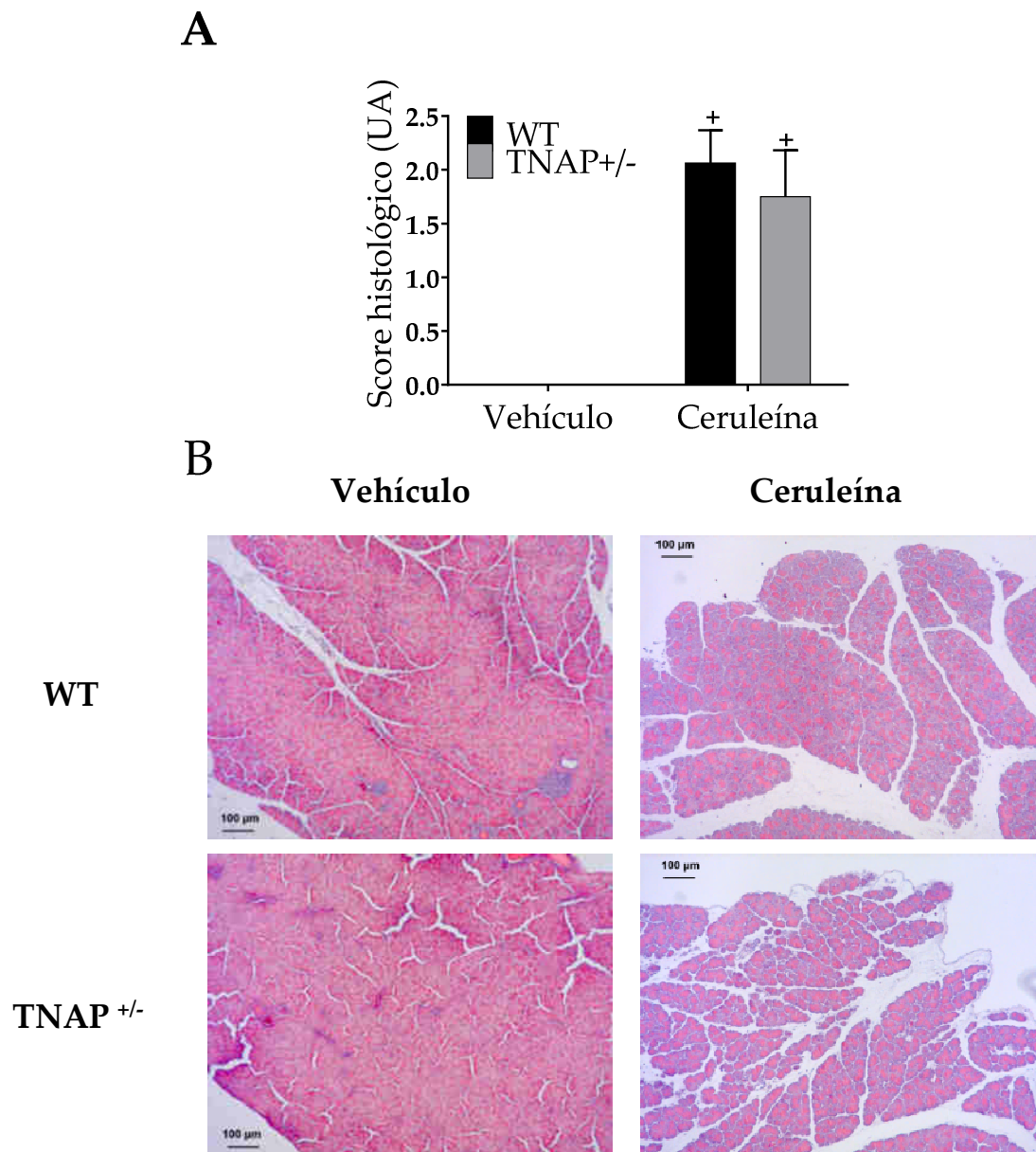


Figura 1. Histología del páncreas. A) Score histológico de secciones de páncreas teñidas con hematoxilina eosina (B), expresado en unidades arbitrarias (UA) (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, † $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A continuación pasamos a analizar parámetros bien caracterizados en este modelo. La expresión de amilasa 2a1 (*Amy2a1*) estaba reducida de manera drástica en ambos grupos, tal como se ha descrito con anterioridad [406, 407] (Figura 2A). La alfa-actina del músculo liso (*Acta2*) es un marcador de la activación de las células estrelladas pancreáticas. El incremento de su expresión se asocia a la fibrosis y a la pancreatitis crónica [408, 409]. En este caso, aunque se observa una

cierta tendencia al aumento en los ratones TNAP^{+/-}, no se llegaron a producir cambios en su expresión, probablemente debido a la progresión aguda de la pancreatitis (Figura 2B). Otro gen analizado en el páncreas total fue *Bax* (*Bcl-2-associated X protein*), un marcador de apoptosis y necrosis. En este caso se encontró que la expresión de este gen era dos veces superior en ratones TNAP^{+/-} respecto a los WT (Figura 2C).

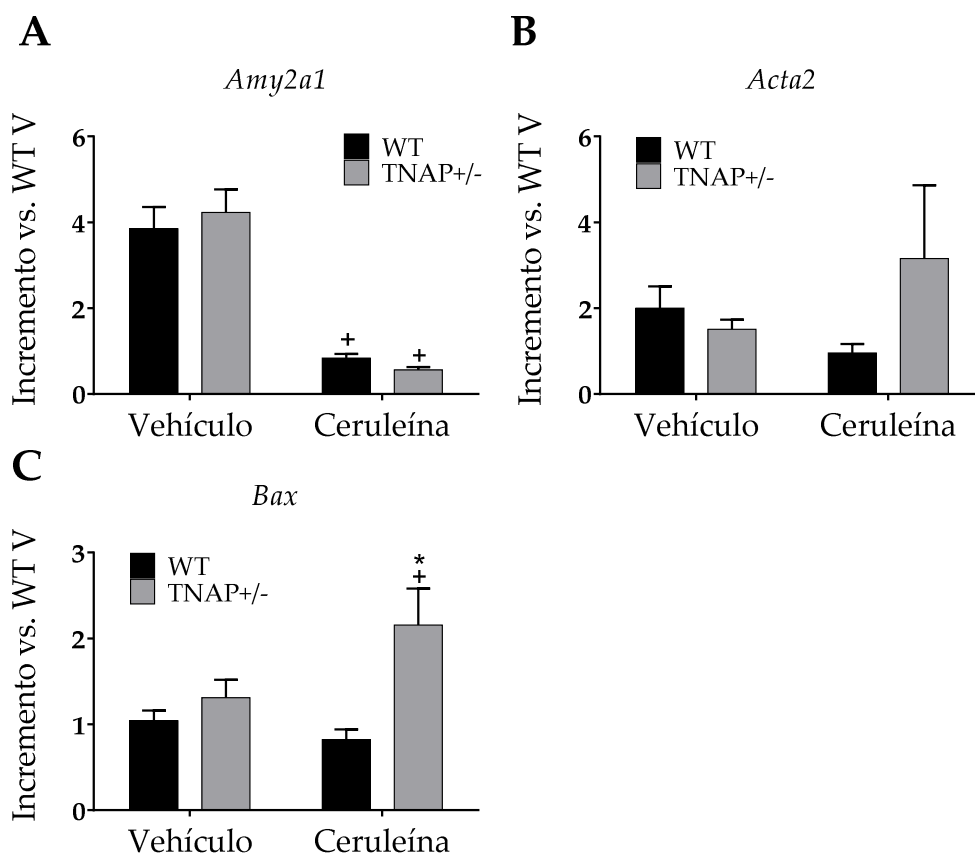


Figura 2. Expresión de diversos genes relacionados con la pancreatitis. Niveles de mRNA de *Amy2a1* (A), *Acta2* (B) y *Bax* (C) en páncreas (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Por otra parte, se analizó la actividad de la amilasa en plasma, encontrándose aumentada como consecuencia de la administración de ceruleína, pero sin que se detectaran diferencias entre ambos grupos de ratones con pancreatitis (Figura 3A). También en plasma se estudió la actividad fosfatasa alcalina, y aunque sus niveles no se encontraron alterados a consecuencia de la inducción de pancreatitis, los niveles eran menores en ratones TNAP^{+/-} en ambas condiciones (Figura 3B). Cuando se estudió a continuación la sensibilidad *in vitro* a los inhibidores

específicos levamisol y fenilalanina, se observó que, de nuevo, estos valores eran menores para los ratones TNAP^{+/-}, sin verse afectados nuevamente por la pancreatitis (Figura 3C).

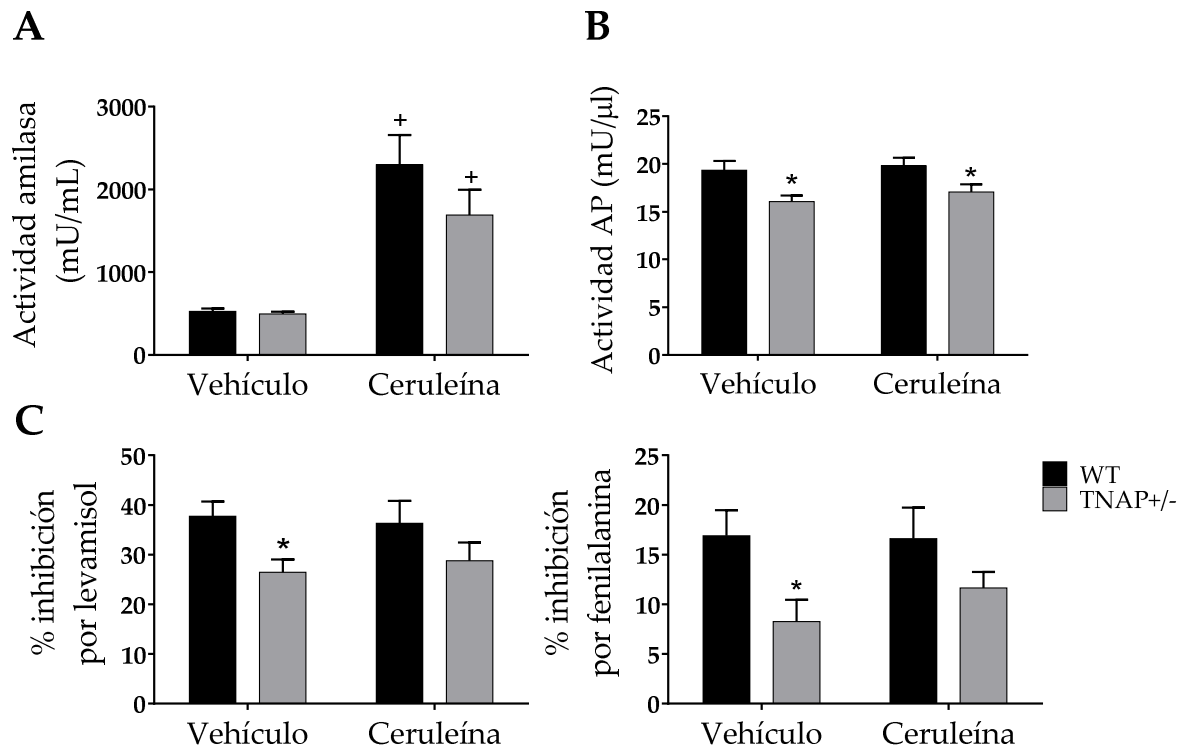


Figura 3. Determinaciones plasmáticas en el modelo de pancreatitis aguda por ceruleína.

Se determinaron las actividades plasmáticas de amilasa (A), y de fosfatasa alcalina (B). Se estudió la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol (1 mM) y fenilalanina (10 mM) *in vitro* (C). (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, ⁺ $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Una de las características descritas de la pancreatitis es la existencia de alteraciones en el hemograma. La inducción de pancreatitis en nuestro modelo se asoció a una reducción comparable entre ambos grupos de los parámetros relacionados con los eritrocitos, como es el caso del hematocrito, concentración de hemoglobina y recuento de los glóbulos rojos (Figura 4A-C). Este análisis también puso de relieve un descenso en el recuento de leucocitos (WBC, *White blood cell*), especialmente de los linfocitos en los ratones WT. Curiosamente, los ratones control de TNAP^{+/-} mostraban un número reducido de linfocitos en sangre y de WBC incluso en condiciones basales, valores que no se vieron afectados por la pancreatitis (Figura 4D).

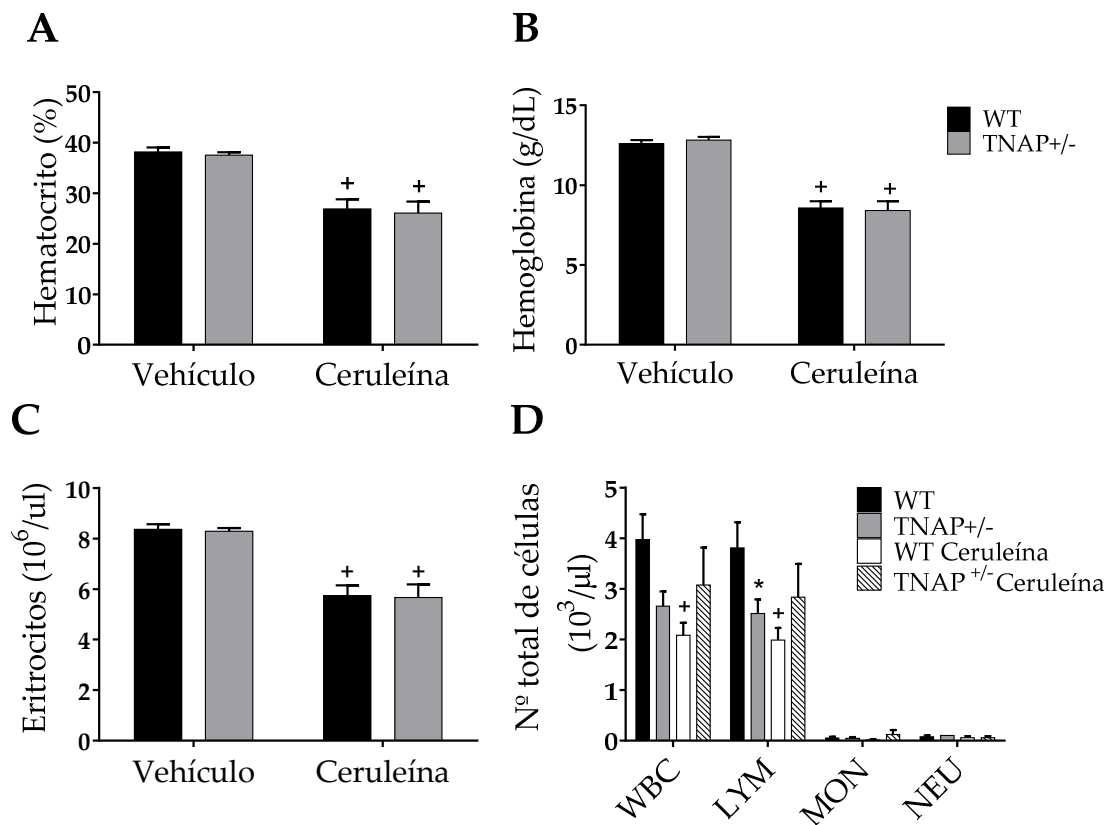


Figura 4. Análisis hematológico de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Estudio del hematocrito (A), concentración de hemoglobina (B), número de eritrocitos (C) y recuento de leucocitos (D) (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Además de las alteraciones en el páncreas, la pancreatitis puede verse acompañada de alteraciones sistémicas. Para determinar si la ausencia de un alelo de *Alpl* tiene influencia en la afectación sistémica de esta patología, analizamos una serie de parámetros en hígado e intestino, dos órganos que se ven comúnmente alterados a consecuencia de la pancreatitis. Así, la administración de ceruleína provocó un incremento leve de la actividad GOT en plasma, que resultó comparable en ambos grupos (Figura 5A). Más marcado fue el incremento en la actividad plasmática de GPT, aumento que fue mayor en el grupo TNAP^{+/-} (Figura 5B). Estos datos sugieren la existencia de un daño leve en el hígado como consecuencia de la pancreatitis. Se analizó la expresión de una serie de genes en hígado, como *Tgfb* (que codifica TGF- β), *Ccl2* (MCP-1) e *Il6* (IL-6). No se encontraron cambios en *Tgfb* o *Ccl2* provocados por la pancreatitis (Figura 5C/D);

sin embargo, los niveles de expresión de *Il6* fueron 3-4 veces mayores que los de los controles WT. A pesar de ello, los niveles absolutos de mRNA son comparables a los que presentan los grupos control y pancreatitis WT, debido a que la expresión de *Il6* en ratones control TNAP^{+/-} está disminuida (Figura 5E).

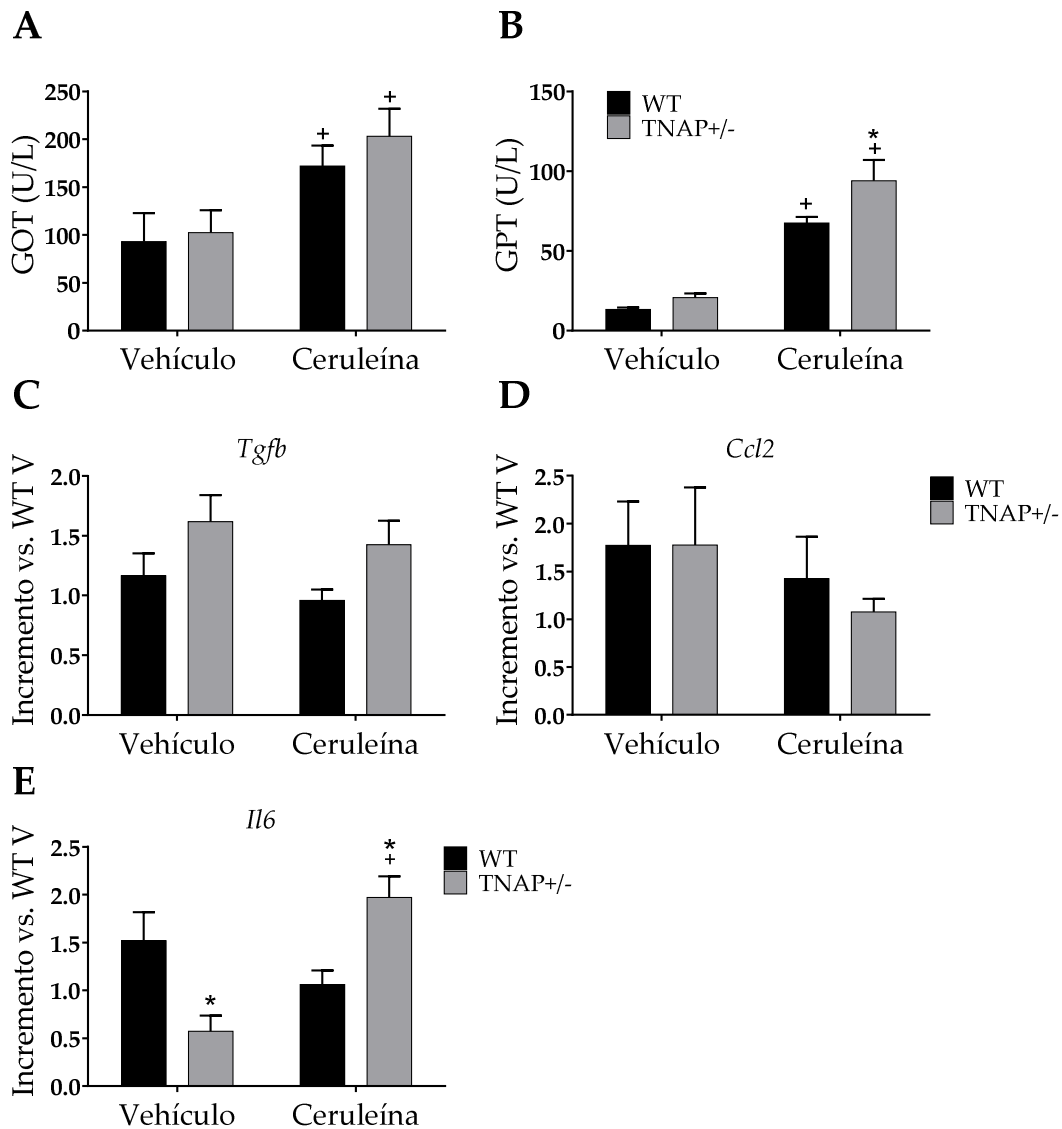


Figura 5. Medida de parámetros relacionados con el daño hepático. Se determinó la actividad plasmática de GOT (A), y GPT (B), y la expresión de los genes *Tgfb* (C), *Ccl2* (D) e *Il6* (E) (n=8). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Además del hígado, es frecuente encontrar alteraciones a nivel de la función barrera intestinal. Por este motivo, se analizó la expresión de diversas proteínas de las uniones estrechas. Concretamente se estudiaron la claudina 5 (*Cldn5*) y la

occludina (*Ocln*). La inducción de pancreatitis se asoció a una menor expresión de estas proteínas, sin efecto alguno de la TNAP (Figura 6A/B).

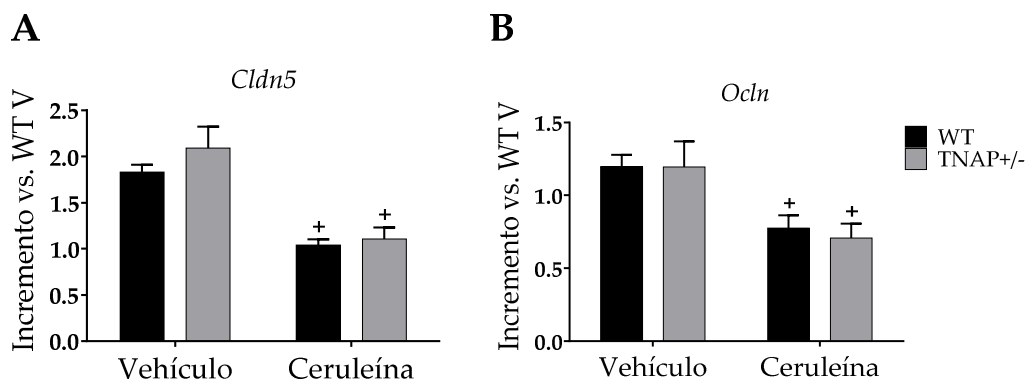


Figura 6. Medida de parámetros relacionados con la función barrera intestinal. Estudio de genes relacionados con la función barrera *Cldn5* (A) y *Ocln* (B). (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A continuación, se realizó un estudio más amplio del páncreas y de los mediadores que controlan la progresión de la pancreatitis. Dado el papel fundamental que desempeñan las citoquinas y quimioquinas producidas por células acinares y células inmunes infiltradas en la pancreatitis aguda, se analizaron algunas moléculas de interés. En el caso de las quimioquinas, se estudiaron CXCL1, CXCL2 y MCP-1, así como también una molécula de adhesión esencial para la migración de los neutrófilos, el ligando de P-selectina (Figura 7). Todos los genes estudiados por RT-qPCR tenían una expresión incrementada tras la administración de ceruleína, con la excepción de *Selplg* (que codifica el ligando de P-selectina), cuyos valores eran completamente normales en el grupo WT. Sin embargo, los valores de expresión de *Cxcl2*, *Ccl2* (que codifica MCP-1) y *Selplg* fueron marcadamente superiores en el grupo TNAP^{+/-} con pancreatitis respecto a WT (Figura 7B-D). A continuación, con el objetivo de comprobar si existía una correlación entre la expresión genética y la producción de proteínas, se determinaron por ELISA los niveles de MCP-1 en el sobrenadante obtenido tras la homogeneización de un fragmento de páncreas. Los niveles de esta citoquina quedaron por debajo del umbral de detección en los ratones control, aumentando en los ratones con pancreatitis, con un incremento mayor en el caso de los ratones TNAP^{+/-} (Figura 7E).

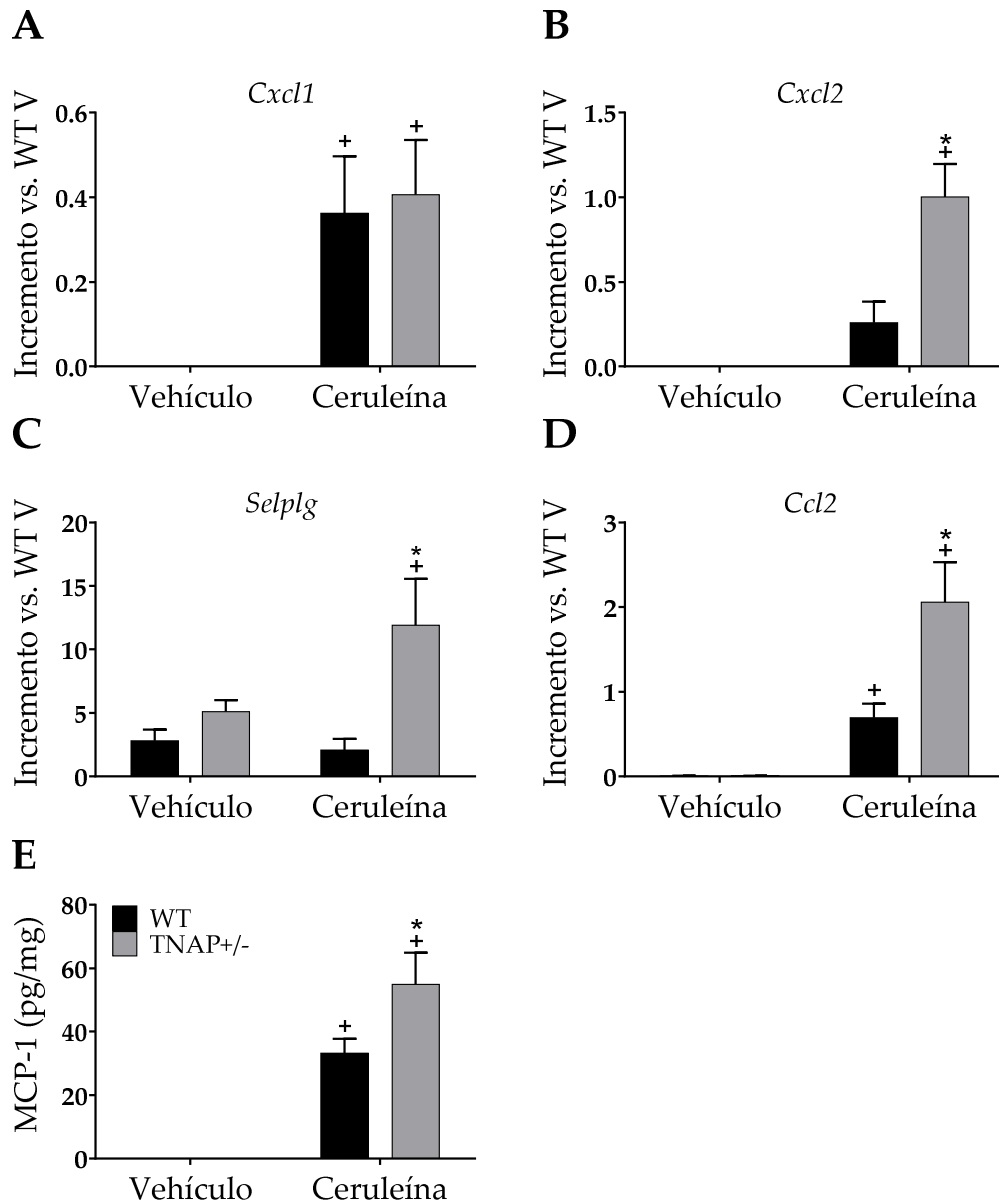


Figura 7. Quimioquinas y moléculas de adhesión analizadas en el páncreas. Se analizaron por RT-qPCR la expresión de *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B), *Selplg* (C) y *Ccl2* (D). Los niveles de MCP-1 se determinaron por ELISA a partir del sobrenadante del homogenado de páncreas (E) (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Como consecuencia de la administración de ceruleína y la infiltración de células inmunes en el páncreas, se van a producir una serie de citoquinas que serán liberadas tanto por las células acinares como por las células infiltradas. Son especialmente significativas IL-6 e IL-1 β . Efectivamente, aunque los niveles de

expresión en los controles eran apenas detectables, ésta se incrementaba notablemente tras la administración de ceruleína. En ambos casos los niveles de mRNA fueron significativamente mayores en ratones TNAP^{+/-} (0A/B). De nuevo se comprobó la correlación entre la expresión y la producción proteica analizando la concentración de proteínas en sobrenadante de homogenado de páncreas. Aunque IL-1 β no se pudo detectar, IL-6 sí mostró un perfil paralelo a la medida de mRNA por RT-qPCR (0C).

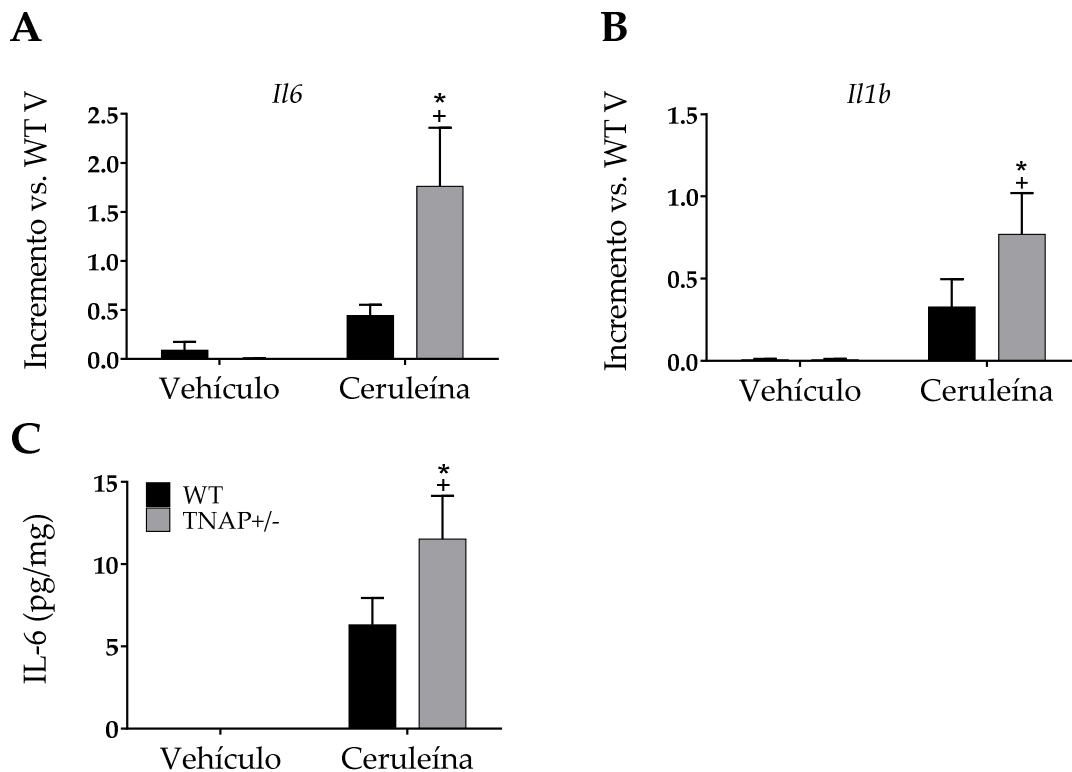


Figura 8. Expresión de citoquinas en el páncreas. Los niveles de expresión de *Il6* (A) y de *Il1b* (B) fueron estudiados por RT-qPCR. Mediante ELISA se estudió el nivel de IL-6 en el sobrenadante de homogenado de páncreas (C) (n=8). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Las distintas medidas realizadas hasta el momento planteaban dos posibles hipótesis que pudieran justificar la mayor severidad de la pancreatitis en ratones TNAP^{+/-}; bien que fuera debido a una mayor respuesta por parte de las células inmunes, o bien que se debiera a una mayor susceptibilidad de las células acinares al daño. Para determinar el papel de las células acinares en la respuesta

inflamatoria, se determinó la expresión de determinados genes a partir de células acinares aisladas de ratones con pancreatitis. Como muestra la Figura 9, la expresión de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*, *Selplg* o *Bax* en condiciones basales es prácticamente nula, pero aumenta ostensiblemente como consecuencia de la inflamación. Es de interés destacar que en los grupos con pancreatitis, las células procedentes de ratones TNAP^{+/-} presentaban una expresión dos veces superior de *Cxcl2* y *Selplg*, y algo menor, pero aun así significativa, de *Il6* (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B, D y E). En el resto de genes no se observaron diferencias entre los grupos (Figura 9A, C y H). Es interesante constatar que los niveles de mRNA de *Alpl* (TNAP) estaban también incrementados por la pancreatitis, lo que indicaría que TNAP está involucrada directamente en la respuesta inflamatoria. En concordancia con la falta de uno de los alelos de *Alpl*, la expresión de TNAP era menor en los acinos aislados de ratones TNAP^{+/-}, aunque esta diferencia era solamente significativa en entre los grupos con pancreatitis (la comparación por parejas en los grupos control mediante el test de Student presenta una p=0,07) (Figura 9F). De manera similar, la expresión de *Amy2a1* también era menor en controles TNAP^{+/-} (~50%) respecto a los controles WT. Sin embargo, en este caso, la pancreatitis motivó un descenso en la expresión, aunque únicamente en WT, pues los valores de TNAP^{+/-} permanecieron inalterados (Figura 9G).

A la vista de los resultados anteriores, tratamos de determinar si la haplodeficiencia de TNAP hace a las células acinares más susceptibles al estímulo patogénico. Para ello, las células acinares se aislaron a partir de tejido pancreático y, a continuación, fueron incubadas con ceruleína a una concentración final de 5 µM durante 3 horas. El tratamiento *in vitro* dio lugar a un incremento leve de *Cxcl1*, sin cambios en *Cxcl2*, *Ccl2* o *Il6* en acinos de células WT. Por su parte, los acinos procedentes de ratones TNAP^{+/-} exhibieron un aumento significativo de *Cxcl1*, *Cxcl2* e *Il6* en respuesta al tratamiento. *Cxcl1* estaba incrementado incluso en condiciones basales. Algo similar ocurre con *Ccl2*, aunque en este caso el tratamiento con ceruleína originó un descenso en la expresión (Figura 10A-D). En este experimento, la expresión de TNAP no experimentó cambios tras la exposición a la ceruleína (Figura 10E). Tampoco *Amy2a1* o *Bax* sufrieron cambios debido al tratamiento en acinos WT (Figura 10F/G). Sin embargo, en acinos TNAP^{+/-} sí se produjo una reducción de los niveles de mRNA de *Amy2a1*, que en condiciones basales estaba incrementado. La falta de un alelo de *Alpl* también parece afectar a la expresión basal de *Bax*, que se encontraba incrementada, no

experimentando una modificación de sus niveles en respuesta a la ceruleína. *Selplg* no fue detectada en ningún caso.

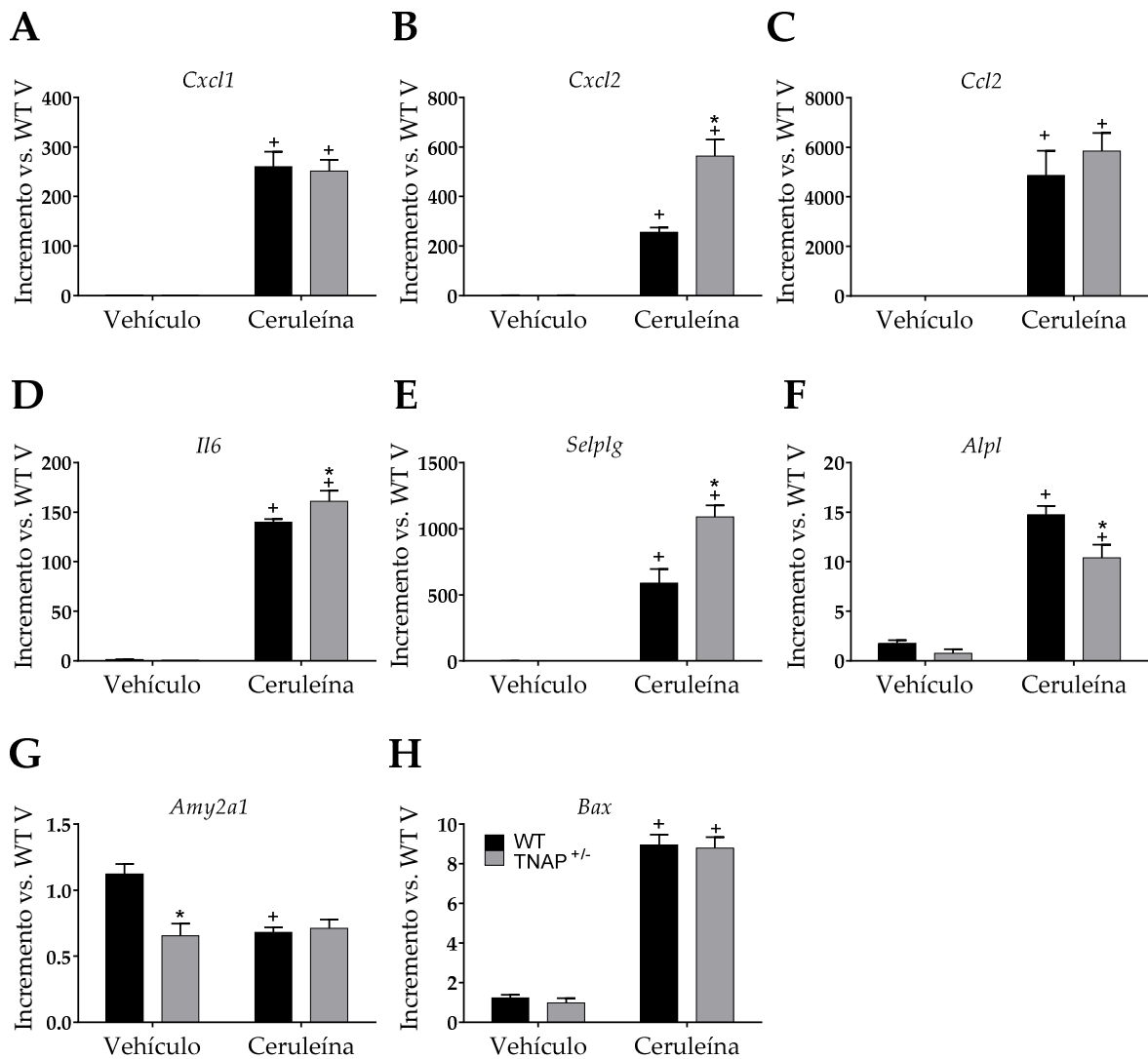


Figura 9. Expresión de marcadores de inflamación en acinos procedentes de ratones con pancreatitis aguda. Estudio de los marcadores *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B), *Ccl2*(C), *Il6* (D), *Selplg* (E), *Alpl* (F), *Amy2a1* (G) y *Bax* (H) (n=6). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

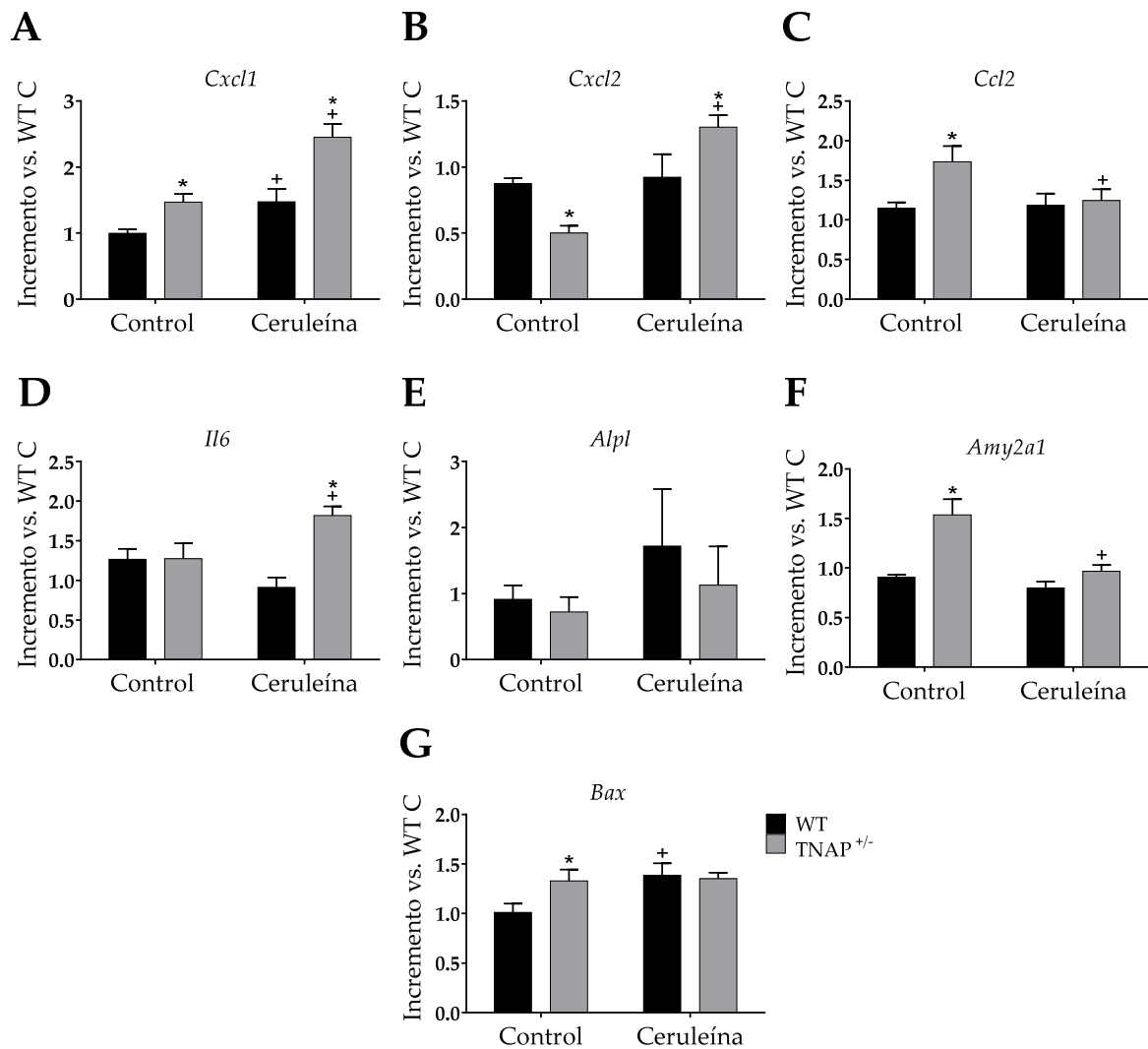


Figura 10. Estimulación *in vitro* de células acinares con ceruleína. Las células acinares procedentes de ratones WT y TNAP^{+/-} se aislaron tras un proceso de digestión con colagenasa. Tras 3 horas de incubación con ceruleína (5 μM) se determinaron los niveles de mRNA de *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B), *Ccl2* (C), *Il6* (D), *Alpl* (E), *Amy2a1* (F) y *Bax* (G) (n=5). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * p<0,05 frente a WT, + p<0,05 frente a control.

Finalmente, para comprobar que las diferencias observadas en respuesta a ceruleína eran debidas a la falta de un alelo de TNAP, el experimento anterior se repitió empleando células acinares procedentes de ratones WT, los cuales fueron incubados con levamisol, un inhibidor de fosfatasa alcalina. Previamente al estímulo con ceruleína, las células se incubaron con levamisol durante dos horas. Como muestra la Figura 11, el fenotipo de las células TNAP^{+/-} acinares en respuesta a la ceruleína se reproduce parcialmente. De manera similar a lo descrito

en la figura anterior, se deduce que la inhibición *in vitro* de TNAP fue responsable de la expresión incrementada de *Cxcl1* y *Cxcl2* tras la estimulación con ceruleína (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A/B). Sin embargo, la expresión de *Il6* no se encontraba aumentada, sino que por el contrario estaba reducida de manera significativa (Figura 11D). No se observaron diferencias en el resto de genes analizados (Figura 11C, E-G).

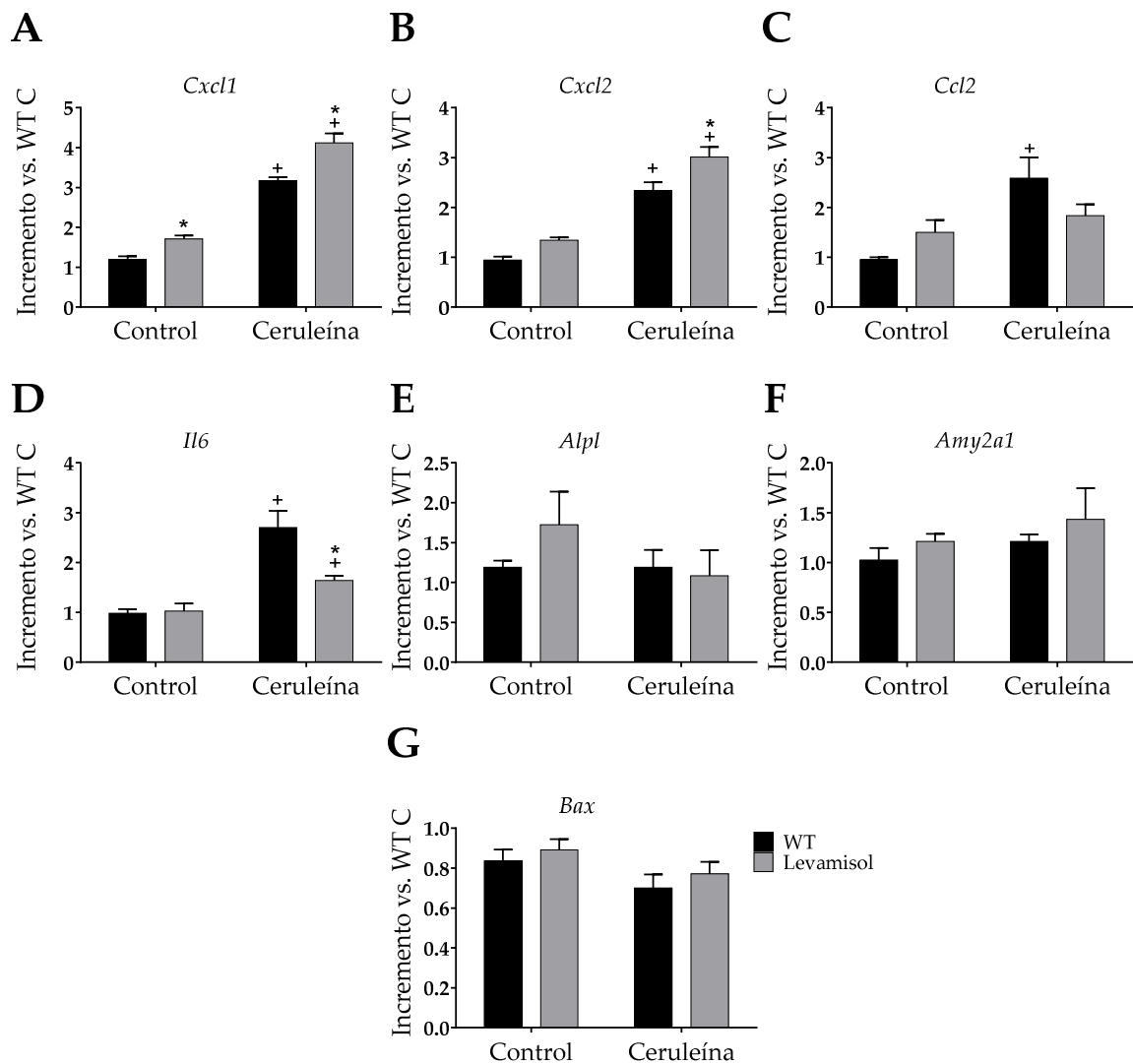


Figura 11. Efecto de la administración de levamisol sobre la expresión génica. Las células acinares procedentes de ratones WT se aislaron tras un proceso de digestión con colagenasa. Tras incubar 2 horas con levamisol, las células fueron estimuladas con ceruleína (5 μ M) durante 3 horas. Pasado este tiempo, se determinaron los niveles de mRNA de *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B), *Ccl2* (C), *Il6* (D), *Alpl* (E), *Amy2a1* (F) y *Bax* (G) (n=5). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * p<0,05 frente a WT, + p<0,05 frente a control.

Dada la importancia que el reclutamiento de neutrófilos desempeña en el inicio, progresión y resolución de la inflamación asociada a la pancreatitis, se contrastó la segunda hipótesis anteriormente planteada, es decir, que los ratones TNAP^{+/-} tuvieran un mayor grado de infiltración neutrofílica. Con este objetivo, se analizaron las células MRP8⁺ mediante inmunohistoquímica a partir de cortes de páncreas. En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, el número de células positivas fue mayor en ratones TNAP^{+/-} tras la inducción de pancreatitis (Figura 12A/B). La distribución de estas células resultó ser además más homogénea que la exhibida por los ratones WT.

El siguiente paso fue estudiar si los neutrófilos procedentes de ratones TNAP^{+/-} presentaban una respuesta a la estimulación diferente a los provenientes de ratones WT. Con este fin, se aislaron neutrófilos de la médula ósea, los cuales fueron estimulados *in vitro* con LPS, procediéndose a medir TNF- α e IL-6 en el sobrenadante. Los niveles de ambas citoquinas se encontraban más elevados en neutrófilos de ratones TNAP^{+/-}, siendo el efecto especialmente marcado para el caso de la IL-6 (95%, Figura 12C/D).

Finalmente, para confirmar la contribución de los neutrófilos a la severidad de la pancreatitis aguda, se llevó a cabo una depleción de los neutrófilos mediante la administración intraperitoneal de anticuerpos anti-Ly6G antes de la estimulación con ceruleína. Se analizó la expresión de citoquinas, quimioquinas y otros genes anteriormente estudiados. De nuevo, los ratones TNAP^{+/-} manifestaron una pancreatitis más severa, caracterizada por una expresión incrementada de *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*, *Il1b*, *Selplg* and *Bax* (Figura 13A-F, I). No se detectaron cambios en *Amy2a1* en ninguna de las condiciones ensayadas, como tampoco en *Alpl* (Figura 13G/H), si bien es cierto que esta se encontraba disminuida en ratones TNAP^{+/-} del grupo control (pancreatitis), aunque sin llegar a la significancia estadística. La depleción de los neutrófilos tuvo como resultado una drástica reducción en la expresión de los genes anteriormente citados, lo que sugiere una respuesta inflamatoria más leve. Pero resulta especialmente relevante el hecho de que no existan diferencias entre los grupos WT y TNAP^{+/-}.

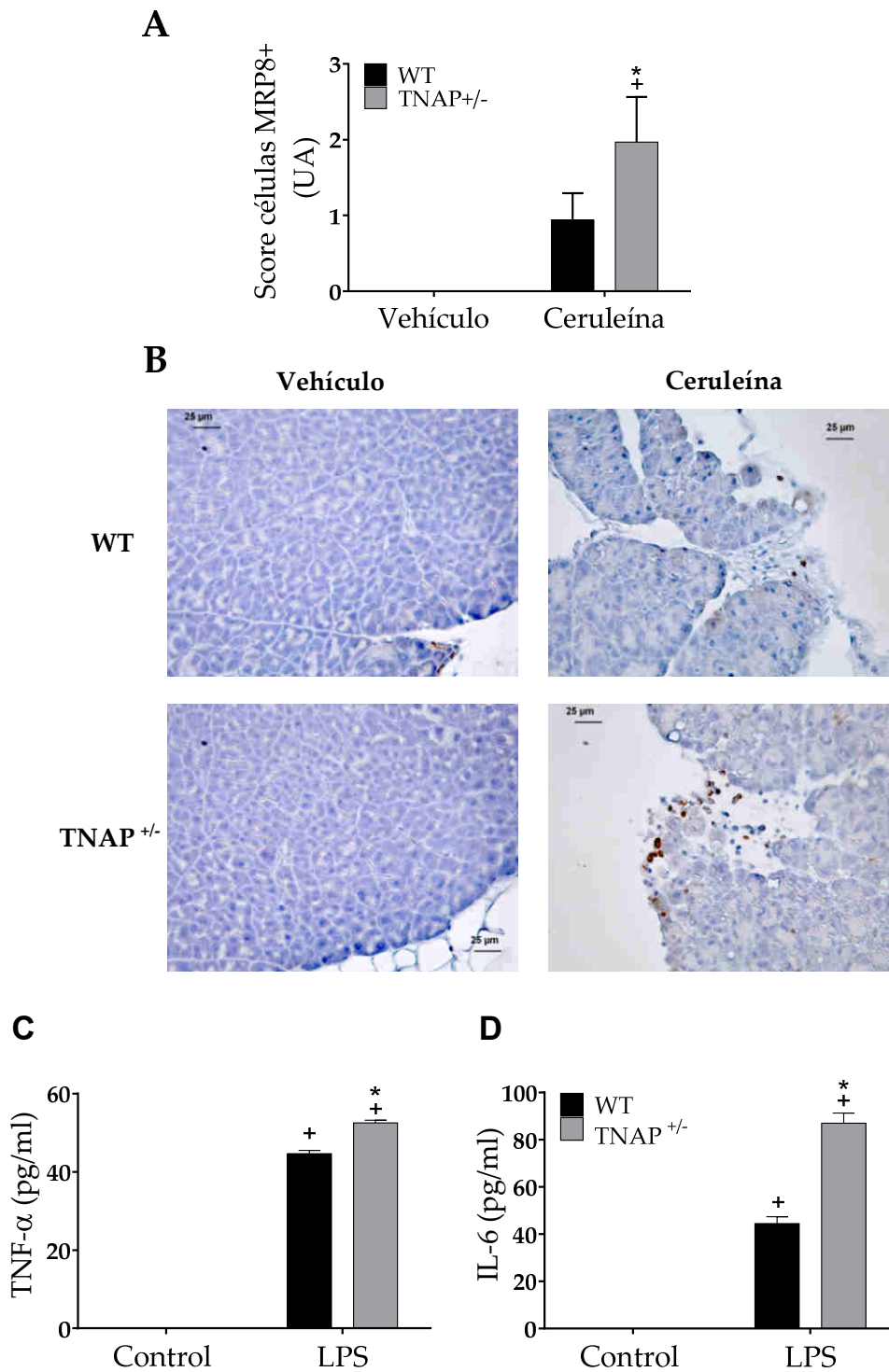


Figura 12. Infiltración de neutrófilos en el páncreas y estudio de la respuesta de los neutrófilos *in vitro*. A) Inmunohistoquímica de las células MRP8⁺ y score correspondiente (B), expresado en unidades arbitrarias (UA). (n=8). Tras el aislamiento y estimulación de los neutrófilos con LPS (1 μ g/kg) durante 24 horas, se determinaron los niveles de TNF- α (A) e IL-6 (B) por ELISA. (n=6). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo o control.

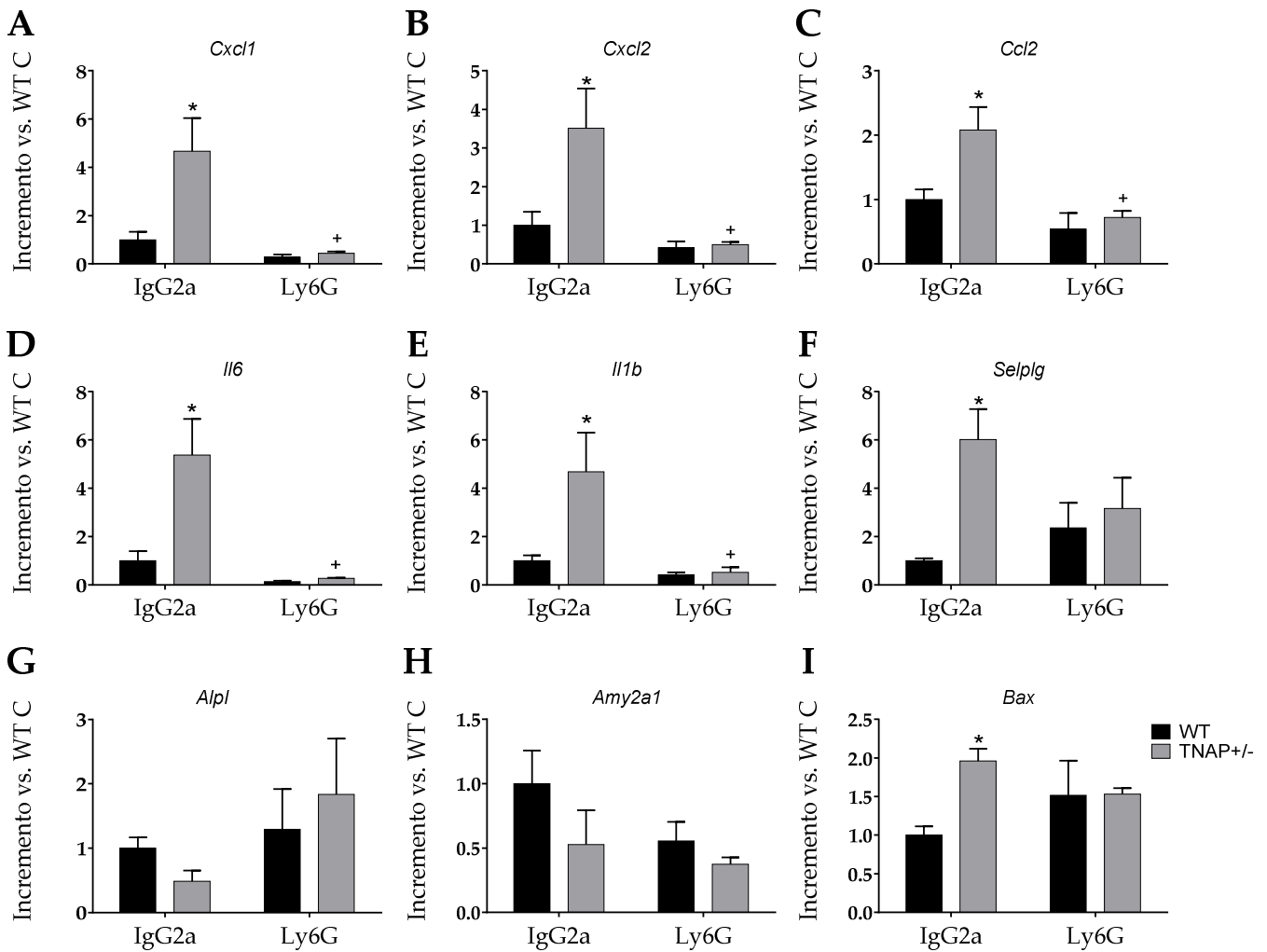


Figura 13. Efecto de la depleción de los neutrófilos sobre el desarrollo de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. 24 horas antes de la inducción de la pancreatitis, se administró el control de isotipo IgG_{2a} o anti-ly6G por vía intraperitoneal. Finalizado el experimento de inducción de pancreatitis, se determinaron los niveles de mRNA en páncreas de *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B), *Ccl2* (C), *Il6* (D), *Il1b* (E), *Selp1g* (F), *Alpl* (G), *Amy2a1* (H) y *Bax* (I). (n=4). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significancia estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * p<0,05 frente a WT, + p<0,05 frente a control (IgG_{2a})

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA EN UN MODELO DE SEPSIS/ENDOTOXEMIA

Para proseguir con la caracterización de los macrófagos, recurrimos a la utilización de un modelo de activación de macrófagos *in vivo* mediante la administración de LPS por vía intraperitoneal. Se trata de un modelo de sepsis mediado por la vía de TLR4 [381, 410], por consiguiente, aunque no van a ser las únicas células implicadas, los monocitos/macrófagos desempeñan un papel muy relevante en su progresión. Se emplearon ratones heterocigotos de TNAP, por las mismas razones anteriormente expuestas. En este modelo se administra una dosis única de LPS de 1 mg/kg por vía intraperitoneal y se procede al sacrificio de los animales unas horas después. En nuestro caso, el sacrificio se llevó a cabo 6 horas después de la administración.

La administración de LPS *in vivo* provoca toda una serie de efectos sistémicos. Una de las características más ampliamente descritas es la apoptosis, que afecta en su mayor parte a los linfocitos [411]. De acuerdo con esto, los ratones de ambos grupos WT y TNAP^{+/-} mostraron una notable reducción en el número de células en sangre, motivada esencialmente por la disminución del número de linfocitos (Figura 14A). En cuanto a la composición porcentual, se comprueba un descenso de linfocitos, un ligero incremento de macrófagos y un aumento significativo en ambos grupos con sepsis del porcentaje de neutrófilos (Figura 14B).

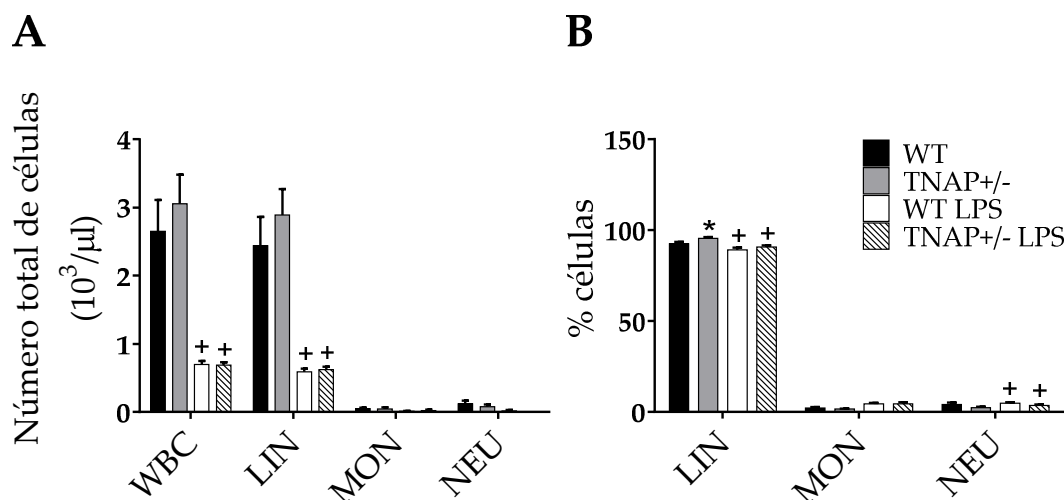


Figura 14. Estudio hematológico de ratones WT y TNAP^{+/-} del experimento de sepsis inducida por LPS. (A) Recuento de leucocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos (10³/μl). (B) Composición porcentual de las poblaciones celulares en sangre (n=10-12). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Continuando con la caracterización del modelo, es bien conocido que uno de los efectos de la respuesta al LPS es una reducción de la temperatura corporal [412]. La hipotermia pudo ser detectada en ambos grupos de ratones afectados de sepsis (Figura 15A). La inducción de sepsis va acompañada también de hipoglucemia, debido a que citoquinas como TNF- α pueden actuar inhibiendo la transcripción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa (*Pck2*), implicada en la gluconeogénesis [394]. En consonancia con este mecanismo, los niveles de glucosa plasmáticas de ratones a los que se administró LPS estaban notablemente reducidos respecto a los controles, aunque no se detectaron diferencias entre ambos grupos (Figura 15B). El hígado desempeña un papel importante en la detoxificación del LPS y es uno de los principales órganos afectados por la administración de LPS *in vivo* [413]. Como marcador del daño hepático se midió la actividad GOT en plasma, observándose un ligero incremento, que solo fue significativo en el caso de los ratones WT (Figura 15C).

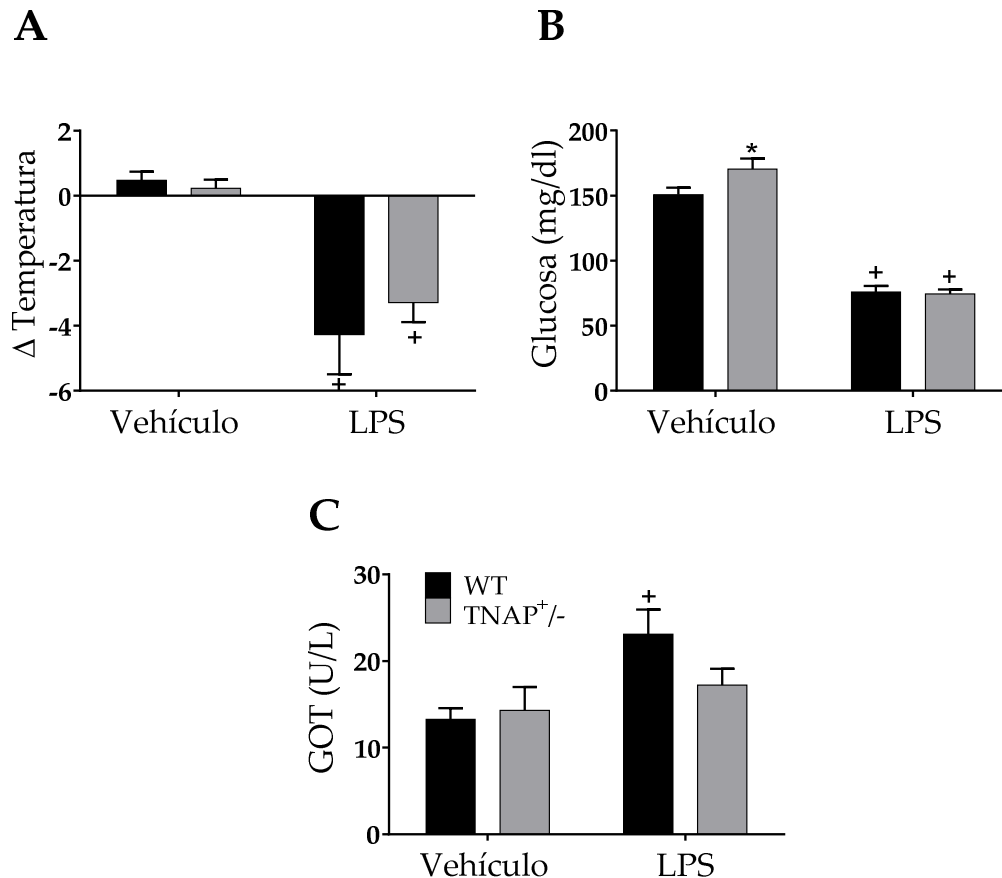


Figura 15. Determinación de parámetros clínicos y plasmáticos relacionados con la sepsis.

Se estudió la variación en la temperatura corporal entre el tiempo inicial y final (A), los niveles de glucosa plasmáticos (B) y la actividad GOT en plasma (C) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A continuación se caracterizó en mayor detalle el efecto de la administración de LPS sobre el hígado. Se estudiaron una serie de genes relacionados con la vía de señalización del LPS, concretamente, *Tlr4*, *Cd14* y *Lbp* (Figura 16). A diferencia de *Tlr4*, en el que no se detectaron diferencias, la inducción de este modelo de sepsis motivó un marcado incremento tanto de *Cd14* como de *Lbp* (Figura 16A-C). En este último caso, el incremento de la expresión fue significativamente mayor en casos de ratones TNAP^{+/-} respecto a los WT. También se determinó la expresión de *Alpl*, de la que se ha descrito un papel relevante en respuesta al LPS en hígado [111]. Como podía esperarse dadas las características de los ratones empleados, la expresión de *Alpl* fue menor en ratones TNAP^{+/-} respecto a los WT, aunque sin llegar a ser significativo. La inducción de sepsis motivó una expresión aumentada

de este gen en ratones WT, mientras que los TNAP^{+/-} mostraron una expresión menor y no afectada por el LPS (Figura 16D).

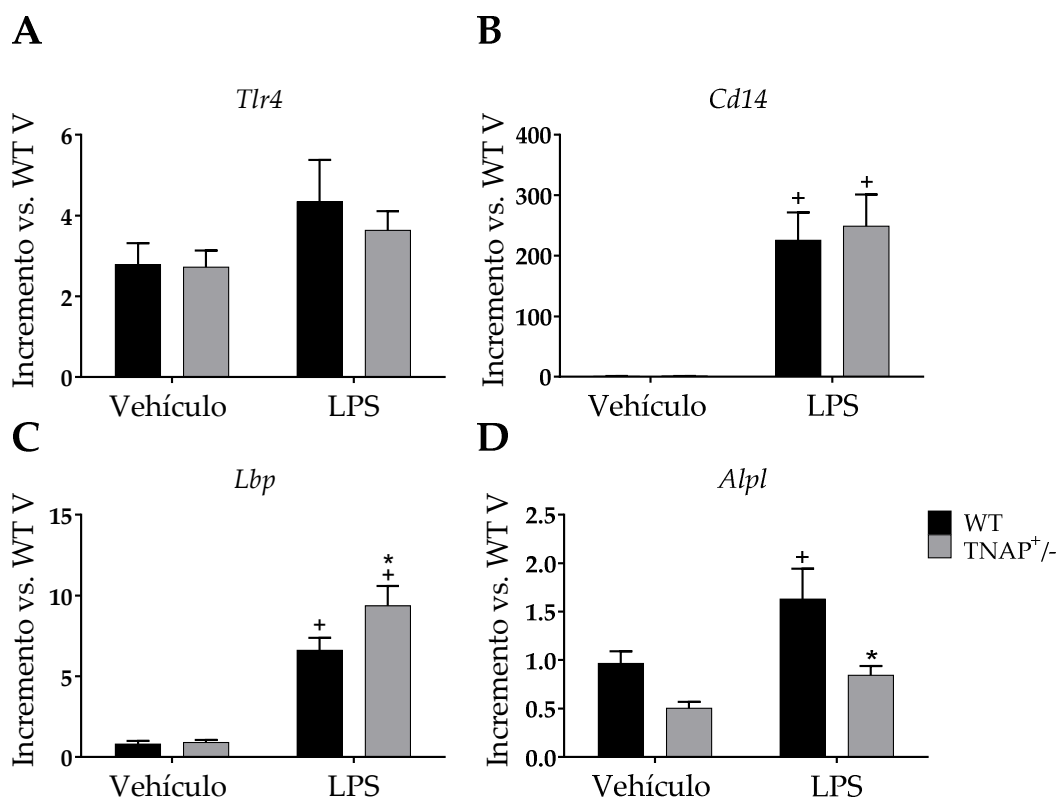


Figura 16. Análisis de genes en el hígado en el modelo de sepsis por LPS. Se estudió la expresión de *Tlr4* (A), *Cd14* (B), *Lbp* (C) y *Alpl* (D) por RT-qPCR (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

La exposición al LPS administrado a nivel intraperitoneal conduce, a nivel hepático, al incremento de una serie de citoquinas y quimioquinas. Con la excepción de *Tgfb* y *Tnf* (Figura 17B/C), el resto de moléculas analizadas mostraron un incremento en su expresión tras la inducción de sepsis. Tres de estos genes mostraron diferencias entre los grupos WT y TNAP^{+/-}, concretamente *Il6*, cuya expresión fue significativamente mayor; e *Il10* y *Cxcl10*, que, al contrario, exhibían una expresión marcadamente menor (Figura 17A, E/F).

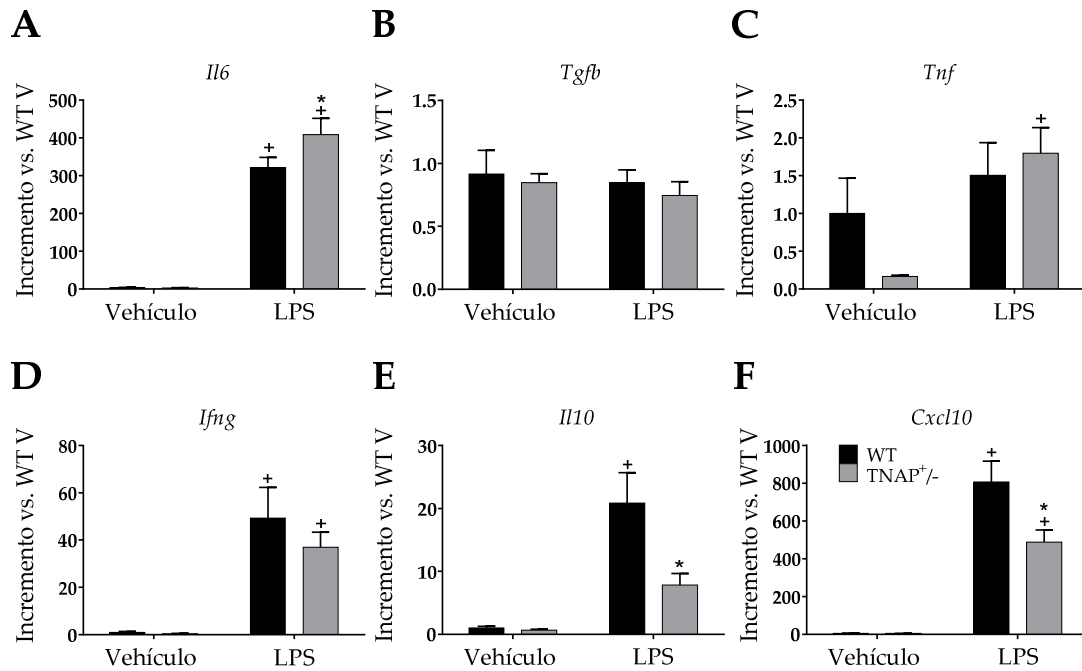


Figura 17. Determinación de citoquinas en hígado. Se analizó por RT-qPCR la expresión de *Il6* (A), *Tgfb* (B), *Tnf* (C), *Ifng* (D), *Il10* (E) y *Cxcl10* (F) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, † $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A nivel intestinal, procedimos a caracterizar la respuesta de las distintas isoformas de AP a la administración *in vivo* de LPS. Tras medir la expresión de *Alpi*, *Akp3* y *Alpl* se comprobó que el LPS motivaba una drástica reducción en la expresión de las tres enzimas (Figura 18). Curiosamente, a nivel basal, la expresión de *Akp3* y *Alpi* ya era marcadamente menor en ratones TNAP^{+/-}, no observándose cambios tras la inducción de sepsis (Figura 18B/C).

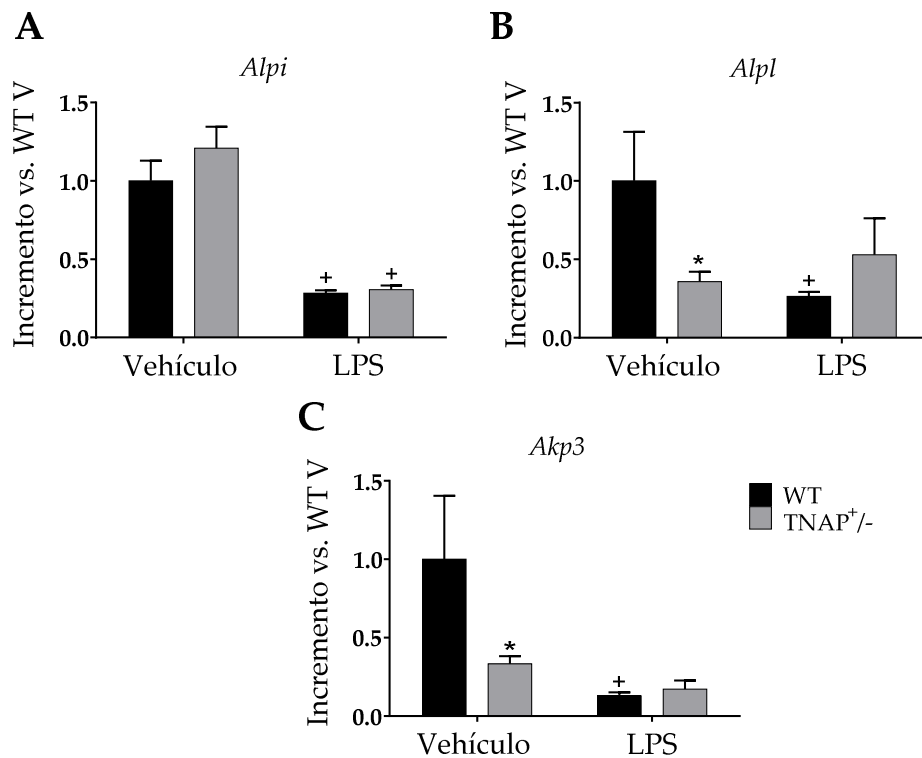


Figura 18. Expresión de las isoformas de AP en yeyuno. Estudio de la expresión de *Alpi* (A), *Akp3* (B) y *Alpl* (D) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Con el fin de determinar si esta inhibición era una respuesta directa al LPS o bien secundaria a la acción de citoquinas producidas, se utilizaron organoides aislados a partir de ratones WT y TNAP^{+/-}, los cuales fueron estimulados *in vitro* con LPS. En los tres casos, no se detectaron diferencias entre organoides en estado basal y estimulados *in vitro* en el grupo WT, lo cual sugiere que el efecto descrito podría estar provocado por la acción de las citoquinas (Figura 19). De hecho, Malo y col. describieron que *Alpi* se inhibe en respuesta a IL-1 β y TNF- α , lo que coincidiría con estos resultados y con experimentos propios [90]. Sin embargo, en organoides TNAP^{+/-}, el estímulo con LPS sí produce una inducción en *Akp3* (Figura 19C). Para confirmar estos resultados, se realizó un experimento en el que organoides aislados de ratones WT fueron estimulados con diversas citoquinas, concretamente TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Como se puede observar en la Figura 20, la estimulación con TNF- α e IFN- γ motivó un descenso significativo en la expresión de *Alpi* y *Akp3* mientras que, por su parte, *Alpl* no parece verse afectada por las citoquinas. IL-1 β no tuvo efecto en ningún caso.

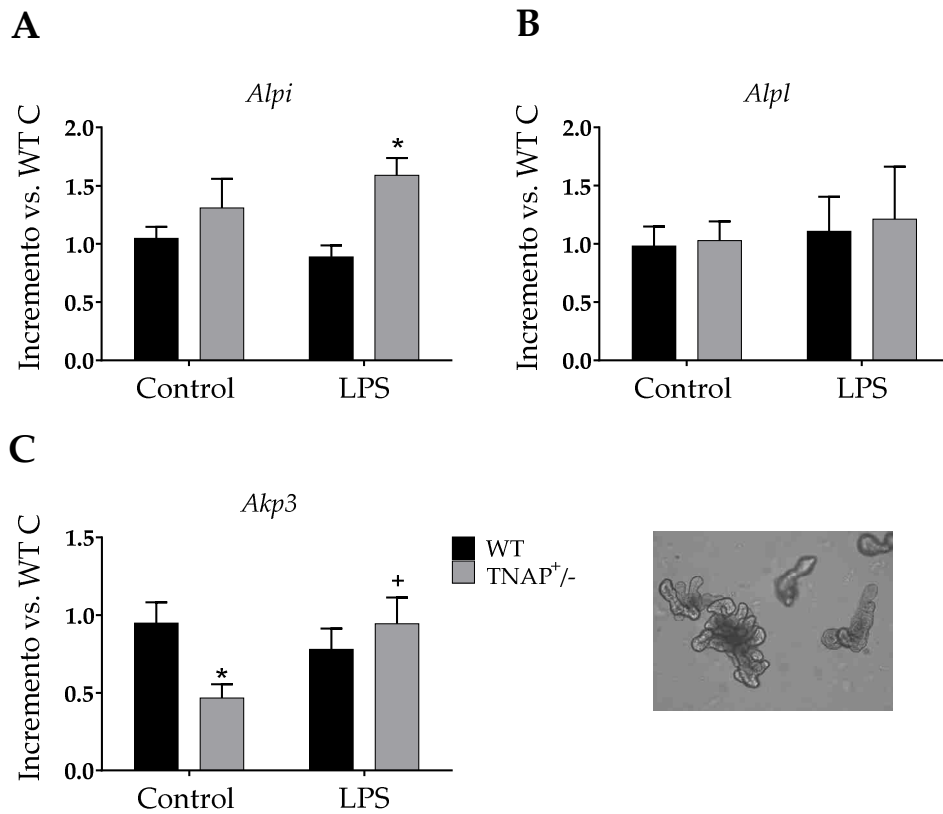


Figura 19. Determinación de la expresión de las isoformas de AP en organoides estimulados *in vitro* con LPS. Se analizaron los niveles de mRNA de *Alpi* (A), *Alpl* (B) y *Akp3* (C) (n=10-12). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

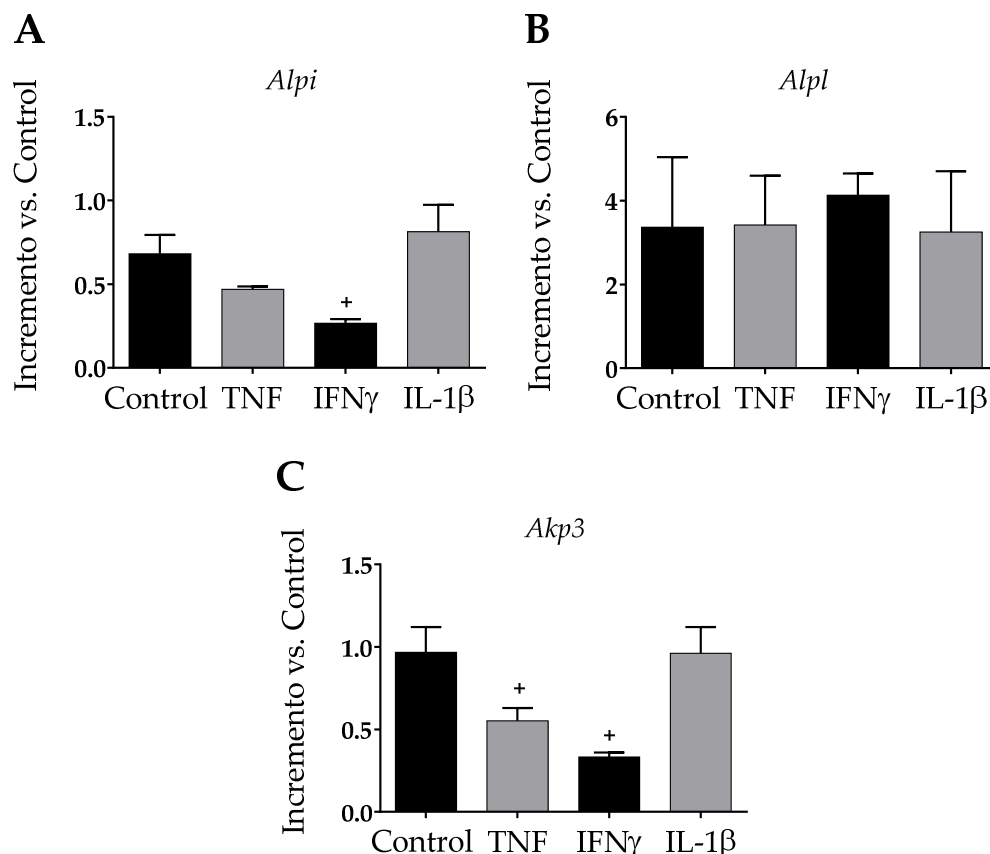


Figura 20. Efecto de las citoquinas sobre la expresión de las distintas isoformas de AP en organoides de yeyuno. Se analizaron los niveles de mRNA de *Alpi* (A), *Alpl* (B) y *Akp3* (C) (n=5). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a control.

El desarrollo de sepsis se asocia también a alteraciones en la función barrera. En concordancia con estudios publicados anteriormente [414], la administración de LPS se vio acompañada de una expresión reducida de la proteína de unión estrecha *Ocln*, aunque no se vieron cambios en *Tjp1* (Figura 21A/B). Al igual que en hígado, se determinó la expresión de genes involucrados en la señalización del LPS. En este caso, los tres genes estudiados (*Tlr4*, *Cd14* y *Lbp*) vieron su expresión incrementada significativamente tras la inducción de sepsis (Figura 22A-C). Solamente en el caso de *Cd14*, ese incremento fue superior en ratones TNAP^{+/-} al experimentado por los ratones WT (Figura 22B).

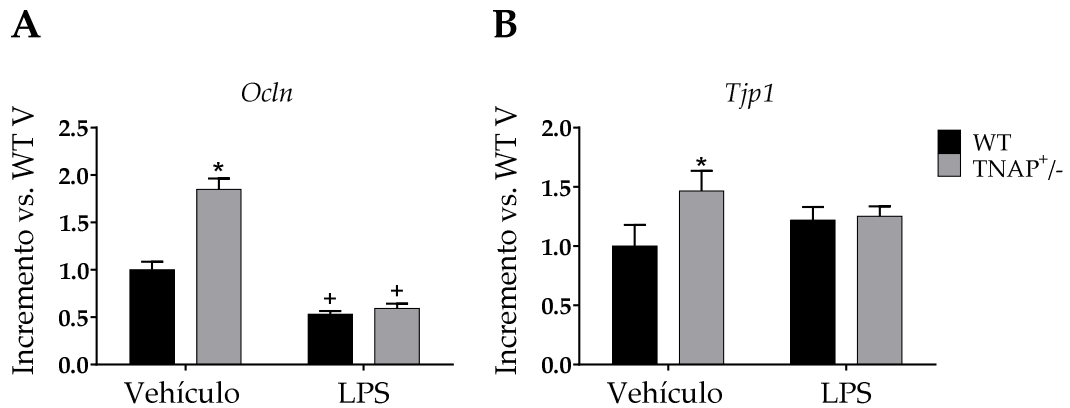


Figura 21. Expresión de proteínas de unión estrecha en el yeyuno de ratones WT y TNAP^{+/-}. La expresión de *Ocln* (A) y *Tjp1* (B), fue determinada por RT-qPCR (n=10-12). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

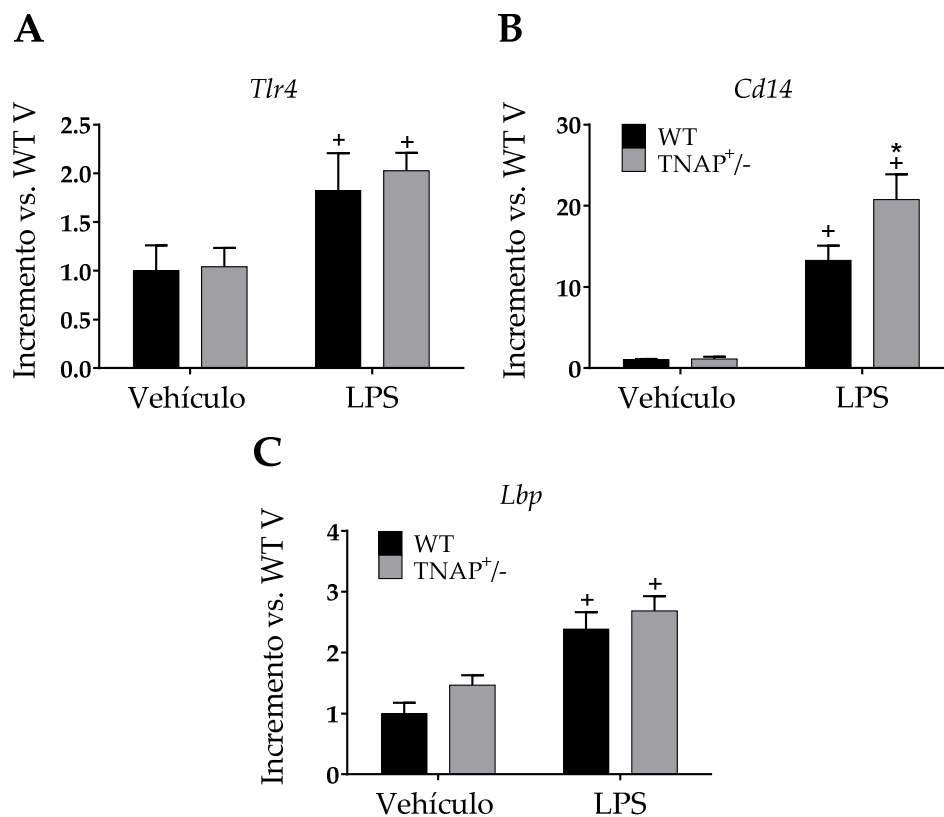


Figura 22. Genes implicados en la señalización del LPS. Los genes *Tlr4* (A), *Cd14* (B) y *Lbp* (C) se estudiaron en yeyuno de ratones WT y TNAP^{+/-} (n=10-12). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina se realizó en los mismos tejidos donde se analizaron los niveles de mRNA, además del plasma. Los cambios en los niveles de expresión de *Alpl* en hígado (incremento, Figura 16) y de

Alpl y *Alpi* a nivel intestinal (descenso, Figura 18), no se acompañaron de los cambios esperados en el nivel de actividad en plasma. En ambos tejidos, e independientemente de si eran controles o ratones con sepsis, la actividad de AP en ratones TNAP^{+/-} fue menor respecto a los WT, no sufriendo modificaciones tras la administración de LPS (Figura 23B/C). Por el contrario, la inducción de sepsis sí se acompañó de una ligera, aunque significativa, reducción de la actividad AP plasmática en ratones WT. De nuevo, la actividad en condiciones basales de ratones TNAP^{+/-} fue menor que los controles, y no presentaba modificaciones por efecto del LPS (Figura 23A).

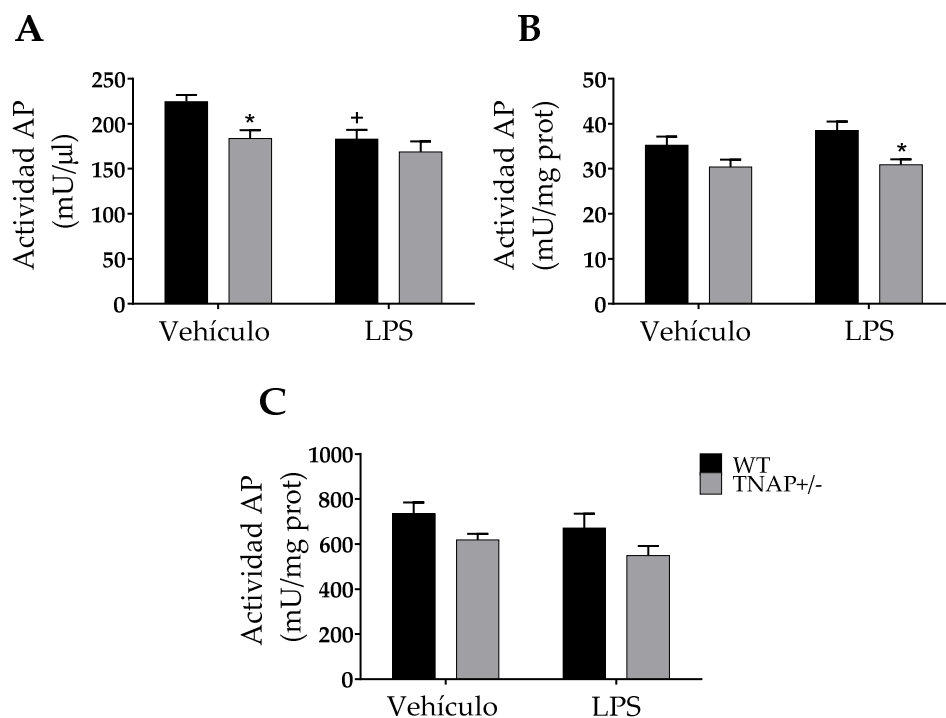


Figura 23. Estudio de la actividad AP. Se muestran los valores de actividad AP en plasma (A), hígado (B) y yeyuno (C) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Por otra parte, la sensibilidad al levamisol mostró que los ratones TNAP^{+/-} presentaban en condiciones basales una mayor resistencia a la inhibición tanto a nivel plasmático, como en hígado y yeyuno (Figura 24), lo que concuerda con resultados publicados previamente por nuestro grupo de investigación y sugiere la existencia de diferencias a nivel de las isoformas presentes [32]. Con la excepción del yeyuno, ese perfil se mantuvo tras la inducción de sepsis. La administración de

LPS tuvo, de nuevo, solamente efectos sobre el plasma. En ratones WT y TNAP^{+/-} se observa que la actividad AP es inhibida en menor proporción en ratones con sepsis (Figura 24A).

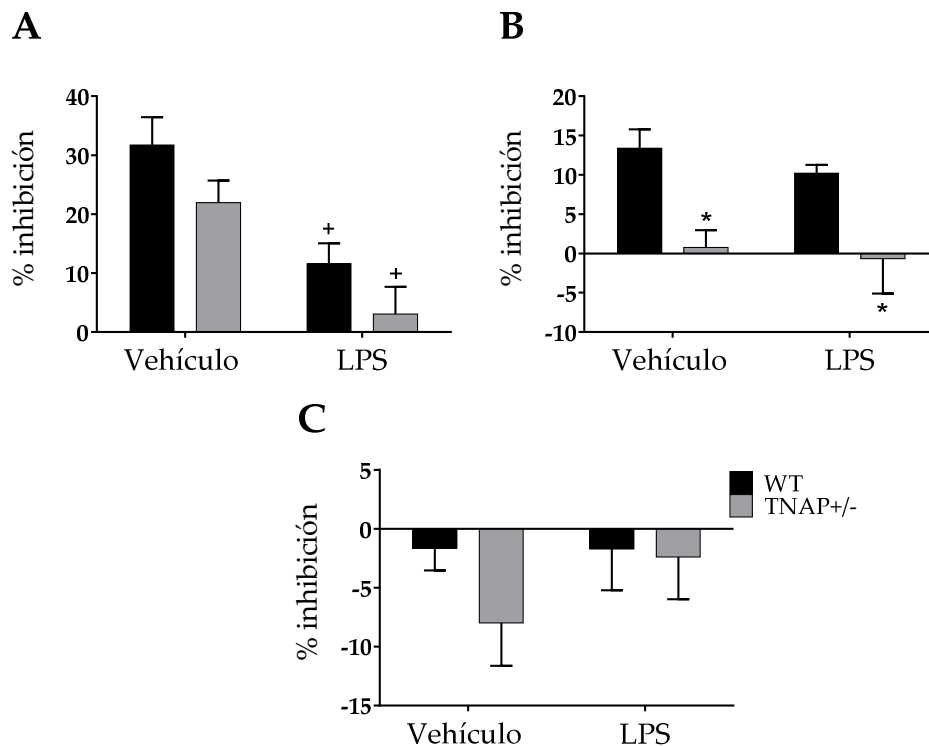


Figura 24. Perfil de inhibición de la actividad AP en respuesta al levamisol. Se muestran los resultados expresados como % de inhibición sobre la actividad basal de plasma (A), hígado (B) y yeyuno (C) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

La existencia de una respuesta inflamatoria sistémica fue puesta de manifiesto a través del estudio de los niveles de diversas citoquinas en plasma. La administración de LPS motivó la detección de altas concentraciones de las citoquinas IL-6, TNF- α e IFN- γ . En condiciones basales, estas citoquinas prácticamente son indetectables, pero tras la inducción de sepsis, sus niveles aumentan drásticamente. Entre ambos grupos tratados no se detectaron diferencias en IL-6 (Figura 25), y tan solo una ligera tendencia a estar incrementado en ratones TNAP^{+/-} en el caso de IFN- γ (Figura 25C). Por el contrario, este aumento sí fue significativo en el caso de la tercera citoquina ensayada, TNF- α (Figura 25B).

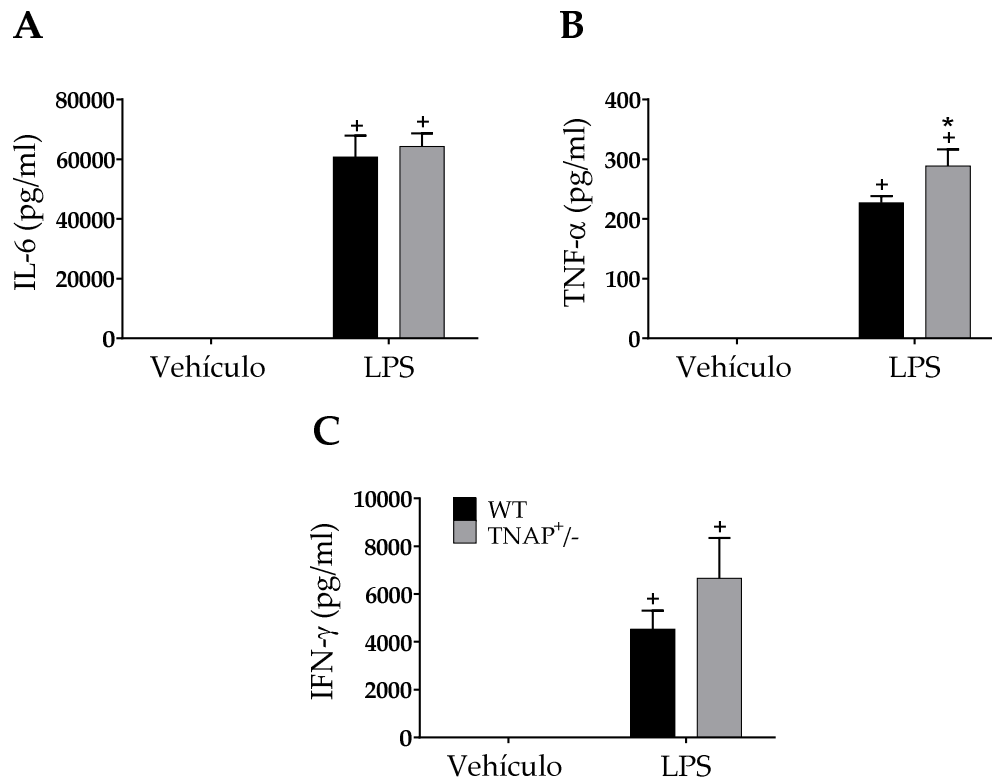


Figura 25. Estudio de citoquinas en plasma. Los niveles de IL-6 (A), TNF- α (B) e IFN- γ (C) fueron determinados por ELISA (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A continuación, procedimos a caracterizar la respuesta de los macrófagos procedentes del bazo y de la cavidad peritoneal a la inflamación sistémica. A partir de los esplenocitos del bazo, se estudiaron las poblaciones CD45+CD11b+. A su vez, dentro de esta se analizaron las poblaciones representativas de M1 y M2: CD45+CD11b+CD11c+ y CD45+CD11b+CD301+, respectivamente. Los resultados aparecen recogidos en la Figura 26. Los resultados indican que la inducción de sepsis genera una mayor proporción de macrófagos con fenotipo M1, aunque esa polarización es menor para el caso de las células procedentes de ratones TNAP^{+/-} (Figura 26B). En cuanto a las poblaciones M2, en ratones WT se observa un ligero aunque significativo incremento en la proporción de estas células, aumento que no se da en caso de ratones TNAP^{+/-} (Figura 26C).

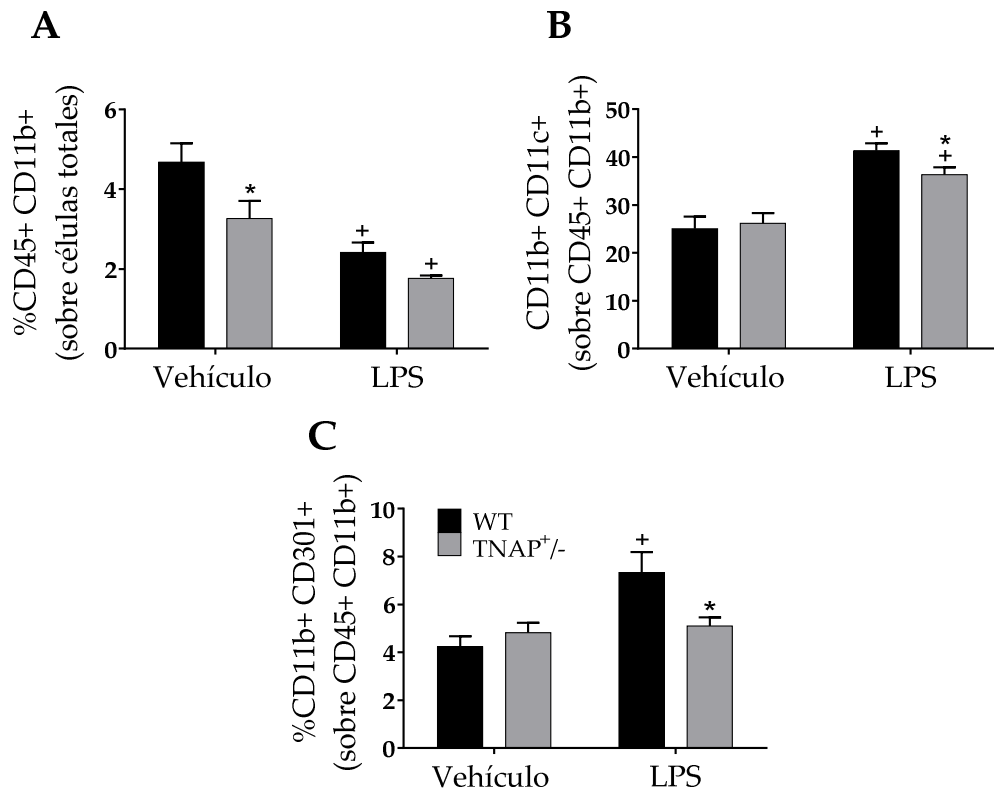


Figura 26. Análisis por citometría de flujo de las células del bazo. A partir de esplenocitos totales, se estudió el porcentaje de células CD45+CD11b+CD11c⁺ (A) y CD45+CD11b+CD301⁺ (B) (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Para estudiar en mayor profundidad estas células, se procedió a su aislamiento mediante separación magnética celular positiva, seleccionando las células de interés con el anticuerpo de CD11b. Una vez extraídas estas células, fueron procesadas para la extracción de mRNA y el estudio de la expresión génica. En primer lugar, se determinaron una serie de marcadores y moléculas que permiten diferenciar las poblaciones de macrófagos. Se determinaron marcadores propios de macrófagos M1 y M2, *Itgax* y *Mrc1* respectivamente. En ambos casos se observó una expresión reducida en respuesta al LPS en ratones WT. Algo similar ocurría en ratones TNAP^{+/-} al estudiar *Mrc1*, sin embargo, los niveles basales de *Itgax* eran menores a los de WT, y no se observa cambio en la expresión en respuesta al LPS (Figura 27A, C). Como identificativo de M1, también se estudió *Nos2*, observándose un marcado incremento en sepsis, que fue algo menor, sin llegar a la significación, en el caso de macrófagos TNAP^{+/-} (Figura 27B). La expresión de *Alpl* en estas células fue también demostrada. Aunque la expresión

basal es baja, y ligeramente menor en TNAP^{+/-}, el estímulo *in vivo* del LPS provoca un aumento de la expresión en ambos grupos (Figura 27D).

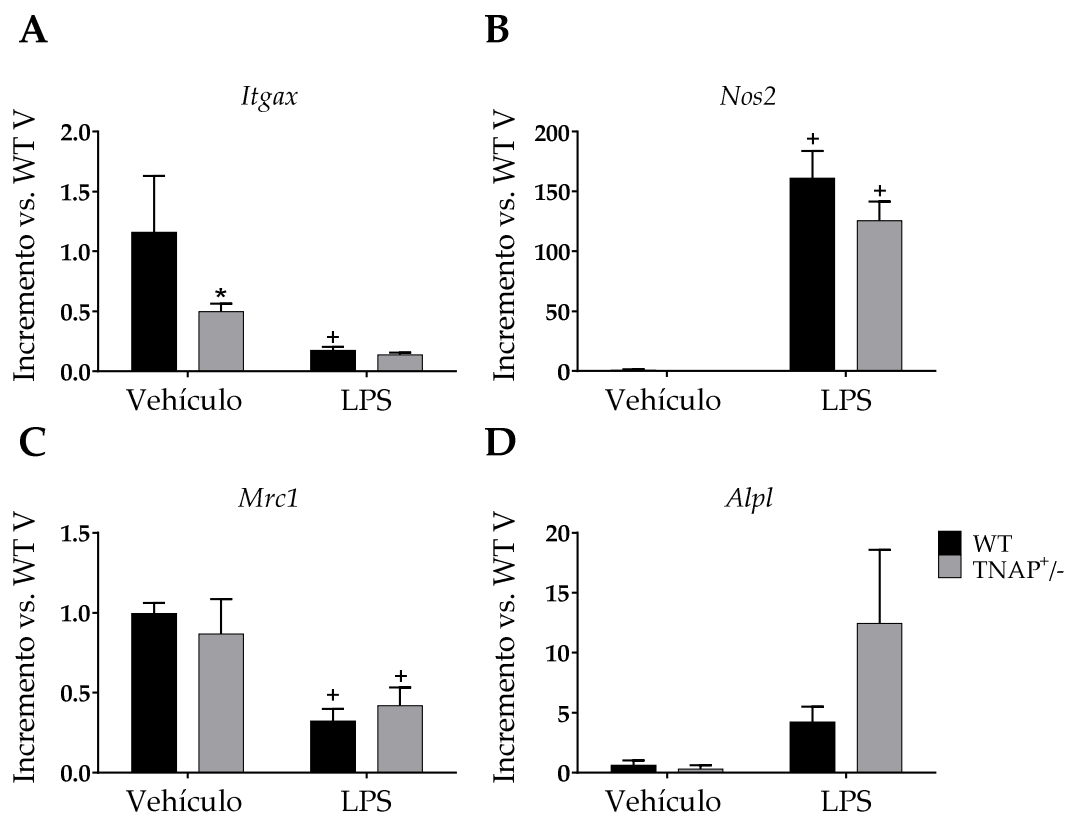


Figura 27. Análisis de diversos genes en macrófagos del bazo. Los macrófagos fueron aislados a partir de los esplenocitos totales y los niveles de mRNA de *Itgax* (A), *Nos2* (B), *Mrc1* (C) y *Alpl* (D) fueron determinados (n=5-6). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

En estos macrófagos se determinó también la expresión de una serie de citoquinas y quimioquinas. En todos los casos, la administración de LPS motivó un incremento de la expresión de estos genes en macrófagos WT, aunque en el caso de *Il1b* no llegó a ser significativo (Figura 28). Dicho incremento también fue descrito en macrófagos TNAP^{+/-}, con la excepción de *Il1b*, no encontrándose diferencia en *Il6* entre los grupos WT y TNAP^{+/-} (Figura 28A). Sin embargo, la expresión de *Il10* y *Cxcl10* fue inferior en células procedentes de ratones TNAP^{+/-}, aunque solo la primera fue significativa (Figura 28C/D).

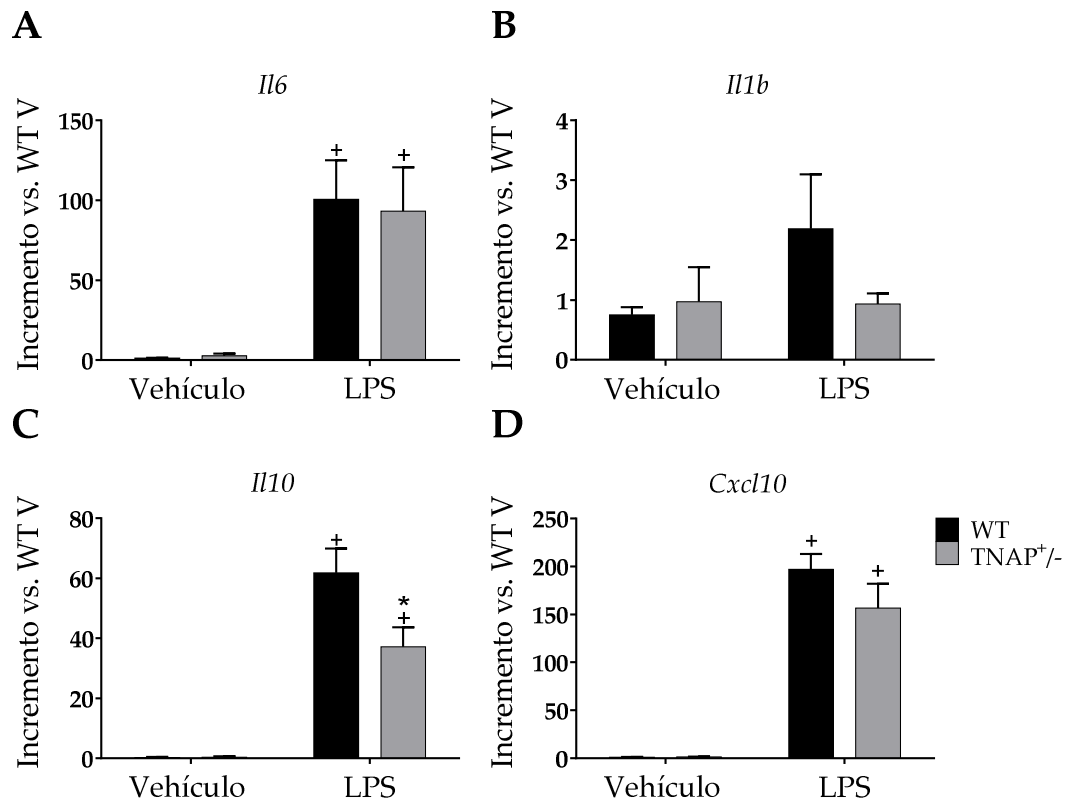


Figura 28. Estudio de la expresión de genes en macrófagos del bazo. Tras la obtención de macrófagos del bazo, se estudió por RT-qPCR la expresión de *Il6* (A), *Il1b* (B), *Il10* (C) y *Cxcl10* (D) (n=5-6). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

Finalmente, se estudió la producción de citoquinas por parte de los macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal, siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Tras ser cultivados durante 24 horas, se midió en el sobrenadante los niveles de IL-6 y TNF- α . Aunque los niveles de TNF- α estaban por debajo del límite de detección, sí se pudo medir IL-6. La inducción de sepsis motivó un incremento de la producción de esta citoquina en ratones WT, el cual no llegó a ser significativo en el caso de los ratones TNAP^{+/-}. De hecho, ya en condiciones basales los niveles de IL-6 en macrófagos de ratones TNAP^{+/-} eran menores respecto a los WT, aunque sin llegar al umbral de la significación estadística (Figura 29). Estos resultados confirman la importancia de la TNAP en la producción de IL-6 en macrófagos.

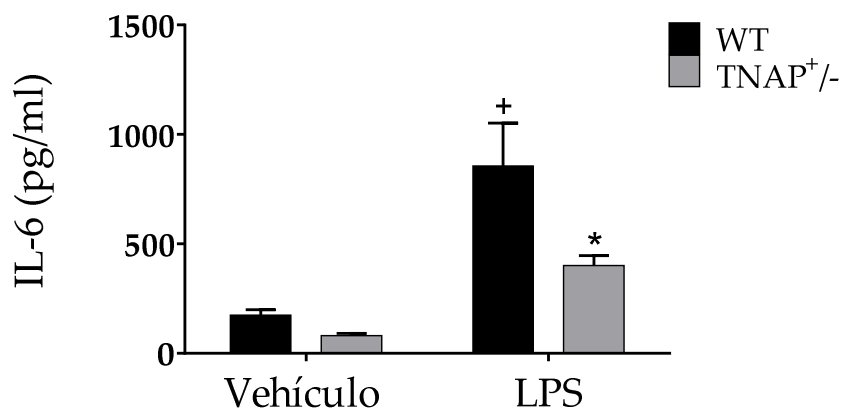


Figura 29. Producción de IL-6 por parte de macrófagos intraperitoneales. Tras aislar los macrófagos de la cavidad peritoneal y ser cultivados durante 24 horas, se determinó la producción de IL-6 por ELISA (n=10-12). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a vehículo (control).

A la vista de los resultados obtenidos, se procedió a analizar diferentes vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria de los macrófagos en general, especialmente las implicadas en la respuesta a IL-6. Concretamente, se estudió la fosforilación de STAT3, AKT e I κ B α de macrófagos intraperitoneales estimulados con LPS durante 2 horas. En consonancia con la menor producción de IL-6 en respuesta al estímulo *in vivo* e *in vitro*, la ratio P-AKT/AKT, P-STAT3/STAT3 y P-I κ B α / I κ B α (Figura 30A-C) fue significativamente menor en macrófagos procedentes de ratones TNAP^{+/-}, lo que sugiere una menor activación de estas vías de señalización.

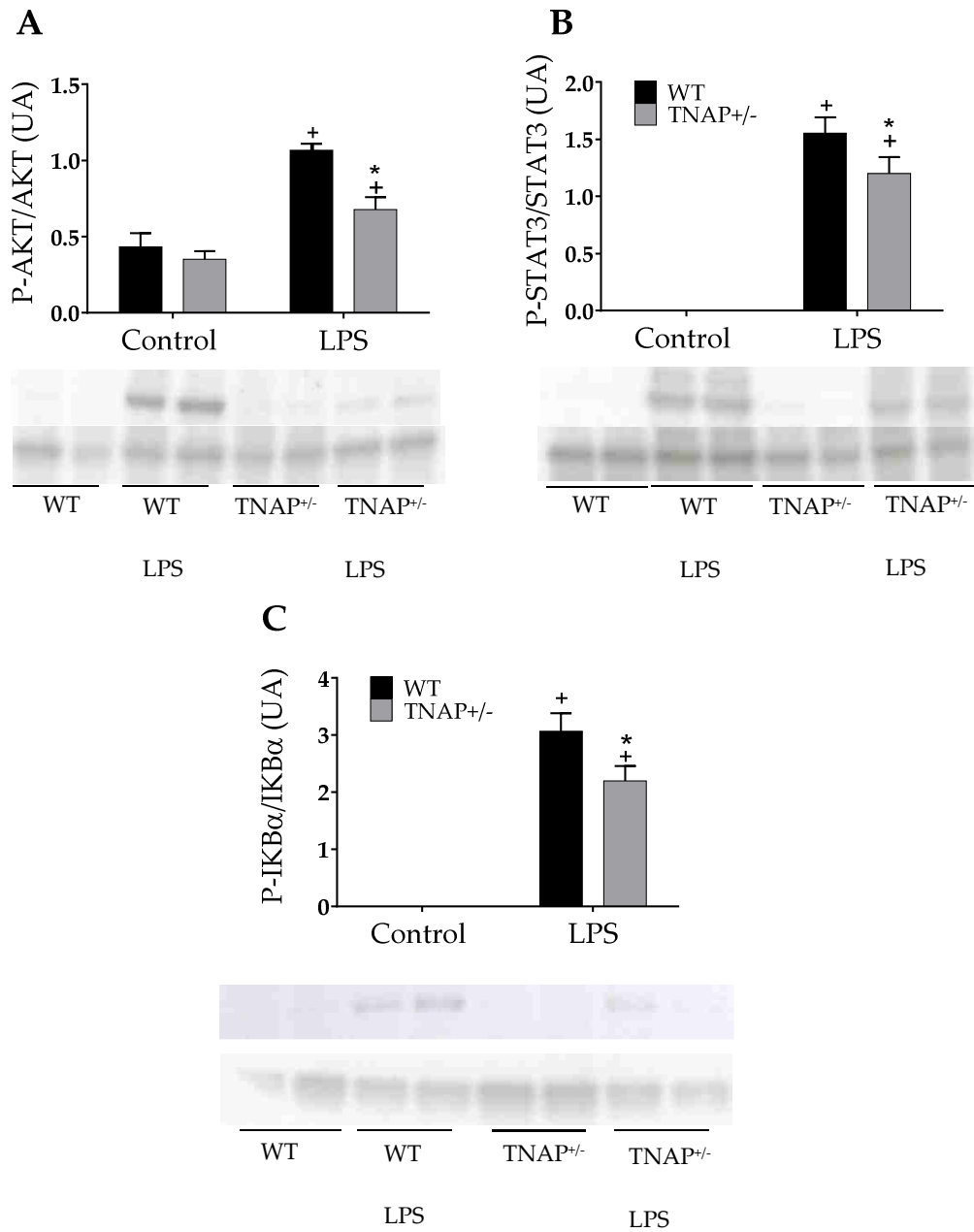


Figura 30. Evaluación de vías de señalización relacionadas con la inflamación. Tras aislar los macrófagos intraperitoneales y ser estimulados con LPS durante 2 horas, se determinó la ratio p-AKT/AKT (A), p-STAT3/STAT3 (B) y P-IκBα/ IκBα (C) mediante Western Blot (n=6)(UA, unidades arbitrarias). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente al control.

3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA TNAP EN LOS MACRÓFAGOS DE BAZO, CAVIDAD PERITONEAL Y MÉDULA ÓSEA

La existencia de heterogeneidad entre las distintas poblaciones de macrófagos residentes es un tema que ha sido estudiado recientemente [208, 209]. Se han descrito diferencias en relación con la capacidad de proliferación, la producción de citoquinas, la morfología o la capacidad de fagocitosis, entre otros. Continuando con la caracterización del papel de TNAP en células del sistema inmune, planteamos diversos experimentos sobre macrófagos de estas tres fuentes diferentes con el fin de estudiar cómo les afecta la haplodeficiencia de *Alpl*.

3.1. Estudio de la TNAP en la proliferación de macrófagos

Los estudios de proliferación se llevaron a cabo mediante experimentos de incorporación de timidina-[³H] a células estimuladas con M-CSF. Las condiciones del cultivo aparecen descritas en Material y Métodos. Independientemente del origen de los macrófagos, la deficiencia en TNAP no motivó cambios significativos en la proliferación de estas células, únicamente una cierta tendencia a estar incrementada (Figura 31A-C).

3.2. Estudio de la TNAP en la producción de citoquinas de macrófagos

A continuación, los macrófagos de distintas procedencias fueron estimulados *in vitro* con LPS y se procedió a caracterizar la producción de IL-6. Como ya se ha descrito previamente, observamos que la capacidad de producir citoquinas varía mucho de unas células a otras. Además de esto, los resultados obtenidos muestran cómo la falta de un alelo de *Alpl* conduce a una producción algo mayor de esta citoquina en células procedentes del bazo (Figura 32A). Pero, curiosamente, no fue este el perfil de producción que mostraban los macrófagos procedentes de la cavidad peritoneal y la médula ósea, donde el comportamiento fue justamente el contrario, es decir, la producción de IL-6 era significativamente menor en el caso de macrófagos procedentes de ratones TNAP^{+/-}, siendo este efecto especialmente marcado en el caso de los procedentes de la médula ósea (Figura 32B/C).

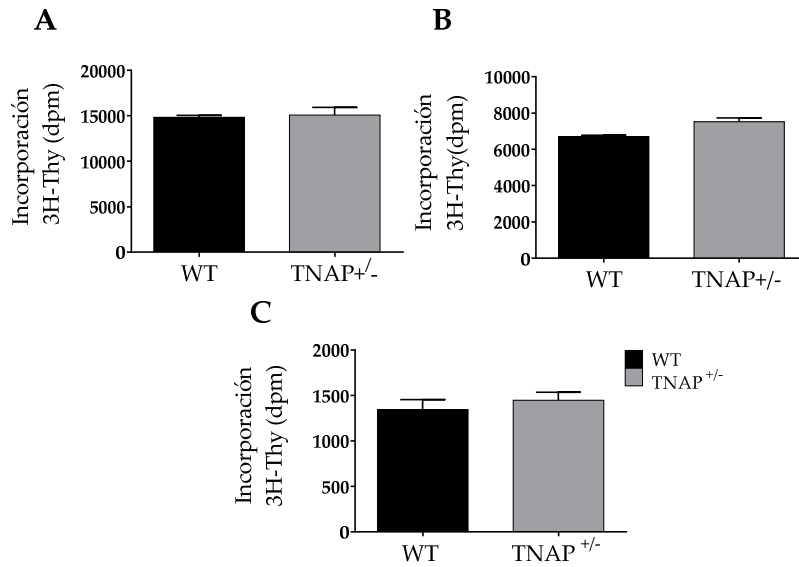


Figura 31. Medidas de proliferación *in vitro*. La proliferación se estudió mediante la incorporación de timidina tritiada en macrófagos procedentes del bazo (A), cavidad peritoneal (B) y médula ósea (C). Se expresa como desintegraciones por minuto (dpm) (n=4 o 6). Los datos se expresan como media± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a control.

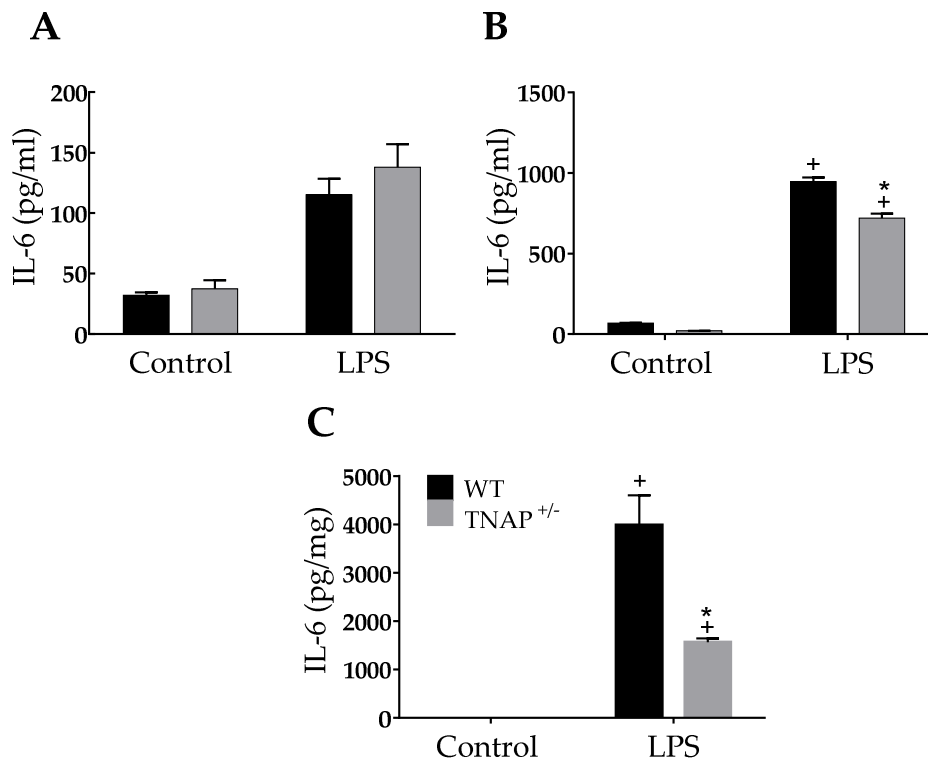


Figura 32. Producción de IL-6 *in vitro*. Tras estimular con LPS (1 µg/ml) 24 horas, se determinó la producción de IL-6 por ELISA en el sobrenadante de macrófagos procedentes del bazo (A) (n=12), cavidad peritoneal (B) (n=6) y médula ósea (C) (n=6).

Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a control.

Para confirmar los resultados anteriores, recurrimos a la utilización de medios condicionados. En un primer experimento, macrófagos de las tres procedencias estudiados (bazo, cavidad peritoneal y médula ósea) procedentes de ratones WT y TNAP^{+/-} fueron aislados y estimulados con LPS durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se conservó (medio condicionado, MC). A continuación, aislamos macrófagos procedentes de ratones WT, los cuales fueron estimulados con los medios condicionados obtenidos (MC WT y MC TNAP^{+/-}) procedentes de macrófagos de la misma localización a una dilución 1/10. La incubación se prolongó durante 24 horas, tras lo cual se recogió el sobrenadante. Este sería empleado para la detección de IL-6. Como se observó en el experimento anterior, los macrófagos WT procedentes de bazo produjeron una mayor cantidad de citoquina cuando eran estimulados con el MC de macrófagos TNAP^{+/-} (Figura 33A). Por el contrario, cuando los macrófagos WT de la cavidad peritoneal y procedentes de médula ósea se exponían a los MC, la producción de IL-6 fue menor cuando ese medio condicionado procedía de macrófagos TNAP^{+/-} (Figura 33B/C).

En conjunto, estos resultados parecen indicar que la haplodeficiencia se relaciona con una mayor capacidad para producir citoquinas y de activación de otros macrófagos para los procedentes del bazo. Por su parte, esta condición afecta de manera contraria a los macrófagos intraperitoneales y de médula ósea, que manifiestan una menor respuesta al LPS y una menor capacidad de activación de otras células secundaria al estímulo inicial.

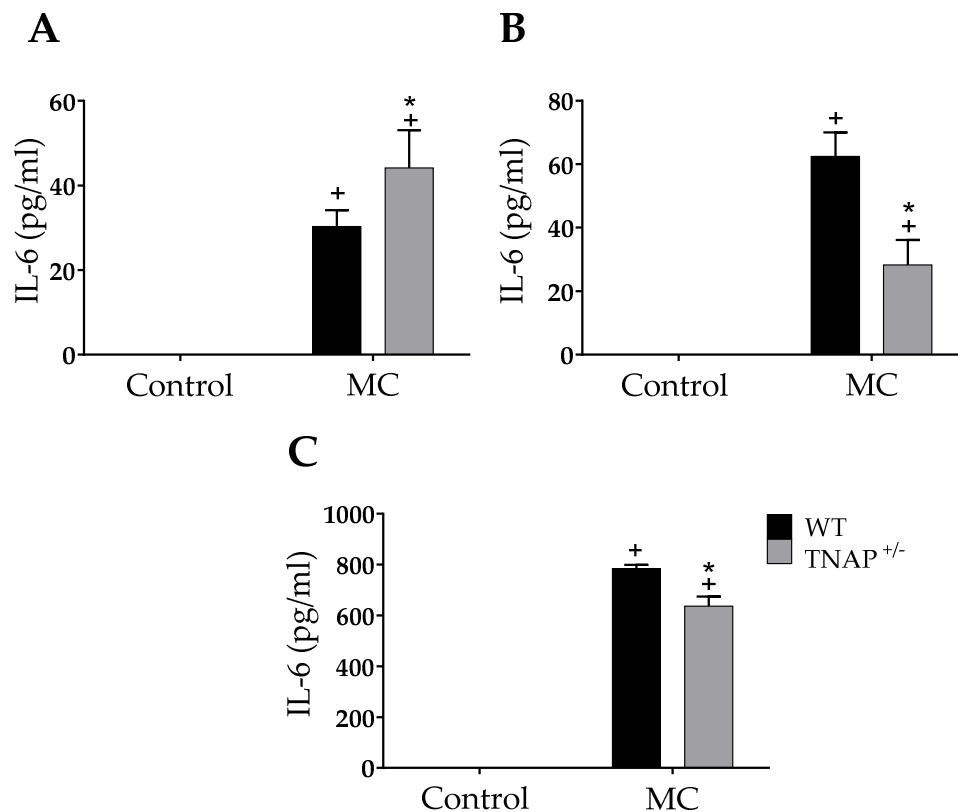


Figura 33. Estimulación de macrófagos WT con medios condicionados. El medio condicionado se obtuvo tras aislar macrófagos de los tres orígenes (bazo, cavidad peritoneal y médula ósea) y ser estimulados con LPS durante 24h. A continuación macrófagos WT aislados de bazo, cavidad peritoneal y médula ósea fueron estimulados con los MC (WT y TNAP^{+/-}) procedentes de macrófagos de igual procedencia. Tras otras 24 h, se mide la producción de IL-6 en respuesta al estímulo con MC en macrófagos procedentes de bazo (A) (n=14), cavidad peritoneal (B) (n=6) y médula ósea (C) (n=6). Los datos se expresan como media± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a control.

3.3. Estudio de la inhibición de TNAP en la función de los macrófagos

Con objeto de confirmar que los resultados anteriormente expuestos eran consecuencia de la depleción de un alelo de *Alpl* (y por tanto de la menor expresión de AP), y no por el desarrollo de alguna mutación en la generación del ratón *knockout*, donde se inactiva el gen en células madre embionarias vía recombinación homóloga [49], se realizó un experimento de inhibición exógena de la TNAP macrófagos de ratones WT.

Debido a la limitación técnica que supone obtener un número de macrófagos suficiente para estudiar *in vitro* las isoformas expresadas en estas células, se utilizó un procedimiento indirecto en el cual se realizó una inhibición exógena de la

TNAP en macrófagos de ratones WT. Así, se estudió el efecto de la inhibición de TNAP en la función de los macrófagos estimulados con LPS en presencia de los inhibidores acompetitivos de TNAP levamisol, fenilalanina (Phe) y teofilina (Theo) [114, 119, 415]. En comparación con otras isoformas de AP, la TNAP (subtipos hueso y riñón) es más sensible a la inhibición por levamisol y teofilina, aunque hay que tener en cuenta que la teofilina aumenta también la concentración intracelular de AMPc [115], lo que puede desencadenar efectos adicionales en macrófagos. Así, por ejemplo, se ha descrito un aumento de la actividad elastasa y una alteración en algunas citoquinas, como la IL-13 [416, 417]. Por otro lado, la fenilalanina inhibe todas las isoformas de AP, pero con una selectividad mayor hacia las APs placentaria e intestinal [118, 418]. Los macrófagos fueron preincubados con los inhibidores de TNAP durante 2 horas antes del estímulo con LPS. Tras 24 horas de cultivo, el sobrenadante de las células fue analizado por ELISA para determinar la producción de IL-6, revelando un perfil diferente en función del origen de los macrófagos.

En el caso de los macrófagos de bazo, el levamisol provocó una marcada reducción de la producción de IL-6, mientras que fenilalanina y teofilina incrementaron esta concentración de manera significativa (Figura 34A). Por el contrario, los macrófagos intraperitoneales se muestran inalterados por el efecto del levamisol, aunque se observa una marcada reducción de la producción de IL-6 tras la exposición a los inhibidores fenilalanina y teofilina (Figura 34B). Por último, los inhibidores levamisol y teofilina provocaron un incremento de IL-6, mientras que fenilalanina redujo los niveles de IL-6 en macrófagos de médula ósea (Figura 34C). Si comparamos este experimento con el descrito en la Figura 32, los macrófagos del bazo e intraperitoneales reproducen el perfil observado con LPS tanto al ser incubados con fenilalanina como con teofilina. En el caso de los macrófagos de médula ósea, el perfil es reproducido por la incubación con fenilalanina únicamente.

Como se ha podido observar, el perfil de la producción de IL-6 en presencia de inhibidores de TNAP cambia completamente en función de la procedencia de los macrófagos. Las isoformas de TNAP muestran una sensibilidad a la inhibición distinta en función del inhibidor empleado. Por consiguiente, y aunque no puedan excluirse efectos adicionales, estos resultados llevan a sospechar la existencia de isoformas de TNAP diferentes en cada tipo celular. Es importante indicar que antes de la realización de este experimento se verificó la ausencia de citotoxicidad

de todos los inhibidores de TNAP sobre los macrófagos a las concentraciones empleadas mediante el ensayo de MTT, tanto en estado basal como estimulado

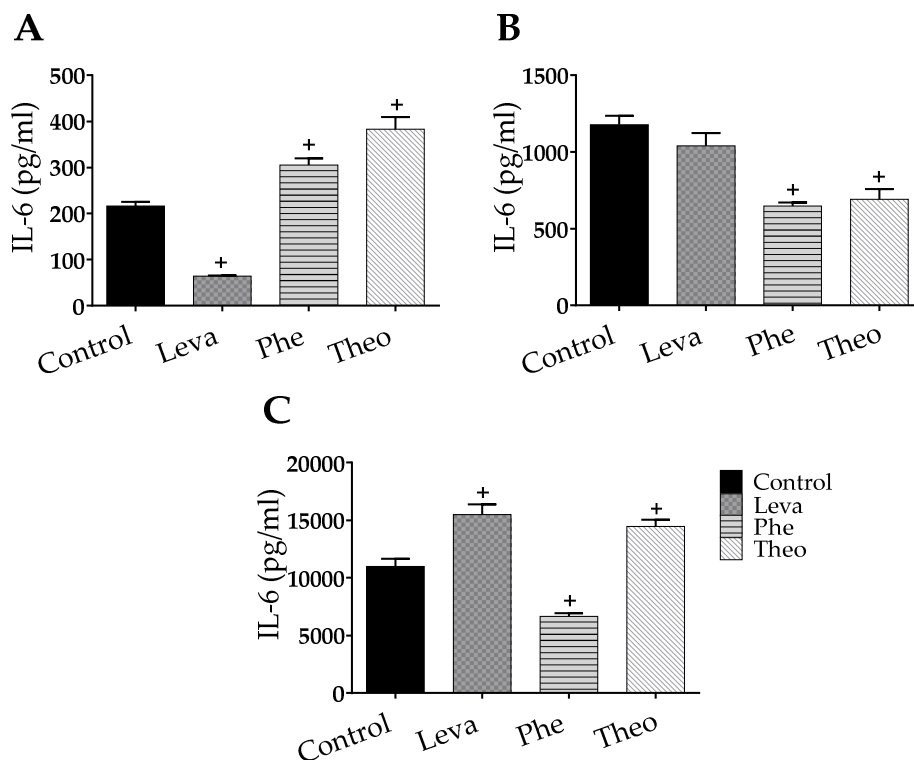


Figura 34. Inhibición *in vitro* de TNAP. Tras una incubación de 2 horas con los inhibidores específicos levamisol (1 mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1 mM), los macrófagos de ratones WT de las tres poblaciones se estimularon con LPS (1 μ g/ml) 24 horas. Se determinó por ELISA los niveles de IL-6 en el sobrenadante de macrófagos procedentes de bazo (A), cavidad peritoneal (B) y médula ósea (C) (n=6). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente a control.

Con el fin de determinar si la haplodeficiencia de *Alpl* tiene algún efecto sobre la polarización de los macrófagos se llevó a cabo el siguiente estudio *in vitro*. Una vez extraídos del bazo y la cavidad intraperitoneal, y pasados los 6 días necesarios para la maduración de los macrófagos procedentes de la médula ósea, las células se dejaron 24 horas antes del estímulo en un medio con una concentración reducida de FBS (2%). Transcurrido este tiempo, los macrófagos se estimularon para polarizar hacia los fenotipos M1 y M2. En el primer caso, la polarización se llevó a cabo con LPS e IFN- γ , estímulos para la activación clásica de los M1. En el caso de la polarización hacia fenotipo M2 o alternativo, se realizó mediante la estimulación con IL-4. Para identificar las poblaciones celulares, se utilizaron los

marcadores M1 CD45+CD11b+CD38+, mientras que para M2 se empleó la combinación CD45+CD11b+PD-L2+CD206+. Se trata de componentes presentes en la superficie celular (con la excepción de CD206, que también se encuentra en el citoplasma) cuya expresión se encuentra incrementada en respuesta a los estímulos de la polarización.

En el caso de los estudios de polarización hacia M1, se observó un pequeño pero significativo incremento en el porcentaje de células CD11b+CD38+ tanto en macrófagos de médula ósea como de la cavidad peritoneal procedentes de ratones TNAP^{+/-} (Figura 35A/B).

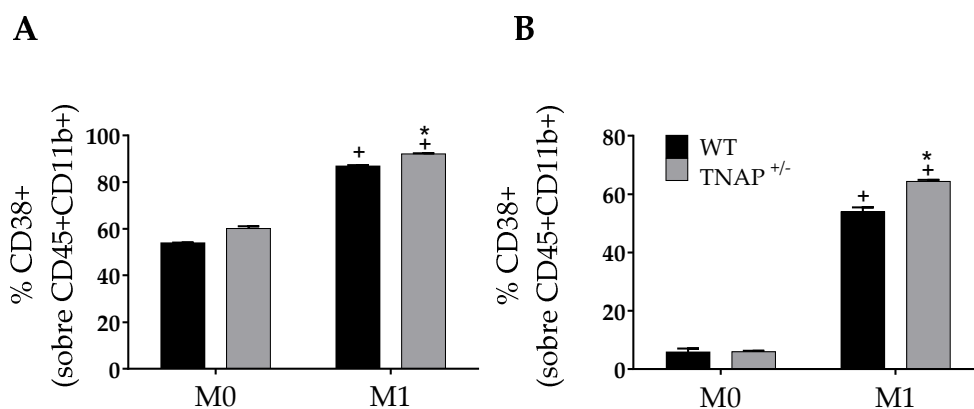


Figura 35. Polarización de macrófagos WT y TNAP^{+/-} hacia M1. Análisis por citometría de flujo de la presencia relativa de macrófagos M1 (CD45+CD11b+CD38+) sobre la población CD45+CD11b. Los macrófagos procedentes de la cavidad peritoneal (A) y de la médula ósea (B), fueron estimulados con IFN- γ y LPS. (M0 n=4, M1 n=5). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * p<0,05 frente a WT, + p<0,05 frente a M0.

La polarización hacia M2 también mostró diferencias entre los macrófagos de WT y TNAP^{+/-}. Cuando los macrófagos intraperitoneales fueron estimulados con IL-4, los macrófagos de TNAP^{+/-} mostraron una reducción del porcentaje de células CD11b+PD-L2+CD206+ respecto a WT (Figura 36A). Contrariamente, los macrófagos TNAP^{+/-} de médula ósea mostraban una polarización incrementada en estas mismas condiciones (Figura 36B).

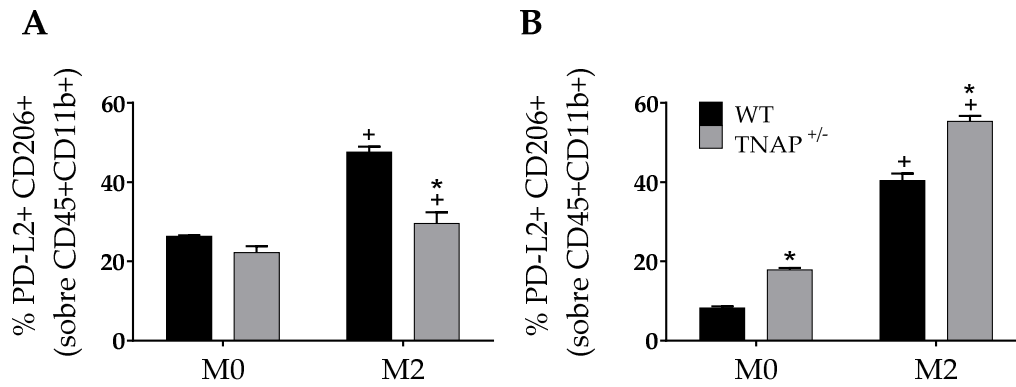


Figura 36. Polarización de macrófagos WT y TNAP^{+/-} hacia M2. Análisis por citometría de flujo de la presencia relativa de macrófagos M1 (CD45+CD11b+PD-L2+CD206) sobre la población CD45+CD11b. Los macrófagos procedentes de la cavidad peritoneal (A) y de la médula ósea (B), fueron estimulados con IL-4. (M0 n=4, M2 n=4-5). Los datos se expresan como media± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de una vía. * p<0,05 frente a WT, + p<0,05 frente a M0.

DISCUSIÓN

El papel de la TNAP en la homeostasis del hueso ha sido estudiado en profundidad. En este sentido, gran parte del conocimiento existente sobre esta enzima ha surgido en el contexto de la investigación de la hipofosfatasa, una enfermedad caracterizada por la deficiencia de TNAP. El estudio de la misma puso de manifiesto la capacidad de la TNAP de actuar desfosforilando el PPI, un inhibidor de la mineralización ósea, así como otros sustratos como el PLP [419]. Sin embargo, la TNAP se expresa en muchos otros tejidos y tipos celulares, en los cuales las funciones que desempeña esta enzima son menos conocidas. Aparte de los sustratos anteriormente mencionados, la TNAP es capaz de desfosforilar y detoxificar el LPS [420]. En el hígado, la administración de LPS incrementa la expresión de la TNAP, y altos niveles de esta enzima sirven de indicador de enfermedades hepáticas como la colestasis [39, 421]. Además, los niveles de esta enzima se pueden ver incrementados como consecuencia del tratamiento con glucocorticoides [422]. Se han descrito diversas funciones de la TNAP de adipocitos en el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina a través de la producción de adipocinas [18]. También se expresa en el intestino, especialmente en el colon, aunque sus funciones no están del todo caracterizadas. Sin embargo, diversas investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto un incremento en su expresión en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal, el cual es debido tanto a la infiltración de leucocitos (los cuales expresan la TNAP) hacia el tejido inflamado como a la inducción en las propias células epiteliales [15-17]. A raíz de estos datos, los esfuerzos de nuestro grupo de investigación se han centrado en dilucidar el papel de la TNAP en el sistema inmunológico. En relación a esto, algunas investigaciones anteriores de otros grupos de investigación habían apuntado a un papel de la TNAP en el proceso de diferenciación hacia células secretoras de anticuerpos [29, 30]. Esta enzima también está presente en los neutrófilos, concretamente se ha descrito su presencia en las vesículas secretoras [31]. Más recientemente, hemos analizado la función de la TNAP en los linfocitos T, en los que esta enzima parece desempeñar una acción reguladora clave, que incide en su capacidad de activación y proliferación, incluyendo su potencial para inducir colitis experimental en ratones linfopénicos. La modulación celular se ha constatado en células heterocigóticas, es decir, que expresan niveles sustanciales de la enzima, y se ha relacionado con modificaciones en la glucosilación [32].

En la presente tesis doctoral se recogen nuevos estudios que exploran el papel fisiológico de la TNAP en labores inmunomoduladoras. Con este objetivo, hemos

empleado un modelo de pancreatitis aguda, en el cual los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa, caracterizando la TNAP en células acinares; y un modelo de endotoxemia aguda, en el que los macrófagos desempeñan un papel primordial; y, por razones mecánicas, macrófagos de tres localizaciones anatómicas distintas.

La pancreatitis aguda es uno de los trastornos gastrointestinales más comunes que requieren hospitalización. Suele desarrollarse como una enfermedad leve y autolimitada (80%), aunque en ocasiones progresa de forma rápida e incluso fulminante, con un alto riesgo de mortalidad. Entre las causas más frecuentes se encuentran los cálculos biliares, el consumo excesivo de alcohol y diversas mutaciones en el gen del tripsinógeno. La pancreatitis aguda implica una activación prematura de enzimas digestivas y autofagia, con el consiguiente daño en las células acinares y el reclutamiento de células inmunes. En la respuesta inflamatoria generada en esta patología intervienen las propias células acinares, células endoteliales, linfocitos, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Los neutrófilos son las primeras células que van a infiltrarse en el tejido, seguidas de los monocitos. El interés del estudio de esta enfermedad dentro de nuestra línea de investigación radica en el papel esencial que desempeñan las células acinares y los neutrófilos, así como la alteración de la función de barrera intestinal. Las células acinares constituyen uno de los principales tipos de células epiteliales presentes en el páncreas, y nuestro grupo de investigación ya describió un incremento de la expresión de TNAP en células del epitelio intestinal en un modelo de colitis experimental [15]. Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, ha sido descrita la presencia de TNAP en las vesículas secretoras de los neutrófilos [31].

El modelo empleado ha sido el de pancreatitis aguda inducida por ceruleína. La ceruleína es un péptido que actúa como un secretagogo similar a la colecistoquinina en el páncreas, promoviendo de esta manera la secreción excesiva de líquido pancreático y de enzimas digestivas. La consecuencia de estas acciones es la aparición de una pancreatitis edematosa [423, 424]. Nuestros resultados son consistentes con las características conocidas del modelo, a saber, existencia de una evidente lesión pancreática con edema e infiltración de leucocitos, liberación de amilasa al plasma, aumento de los marcadores inflamatorios pancreáticos, linfopenia, anemia, alteración de la función de barrera intestinal y afectación hepática [425, 426]. De hecho, la actividad plasmática de la amilasa se incrementó 4-5 veces en el plasma de los ratones con pancreatitis WT, mientras que la

expresión de *Amy2a1* se redujo drásticamente en el páncreas, posiblemente debido a la disminución de la viabilidad de las células acinares. La evaluación histológica del páncreas reveló tejido edematoso con una infiltración de células inmunes relativamente menor, compuesta en su mayoría de neutrófilos. La identificación de este tipo celular estuvo basada en la apariencia visual y la expresión de MRP8 (S100A8, una de las subunidades de la calprotectina). Se observó un marcado incremento en la expresión de ciertas citoquinas (*Il1b*, *Il6*), y quimioquinas (*Ccl2*, *Cxcl1*, *Cxcl2*) y del ligando de la P-selectina (*Selplg*), una molécula de adhesión. Curiosamente, el aumento en los niveles de mRNA de *Ilb* no se tradujo en niveles elevados de proteína, lo que indica una fuerte modulación postraduccional.

En este modelo se observaron también cambios sistémicos. Concretamente, el análisis hematológico reveló una anemia marcada, lo que sugiere una hemorragia/hemólisis significativa, así como linfopenia. Este último efecto fue particularmente pronunciado (~50% de reducción), y se ha atribuido a la apoptosis secundaria a la activación excesiva (en humanos) [427]. A pesar de este hallazgo, los niveles plasmáticos de IL-1 β e IL-6 estuvieron por debajo de los niveles de detección. El intestino y el hígado también se vieron afectados.

El efecto más sobresaliente observado en los ratones TNAP^{+/-} fue una respuesta inflamatoria más marcada en el páncreas, evidenciada por la expresión aumentada de *Cxcl2*, *Selplg*, *Ccl2*, *Il6* e *Il1b*, y la infiltración aumentada de neutrófilos. Sin embargo, este efecto no se asoció con diferencias en cuanto al daño histológico (principalmente edema), anemia o expresión de *Amy2a1*. De hecho, los ratones TNAP^{+/-} con pancreatitis aguda presentaron unos niveles de amilasa en plasma menores a los que presentaban los ratones WT. Como hemos explicado anteriormente, este último hallazgo puede explicarse por una mayor liberación de enzimas en las fases tempranas de la pancreatitis, ya que en este modelo el ritmo de secreción de la enzima exocrina supera la velocidad de biosíntesis [405]. Por lo tanto, los niveles plasmáticos más bajos observados en los ratones TNAP^{+/-} representarían un agotamiento más rápido de las reservas pancreáticas. De acuerdo con esta hipótesis, se encontraron niveles elevados de mRNA de *Bax* en ratones TNAP^{+/-}, lo que sugiere un aumento de la apoptosis/necrosis.

Una segunda característica está relacionada con la respuesta linfopénica, que solo se observó en ratones WT. Los ratones TNAP^{+/-} ya eran linfopénicos antes de la administración de ceruleína, como describimos en un estudio anterior, presumiblemente debido a la respuesta reducida de las células T a los estímulos

[32], y no hubo ningún efecto adicional de la pancreatitis. La razón es desconocida y será objeto de futuros estudios.

En tercer lugar, la ausencia de un único alelo de *Alpl* tuvo únicamente consecuencias de menor consideración en el hígado, y ninguna aparentemente en el intestino. El aumento de la actividad plasmática de GPT sugiere una lesión hepática algo mayor, pero el cambio fue modesto, y GOT no se vio afectada significativamente. La existencia de una mayor respuesta inflamatoria en este órgano se apoya asimismo en el incremento de expresión de *Il6* en ratones TNAP^{+/-} con pancreatitis aguda respecto al grupo control, aumento que no se produjo en el caso de ratones WT. Esta inducción es más notable si se considera que el nivel de expresión basal es incluso inferior a lo normal en estos ratones. Por tanto, estos datos apuntan a una mayor afectación del hígado, aunque leve, en ratones TNAP^{+/-}.

En cuanto al mecanismo responsable de este fenotipo de respuesta inflamatoria más acusada, nuestros resultados pueden explicarse en principio por dos factores principales: bien por una mayor activación de los neutrófilos en ratones TNAP^{+/-}, o por una mayor sensibilidad de las células acinares a la lesión inducida en los mismos (o incluso una combinación de ambos factores). Las principales células inmunes infiltradas en este modelo son, como se ha señalado, neutrófilos, los cuales expresan TNAP [165, 428, 429]. El hecho de que el estado inflamatorio agravado en ratones TNAP^{+/-} pueda ser prevenido mediante la depleción experimental de los neutrófilos revela el papel decisivo que estas células desempeñan en dicho fenotipo, aunque también en el propio desarrollo de la pancreatitis aguda como tal. Esta conclusión se apoya asimismo en la mayor infiltración de neutrófilos en ratones TNAP^{+/-} y en la respuesta incrementada de estas células a la estimulación *in vitro*. El mecanismo que relaciona la TNAP y el reclutamiento y activación de neutrófilos es desconocido, pero podría estar relacionado con la modulación del ATP extracelular, un sustrato conocido de la TNAP. En la regulación purinérgica, ATP y adenosina actúan como principales moléculas transmisoras y han demostrado ser esenciales para la plasticidad y heterogeneidad de los neutrófilos, así como para orquestar sus complejas funciones durante la inflamación [430]. En este sentido, la regulación purinérgica se ha relacionado, entre otros, con el rodamiento, adhesión, transmigración, apoptosis, fagocitosis, estallido oxidativo, desgranulación y formación de trampa extracelular de los neutrófilos [430]. La estimulación de los receptores P₂ por ATP facilita la activación del sistema inmune, mientras que la unión de adenosina al

receptor P_1 tienen un papel fundamentalmente inhibitorio [431]. Dado que la TNAP puede desfosforilar y degradar el ATP, es posible que la deficiencia de la TNAP provoque un aumento de la relación ATP/adenosina, induciendo así un estado proinflamatorio. En estudios anteriores nuestro grupo de investigación demostró que las células T dependen de la expresión normal de la TNAP para su activación *in vivo* e *in vitro* [32]. Por otra parte, otros autores han descrito que la TNAP está implicada en la regulación de la función de los neutrófilos, en concreto, desempeña un papel crítico en la acción antimicrobiana al promover la migración, la producción de ROS y la apoptosis de estas células [428]. Considerando que la regulación purinérgica es común a varios tipos de células inmunes, y que éstas expresan por lo general TNAP, la TNAP podría ser un importante regulador de la respuesta inmune, aunque los mecanismos y efectos están en buena medida por caracterizar [432].

Otra de las observaciones de interés en esta tesis es la implicación de las células acinares en el mayor daño observado en ratones TNAP^{+/-}. Nuestros datos confirman que las células acinares pancreáticas de ratón expresan *Alpl*. Aunque no existen diferencias significativas entre los niveles de mRNA entre los ratones WT y TNAP^{+/-}, éstos se redujeron aproximadamente a la mitad en células acinares primarias no cultivadas aisladas directamente de ratones heterocigóticos (cerca de la significación estadística), lo que concuerda con la haplodeficiencia (Figura 9). Los niveles fueron por el contrario mucho más parecidos en las células cultivadas, lo que sugiere que el propio cultivo tiene un efecto regulador en este sentido (Figura 10). Por otra parte, la TNAP se indujo de manera robusta por la pancreatitis, pero no por el tratamiento *in vitro* con ceruleína. La explicación más probable es que el tiempo de exposición fue relativamente corto en este último experimento (3 h frente a 7 h), debido a la dificultad para mantener las células durante períodos más largos en estas condiciones, pero no se puede excluir un mecanismo indirecto.

La exposición *in vitro* de células acinares WT a ceruleína tuvo un efecto proinflamatorio moderado, con un aumento menor (~ 15%) de *Cxcl1* y *Bax*, y sin cambios en *Cxcl2*, *Il6* o *Ccl2*. Sin embargo, el mismo tratamiento dio como resultado un incremento moderado de la expresión de *Cxcl1*, más pronunciado en el caso de *Cxcl2* e *Il6*, en células TNAP^{+/-}. Curiosamente se registraron cambios incluso en condiciones basales; es el caso de la reducción de *Cxcl2* y el aumento de *Cxcl1* y *Ccl2*, así como el incremento de *Amy2a1* y *Bax*. Considerados en su conjunto, nuestros datos apuntan a una modulación del fenotipo de la célula

acinar en ratones TNAP^{+/-}, lo que los hace más propensos a la señalización inflamatoria (incluido el reclutamiento de neutrófilos) y/o más sensibles a la lesión inducida por ceruleína. Además, describimos que este fenotipo puede ser parcialmente reproducido mediante la inhibición directa de la enzima, lo que sugiere que el principal vínculo entre la haplodeficiencia y la respuesta a ceruleína puede ser el nivel reducido de actividad TNAP. Sin embargo, la diferencia observada en la regulación de *Il6* sugiere la existencia de mecanismos adicionales. El mecanismo de la TNAP es incierto, pero puede estar relacionado, como en el caso de los neutrófilos, con la modulación del ATP extracelular y la regulación purinérgica, por ejemplo, al reducir la activación de NLRP3 a través del receptor P2X7 [433, 434]. A su vez, los cambios en la actividad de TNAP en ratones heterocigotos pueden ser atribuidos a las diferencias en la dinámica/velocidad de traducción, lo que puede afectar a la glucosilación. De acuerdo con esta idea, los ratones TNAP^{+/-} exhiben diversos niveles de actividad fosfatasa alcalina en varios órganos y, en particular, diferencias en la sensibilidad al inhibidor levamisol [32]. En nuestro estudio, la actividad de la fosfatasa alcalina plasmática disminuyó y mostró una sensibilidad reducida al levamisol en ratones TNAP^{+/-}, pero sin ningún cambio provocado por la inducción de pancreatitis, lo que indica que TNAP no se liberó al plasma en nuestro modelo experimental a pesar de la intensa estimulación de las células acinares.

En conjunto, nuestros datos sugieren que la expresión de TNAP alterada (es decir, expresión disminuida y/o glucosilación modificada) da como resultado una inflamación pancreática aumentada, que puede explicarse por una respuesta aumentada de los neutrófilos y por una mayor sensibilidad o perfil proinflamatorio acentuado de las células acinares a la lesión inducida por ceruleína en estas células. La combinación de estas acciones da como resultado una mayor lesión pancreática directa (ceruleína) e indirecta (neutrófilos), desempeñando este último factor un papel aparentemente más importante. Se requieren más experimentos para establecer el papel de TNAP en este nivel.

Como se ha indicado en el estudio anterior, existe una disfunción de la barrera intestinal en la pancreatitis aguda desde los primeros estadios. Sin embargo, debido a la magnitud del impacto de la haplodeficiencia de TNAP en el fenotipo global, en la presente tesis doctoral nos centramos en la fase temprana, sin llegar a estudiar la pancreatitis crónica, la cual será abordada en estudios posteriores. Dado el interés que presenta la TNAP como regulador de la barrera intestinal, puesto de manifiesto en estudios anteriores de nuestro grupo [16], decidimos

utilizar un segundo modelo *in vivo*, concretamente el modelo de endotoxemia/sepsis por administración intraperitoneal de LPS (procedente de *Escherichia coli* O55:B5). Se trata de un modelo de inmunomodulación e inflamación aguda, y que se caracteriza por presentar un importante componente de incremento de la permeabilidad, entre otros, al LPS. Por tanto, se trata de un modelo que nos permite determinar en principio el papel de la TNAP tanto en la respuesta inmunológica sistémica como a nivel de la disfunción de barrera intestinal. La respuesta inmunológica en este modelo se debe fundamentalmente a la activación del receptor TLR4, y en este sentido, unas de las células de mayor importancia en la respuesta son los macrófagos, en la medida en que constituyen una importante población celular en cuanto a la expresión de TLR4 y a la activación dependiente de LPS.

El modelo de endotoxemia puede considerarse un modelo simplificado de sepsis. A diferencia de esta, la estimulación inmunológica no procede de un conjunto complejo de componentes de la microbiota o de un inóculo infeccioso, sino que, como se ha indicado, existe un único componente bacteriano. Sin embargo, comparte buena parte de la respuesta aguda que se produce en la sepsis. Así, se produce una estimulación masiva de linfocitos, macrófagos, células NK, etc. que se traduce en un incremento de citoquinas inflamatorias como IL-6, TNF- α e IFN- γ , apoptosis, sobre todo en linfocitos, hipotermia e hipoglucemia. El mecanismo responsable de la hipotermia en la endotoxemia no está del todo caracterizado, aunque ha sido relacionado con una respuesta antiinflamatoria excesiva. Por su parte, la hipoglucemia es debida fundamentalmente a la acción de TNF- α y otras citoquinas, las cuales son responsables de la inhibición de la transcripción de *Pck2*, con la consiguiente reducción de la gluconeogénesis [394, 435]. En estos parámetros no hubo diferencias entre los animales WT y heterocigóticos, tal vez por la magnitud de la estimulación.

La respuesta inmunológica exacerbada se puso también de manifiesto en el hígado. Concretamente, se observó un incremento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias *Il6*, *Ifng* y *Cxcl10*, además de la citoquina antiinflamatoria *Il10*, que presumiblemente actúa como contrapeso fisiológico en este contexto. Sorprendentemente, no se observaron cambios en los niveles de mRNA de *Tnf*. Estos efectos se asociaron a un modesto daño del parénquima hepático, a juzgar por la elevación de la actividad GOT en plasma (74%, $p=0,042$). No se apreciaron cambios en la citoquina *Tgfb*, relacionada con fenómenos de fibrosis, posiblemente por el carácter agudo del modelo. En cuanto a la fuente

celular de las citoquinas, un primer candidato son los macrófagos residentes (células de Kupffer), pero se ha constatado que las células estrelladas pueden producir citoquinas proinflamatorias en respuesta al daño hepático e incluso los propios hepatocitos son capaces de sintetizar IL-6, Cxcl10 e IL-10 [436-439]. Esta misma disyuntiva existe en el caso del gen objeto de estudio, es decir *Alpl*, el cual se encuentra aumentado, aunque débilmente (~70%) respecto al vehículo, dado que, como se ha indicado anteriormente, este gen lo expresan tanto los hepatocitos como también presumiblemente los macrófagos (ver más adelante). En nuestra tesis doctoral hemos centrado nuestra atención en los macrófagos debido al interés que suscita la función reguladora de TNAP en células del sistema inmune, es decir linfocitos T, neutrófilos y linfocitos B [32, 162, 428]. Es conocida la importancia de la TNAP en funciones de diagnóstico y seguimiento de enfermedades hepáticas a nivel clínico. Por tanto, consideramos que la caracterización de la función fisiológica de TNAP en hepatocitos reviste gran interés, por lo que será objeto de futuros estudios por nuestro grupo de investigación.

Paralelamente al incremento de *Alpl* en hígado se produjo una inducción robusta de la expresión de *Cd14* y *Lbp*. Asimismo, los niveles de *Tlr4* presentaron esta misma tendencia, si bien de carácter no significativo. CD14 es un co-receptor necesario para la señalización del LPS sobre TLR4 [440]. Por su parte, LBP se une al LPS y actúa regulando la inducción de las señales mediadas por TLR, aunque también puede ejercer un efecto de inhibición de las respuestas celulares al LPS, mediante la transferencia del LPS a lipoproteínas de alta densidad o por su neutralización directa [441]. Por supuesto, la TNAP puede desfosforilar e inactivar el LPS [420]. Por tanto, es probable que estos resultados representen globalmente una respuesta del hígado frente a la exposición a la endotoxina. Así, hemos observado un incremento en la expresión de *Lbp* y *Alpl* en el hígado de animales con colitis por TNBS y un aumento de *Tlr4* y *Cd14* en el hígado de ratas obesas Zucker (datos no publicados). Estos resultados han sido relacionados con una mayor translocación bacteriana en ambos modelos. En nuestro caso, el aporte de LPS proviene en buena medida de la dosis administrada, pero también de la translocación intestinal de LPS, según se ha descrito en este modelo [414]. Además, se puso de manifiesto una reducción de la expresión de ocludina, pero no de ZO-1 (*Tjp1*), lo que es coherente con un debilitamiento de la función barrera. Al igual que en el hígado, se produjo un incremento de la expresión intestinal (yeyunal) de *Cd14*, *Lbp* y, en este caso, *Tlr4*, de manera significativa. Presumiblemente estos cambios son achacables igualmente a la adaptación a una

mayor exposición al LPS, posiblemente de origen luminal. Sin embargo, no es descartable que esté implicado también el LPS circulante derivado de la dosis administrada.

Los ratones TNAP^{+/-} mostraron diferencias significativas en la respuesta aguda a la endotoxemia. En primer lugar, se registraron cambios complejos en la expresión de citoquinas, con un incremento modesto pero significativo de *Il6* (27%) y una disminución de *Cxcl10* y especialmente *Il10* (40% y 62%, respectivamente) a nivel hepático (Figura 17). Los niveles hepáticos de mRNA de *Tnf* fueron equiparables a los de los ratones WT; en los ratones heterocigotos estos niveles estaban considerablemente aumentados con respecto al grupo vehículo, debido a que estos últimos eran anormalmente bajos. Este último dato no se corresponde con otras medidas de *Tnf* en el hígado de ratones TNAP^{+/-}. Por tanto, este hallazgo es probablemente incidental e interpretamos que no hay cambios en este gen. Aunque, por las razones indicadas anteriormente, los cambios en las citoquinas pueden ser debidas en principio tanto a los hepatocitos como a las células estrelladas o a las células de Kupffer, la expresión elevada de *Ifng* apunta más bien a estas últimas, en la medida en que los hepatocitos no son consideradas células productoras significativas de esta citoquina [442]. En lo que respecta a la respuesta adaptativa a la endotoxemia, los ratones TNAP^{+/-} presentaban, como era de esperar, una expresión disminuida de *Alpl*, la cual se incrementó en respuesta al LPS en la misma medida que en los ratones WT (70% y 67% entre vehículo y LPS de ambos grupos respectivamente). La otra diferencia a este nivel fue una mayor inducción de *Lbp*. Es importante destacar que la GOT plasmática no se vio incrementada en los ratones heterocigotos en respuesta al LPS. Por tanto, los datos apuntan globalmente a una menor afectación hepática, aunque desde el punto de vista de la estimulación inmunológica el fenotipo es complejo, destacando en cualquier caso la gran inhibición de la *Il10* (ver más adelante).

A nivel intestinal, la mayor expresión de ocludina y ZO-1 sugiere un reforzamiento de la función barrera en los grupos control de TNAP^{+/-}. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron al administrar LPS. Análogamente, existe un modesto incremento de la expresión de *Cd14*, pero no *Tlr4* o *Lbp*, en los animales con endotoxemia. Globalmente, estos datos no sugieren un papel determinante de la TNAP en la regulación de la función barrera en este modelo. Es interesante constatar que, a diferencia del incremento de expresión de TNAP (*Alpl*) en el hígado, en el yeyuno se observa el efecto contrario en ratones WT. Por el contrario, pese a presentar niveles de expresión basal sustancialmente más bajos,

los animales heterocigotos no presentaron cambios en respuesta al LPS. Por tanto, ambos tipos de ratones mostraron niveles comparables de expresión de TNAP en condiciones de endotoxemia. Es posible que este hecho se deba sencillamente a que se ha alcanzado un mínimo de expresión, por ejemplo porque la expresión residual corresponda a un tipo celular que no se vea afectado por la endotoxemia. Sorprendentemente, se observó exactamente el mismo perfil de expresión en el caso de las otras dos isoformas de fosfatasa alcalina, es decir, *Alpi* y *Akp3*, en respuesta a la endotoxemia, es decir, una profunda inhibición, con niveles comparables en ratones TNAP^{+/-}. Este hecho sugiere poderosamente una regulación negativa por el propio LPS o por intermediarios de la reacción inmunológica (Figura 18). De acuerdo con esto, cabe recordar que tanto *Alpi* como *Akp3* son de expresión exclusivamente epitelial, mientras que *Alpl* puede ser producido tanto por células epiteliales como por otras células de *lamina propria*. Paradójicamente, este descenso marcado de niveles de mRNA de las tres isoformas no se tradujo en una disminución paralela de la actividad enzimática, medida utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato. Esta observación es coherente con la disparidad existente entre niveles de mRNA y de actividad enzimática en múltiples tejidos, puesta de manifiesto por nuestro propio grupo, lo que sugiere una importante compensación postranscripcional. De hecho, únicamente en el riñón existe una clara correspondencia entre la expresión de *Alpl* y la actividad enzimática [32]. Esta circunstancia explica que los niveles de actividad enzimática de fosfatasa alcalina no se modifiquen sustancialmente en el hígado. Tanto en yeyuno e hígado como en plasma se observa, no obstante, una tendencia hacia una menor actividad enzimática asociada a la haplodeficiencia, y la ausencia de cambios evidentes derivados de la endotoxemia. Además de los cambios cuantitativos en la expresión de TNAP, hemos documentado indirectamente la existencia de modificaciones en el patrón de glucosilación a través de la sensibilidad al inhibidor levamisol. En este sentido, la actividad fosfatasa alcalina en plasma presentó un descenso de la inhibición por levamisol considerable asociado a la endotoxemia, tanto en ratones WT como en heterocigotos. Sin embargo, no se produjeron cambios destacables ni en hígado ni en yeyuno. Como en anteriores estudios de nuestro grupo [32], se aprecia una tendencia global a una menor sensibilidad de fosfatasa alcalina a la inhibición por levamisol, lo que refleja cambios de glucosilación. Aunque las diferentes isoformas de hueso, hígado y riñón de TNAP contienen la misma secuencia de aminoácidos, difieren en las modificaciones de glucosilación postraduccionales. Así, estas diferencias de glucosilación afectan a la actividad catalítica de las isoformas y a su sensibilidad a

inhibidores específicos. Un dato que llama poderosamente la atención es la disminución de la expresión de *Akp3* en los ratones TNAP^{+/-} con respecto a los WT en condiciones basales, es decir, el mismo perfil que mostraba la *Alpl*. Por otra parte, se observó un grado comparable de inhibición de *Akp3* en organoides de yeyuno de ratones TNAP^{+/-}, incluso en ausencia de cambios en *Alpl*. Los resultados obtenidos en este sistema experimental *in vitro* indican que el LPS no tiene efecto sobre la expresión de *Alpl* o *Alpi* en enterocitos, mientras que dio lugar a una normalización de la expresión de *Akp3* en ratones TNAP^{+/-}. Por tanto, los efectos observados *in vivo* sobre la expresión de estas isoformas no son directos sino indirectos (Figura 19). Con el fin de identificar los posibles agentes implicados se examinó el efecto de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ e IL-1 β sobre las distintas isoformas. Los resultados obtenidos demuestran que IFN- γ inhibe la expresión de *Alpi* y *Akp3*, mientras que TNF- α tiene un efecto similar pero únicamente sobre *Akp3* (el efecto sobre *Alpi* no llega a ser significativo). Por el contrario, ninguna de las tres citoquinas alteró la expresión de *Alpl* (Figura 20). En consecuencia, queda por identificar el mecanismo implicado en el descenso de esta última en la endotoxemia *in vivo*. Una posible explicación complementaria es que, dado que la *Alpl* se expresa también por células no epiteliales, la disminución se deba a una menor densidad de este tipo de células en el tejido, por ejemplo por apoptosis.

Como se ha indicado anteriormente, en esta fase de la tesis doctoral nos centramos en estudiar el papel de TNAP en macrófagos. Analizamos primeramente las células del bazo en el estudio *in vivo* de endotoxemia. Nuestros resultados indican que la población CD45+CD11b+, que se corresponde predominantemente con macrófagos, se redujo en un 50% en animales endotoxémicos, tanto WT como heterocigóticos. Es interesante destacar que estos últimos presentaron siempre porcentajes menores que los WT. Se observó que las poblaciones CD11b+CD11c+ y CD11b+CD301+ (utilizadas como marcadores de las poblaciones M1 y M2) se vieron incrementadas en ambos casos, lo que sugiere un aumento de la polarización. Estos resultados deben contrastarse con los parámetros medidos por PCR en la población CD45+CD11b+, según los cuales *Itgax* (CD11c) y *Mrc1* estaban disminuidos en animales endotoxémicos. Sin embargo, ante esta discrepancia, cabe otorgar más crédito a los cambios de expresión proteica (citometría) que los de mRNA. En todo caso, la marcada inducción de *Nos2* en animales con LPS está en consonancia con al menos un incremento en la polarización M1. La causa de la disminución de células

CD45+CD11b+ en el bazo en la respuesta a la endotoxemia no está clara. Habida cuenta de que el número de monocitos circulantes no se ve afectado, este hecho podría achacarse a un fenómeno de recirculación a otros órganos o bien a la apoptosis de los macrófagos *in situ*. Este extremo no ha sido objeto de estudio y por tanto no es posible pronunciarse en cuanto al mecanismo.

En esta misma población CD45+CD11b+ la expresión de *Alpl* parece ser muy baja en condiciones basales. Por el contrario, se incrementa ante la exposición a LPS; aunque este efecto no llegó a ser significativo debido a la gran variabilidad en el grupo TNAP^{+/-} LPS, los datos apuntan claramente en esta dirección. Esto sugiere que la TNAP participa en la respuesta inmunológica de los macrófagos, al menos en el bazo.

Conjuntamente con la *Nos2*, la población CD45+CD11b+ muestra una espectacular inducción de las citoquinas proinflamatorias *Il6* y *Cxcl10*, así como de la antiinflamatoria *Il10*. Se apreció la misma tendencia en la *Il1b*, pero sin llegar al umbral de la significación estadística. Todo ello es consistente con una gran estimulación de monocitos/macrófagos esplénicos. Cabe destacar que la producción de *Il10* fue significativamente menor en los monocitos/macrófagos de ratones TNAP^{+/-} (40%, p=0,0053). Se observó la misma tendencia en el caso de *Cxcl10*, aunque menos pronunciada (20%, p=0,1085). Este mismo perfil se manifestó en el hígado de los ratones con endotoxemia (significativo en ambos parámetros). Este hecho podría sugerir un origen monocítico común.

La respuesta de los macrófagos a la endotoxemia se estudió también en una población diferente, concretamente en macrófagos peritoneales. Esta aproximación se justifica por la existencia de diferencias fenotípicas de los monocitos/macrófagos en función del origen tisular, descritas anteriormente[208]. Estas células presentaron una producción aumentada de IL-6 en respuesta a endotoxemia. Se midió también TNF- α en estas células, pero los valores estaban por debajo del límite de detección. En este caso, se observó una disminución de la producción de IL-6 en células procedentes de ratones TNAP^{+/-} en contraste con los monocitos obtenidos del bazo. El estudio de la transducción de señal reveló que estas células presentaban una menor fosforilación de AKT, STAT3 e I κ B, lo que indica un menor grado de activación de las vías conducentes a la producción de IL-6. Por tanto, la ausencia de un alelo de *Alpl* incidió de manera diferente según el origen tisular del monocito. Estos cambios resultan especialmente llamativos si se

considera el patrón de modulación de *Il6* en el hígado en el modelo de pancreatitis aguda (asumiendo que el origen son las células de Kupffer) (Figura 17).

Con el fin de estudiar en profundidad este fenómeno procedimos a caracterizar los monocitos/macrófagos de bazo y cavidad intraperitoneal, así como procedentes de médula ósea, en ratones WT y TNAP^{+/-} (en condiciones basales). Aunque estos estudios aún no han sido completados en su totalidad, los resultados disponibles corroboran que las tres poblaciones son diferentes entre sí, y además indican que la influencia de la TNAP es asimismo diferente, en consonancia con los resultados obtenidos en macrófagos procedentes de ratones con endotoxemia. Así, los monocitos TNAP^{+/-} procedentes de médula ósea presentaron una menor producción de IL-6 en respuesta al LPS, efecto que se observa, aunque en menor grado, en macrófagos intraperitoneales, mientras que las células procedentes del bazo mostraron la tendencia inversa. Este efecto se reprodujo con la utilización de medios condicionados de células TNAP^{+/-} o WT adicionados a células WT. Este experimento indica que el efecto es achacable a factores solubles liberados por las células de origen. La ausencia de un alelo *Alpl* tuvo consecuencias igualmente en la capacidad de polarización M1 y M2. No obstante el fenotipo resultante es complejo e insuficientemente caracterizado en el momento de finalizar esta tesis doctoral. No existieron diferencias en cuanto a la capacidad proliferativa. Esta regulación puede estar relacionada en su conjunto con el diferente patrón de glucosilación de la fosfatasa alcalina en las distintas poblaciones. De hecho, nuestros datos indican que el levamisol fue capaz de inhibir la producción de IL-6 en macrófagos de bazo, pero no en macrófagos intraperitoneales o de la médula. En estos últimos incluso se observó un aumento de la producción sustancial de esta citoquina. Aunque no tenemos datos de estas poblaciones específicas, un estudio previo no publicado en el cual se caracterizó la expresión génica de macrófagos de bazo estimulados con LPS *in vivo* confirmó la expresión de *Alpl*, pero no *Akp3*, *Alpi* o fosfatasa alcalina embrionaria, en estas células. Los otros inhibidores utilizados, fenilalanina y teofilina, presentan asimismo resultados reguladores dispares en las tres poblaciones de monocitos/macrófagos estudiadas. Globalmente estos resultados indican que la fosfatasa alcalina influye en la respuesta de los monocitos/macrófagos al LPS. Esta fosfatasa alcalina es presumiblemente TNAP en el caso de los macrófagos esplénicos, y es probable que lo sea también en las demás poblaciones estudiadas. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de otras isoformas en el caso de los procedentes de médula e intraperitoneales. Cabe recordar que en todos los

casos es posible generar patrones de glucosilación diferentes a partir de un único gen (*Alpl*) en función de las condiciones de biosíntesis. En otras palabras, la actividad enzimática puede variar incluso si el gen expresado es idéntico, como ocurre de hecho en otros tejidos (detallado en la Introducción). En este sentido, la ausencia de uno de los dos alelos repercute en dicho patrón de glucosilación, como se pone de manifiesto por la sensibilidad al levamisol en los distintos órganos ([32] y esta tesis doctoral), presumiblemente porque la cinética de procesamiento postraduccional varía en función de la cantidad de proteína producida.

En definitiva, la TNAP emerge como regulador clave en el fenotipo de células inmunes y acinares (entre otras), y su función se ve influida por la haplodeficiencia de forma significativa, lo que da lugar a cambios en la susceptibilidad a la pancreatitis aguda y la endotoxemia experimental. La caracterización de los mecanismos implicados reviste por tanto gran interés potencial con vistas a la modulación terapéutica de procesos inmunopatogénicos.

CONCLUSIONES

1. Las células acinares de ratón expresan TNAP, la cual se induce en el modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína.
2. Las células acinares de ratones TNAP+/- son más sensibles a la acción de la ceruleína.
3. Los neutrófilos de ratón TNAP+/- presentan una mayor respuesta a la estimulación con LPS in vitro
4. Los ratones TNAP+/- exhiben una mayor sensibilidad a la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. El mecanismo implica una mayor respuesta inflamatoria de células acinares así como de los neutrófilos. Dado que la depleción de neutrófilos elimina gran parte de estas diferencias se deduce que este es el componente principal del fenotipo
5. La respuesta aguda a la endotoxemia en ratones se ve afectada por haplodeficiencia de TNAP. El mecanismo es complejo y se requieren estudios adicionales
6. Los monocitos de bazo expresan TNAP y su respuesta a LPS se ve modulada por inhibidores enzimáticos o por la haplodeficiencia en esta enzima
7. Los monocitos peritoneales y obtenidos de médula ósea de ratones haplodeficientes presentan una regulación diferente entre sí y respecto a los del bazo. Este hecho sugiere que la TNAP desempeña un papel importante en las tres poblaciones celulares
8. Por sus efectos inmunomoduladores sobre distintos tipos celulares, la TNAP puede constituir una diana farmacológica útil en el futuro

CONCLUSIONS

9. Mouse acinar cells express TNAP, which is induced in a caerulein induced acute pancreatitis model. Acinar cells from TNAP^{+/-} mice show higher sensitivity to caerulein injury.
10. Neutrophils from TNAP^{+/-} mice display an enhanced response to *in vitro* LPS stimulation.
11. TNAP^{+/-} mice exhibit a heightened sensitivity to caerulein induced acute pancreatitis. The mechanism involves an augmented inflammatory response of acinar cells as well as neutrophils. The observation that neutrophil depletion prevented the majority of the differences, indicates that neutrophils are the main component of the observed phenotype.
12. TNAP haplodeficiency in mouse affects the acute response to endotoxemia. The mechanism is complex and requires further investigation.
13. Spleen monocytes express TNAP and their response to LPS is modulated by enzymatic inhibitors or TNAP haplodeficiency.
14. Intraperitoneal, bone marrow and spleen monocytes from haplodeficient mice show a different regulation. These data suggest that TNAP plays an important role in the three populations.
15. Due to its immunomodulatory effects in different cell populations, TNAP may be a useful pharmacological target in the future.

ANEXOS

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALPI:	Fosfatasa alcalina intestinal
ALPL:	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
Alpl:	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
ALPP:	Fosfatasa alcalina placentaria
ALPPL2:	Fosfatasa alcalina de células germinales
AMPc:	Adenosín Monofosfato cíclico
ANKH:	Proteína homóloga del responsable de anquilosis progresiva; <i>progressive ankylosis protein homolog</i>
AP:	Fosfatasa alcalina; <i>Alkaline Phosphatase</i>
AP-1:	<i>Activating factor 1</i>
APC:	Célula presentadora de antígenos; <i>Antigen-Presenting Cell</i>
Arg1:	Arginasa-1
BMP-2:	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BPI:	<i>Bactericidal/permeability increasing protein</i>
BSA:	Albúmina sérica bovina
CASP:	<i>Colon Ascendent Stem Peritonitis</i>
CCK:	Colecistoquinina
CCR2:	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CDL:	<i>Closed Duodenal Loop</i>
cDNA:	ADN complementario
Ci:	Curio
CID:	Coagulación intravascular diseminada
CXCRCL1:	<i>Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
DAMP:	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
dIAP:	Fosfatasa alcalina intestinal tipo duodenal
dNTP:	Desoxinucleótidos
DSS:	Sulfato de dextrano sódico
EAP:	Fosfatasa alcalina embrionaria
ECAP:	Fosfatasa alcalina de <i>Escherichia coli</i>
EII:	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FBS:	Suero fetal bovino
FKHR:	<i>Forkhead box O1</i>
FMLP:	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i>
FT:	Factor tisular
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GCAP:	Fosfatasa alcalina de células germinales

G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
gIAP:	Fosfatasa alcalina intestinal tipo global
GOT:	Glutamato-oxalacetato transaminasa
GPI:	Proteína de anclaje <i>glicosil-fosfatidil-inositol</i>
GPT:	Glutamato piruvato transaminasa
Gy:	Gray
H&E:	Hematoxilina y Eosina
Hb:	Hemoglobina
HBSS:	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i>
HCT:	Hematocrito
HMGB-1:	<i>High-mobility grupo box 1 protein</i>
HPP:	Hipofosfatasa
HPRT:	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HSC:	Células madre hematopoyéticas; <i>Haematopoietic stem cells</i>
HTAB:	Bromuro de hexametiltrimetilamonio
IAP:	Fosfatasa alcalina intestinal
ICAM:	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IEC:	Células intestinales epiteliales; <i>Intestinal Epithelial Cell</i>
IECAs:	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
IFN:	Interferón
IFNAR:	<i>Type I interferon receptor</i>
IHC:	Inmunohistoquímica
IL-:	Interleuquina-
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
IRF:	<i>Interferon regulatory factors</i>
JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KLF-4:	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LBP:	Proteína de unión al LPS; <i>LPS binding protein</i>
LFA-1:	<i>Lymphocyte function antigen 1</i>
L-hArg:	L-homoarginina
LPC:	Modelo de ligado-punción cecal
L-Phe:	L-fenilalanina
LPS:	Lipopolisacárido bacteriano
M1:	Macrófagos tipo 1
M2:	Macrófagos tipo 2
M-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDP:	Muramildipéptido
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad, <i>Major Histocompatibility</i>

	<i>Complex</i>
MIF:	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP:	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MPO:	Mieloperoxidasa
Mrc1:	<i>Mannose receptor C type-1</i>
mRNA:	ARN mensajero
NAP:	Fosfatasa alcalina de neutrófilos
NEC:	Enterocolitis necrotizante
NET:	Trampas extracelulares de neutrófilos; <i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF-κB:	Factor nuclear κB
NLR:	Receptores tipo NOD
NO:	Óxido Nítrico
OD:	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos; <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
OPN:	Osteopontina
p38:	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
PA:	Pancreatitis aguda
PAMP:	Patrón molecular asociado a patógeno; <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PC-1:	<i>Plasma cell membrane glycoprotein-1</i>
PHOSPHO1:	Fosfatasa huérfana 1; <i>Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase</i>
Pi:	Fosfato inorgánico
PI3K:	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PICS:	Síndrome de inflamación, inmunosupresión y catabolismo persistente
PL:	Piridoxal
PLAF:	Factor Activador plaquetario; <i>Platelet activatin factor</i>
PLAP:	Fosfatasa alcalina placentaria
PLP:	Piridoxal fosfato
PLT:	Plaquetas
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPi:	Pirofosfato inorgánico
PR3:	<i>Proteinase 3</i>
PRR:	Receptor de reconocimiento de patrones; <i>Pattern recognition receptor</i>
PSGL-1:	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PSTI:	<i>Pancreatic secretory trypsin inhibitor</i>
RAGE:	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
RANTES:	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RBC:	Hematíes

RLR:	Receptores tipo RIG-1
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR:	<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SBTI:	Inhibidor de la tripsina de la soja; <i>Soybean trypsin inhibitor</i>
SDS:	Dodecil Sulfato de sodio
SI:	Sistema inmunológico
SIRS:	Respuesta inflamatoria sistémica
SLP:	<i>Surfactant-like particles</i>
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple
SOCS:	<i>Supressor of cytokine signaling</i>
SOFA:	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SRC:	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
STAT:	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SYK:	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TCA:	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGF- β :	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR:	Receptores tipo Toll; <i>Toll Like Receptor</i>
TNAP:	Fosfatasa alcalina no específica de tejido; <i>Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase</i>
TNBS:	Ácido Trinitrobenceno Sulfónico
TNF:	Factor de necrosis tumoral; <i>Tumoral Necrosis Factor</i>
Tre :	Células T reguladoras
TRIF:	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
VSCMs:	Células del músculo liso vascular; <i>Vascular smooth muscle cells</i>
y col.:	y colaboradores

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de la nomenclatura génica, nombre común, distribución tisular y localización cromosómica de las distintas isoformas de fosfatasa alcalina en humano y ratón.....	28
Tabla 2. Principales tipos de receptores del sistema inmune innato.....	48
Tabla 3. Funciones de los monocitos en condiciones estables y en inflamación	49
Tabla 4. Composición y características de los gránulos de los neutrófilos, en orden de liberación tras su activación	57
Tabla 5. Clasificación de los distintos grados de severidad de la pancreatitis aguda	61
Tabla 6. Criterios SOFA para el diagnóstico de sepsis	72
Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.	111

3. INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Organización genómica del gen humano de <i>ALPL</i>	29
Esquema 2. Representación del anclaje de la AP con la molécula de GPI.	33
Esquema 3. Destoxificación del LPS a nivel intestinal	36
Esquema 4. Representación esquemática de los agentes claves en la mineralización ósea y su regulación.	38
Esquema 5. Características básicas de los fenotipos M1 y M2.....	54
Esquema 6. Vías de señalización implicadas en la polarización M1/M2.....	55
Esquema 7. Esquema de la migración y activación del neutrófilo	58
Esquema 8. Mecanismos de la inmunidad innata implicados en la pancreatitis aguda	65
Esquema 9. Respuesta características de la sepsis	80
Esquema 10. Adaptación o “ <i>re-programming</i> ” de los macrófagos durante la sepsis	82
Esquema 11. Diseño experimental en el modelo de pancreatitis aguda por administración intraperitoneal de ceruleína.....	95

4. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología del páncreas.	118
Figura 2. Expresión de diversos genes relacionados con la pancreatitis.	119
Figura 3. Determinaciones plasmáticas en el modelo de pancreatitis aguda por ceruleína.	120
Figura 4. Análisis hematológico de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína.	121
Figura 5. Medida de parámetros relacionados con el daño hepático.	122
Figura 6. Medida de parámetros relacionados con la función barrera intestinal.	123
Figura 7. Quimioquinas y moléculas de adhesión analizadas en el páncreas.	124
Figura 8. Expresión de citoquinas en el páncreas.	125
Figura 9. Expresión de marcadores de inflamación en acinos procedentes de ratones con pancreatitis aguda.	127
Figura 10. Estimulación <i>in vitro</i> de células acinares con ceruleína.	128
Figura 11. Efecto de la administración de levamisol sobre la expresión génica.	129
Figura 12. Infiltración de neutrófilos en el páncreas y estudio de la respuesta de los neutrófilos <i>in vitro</i>	131
Figura 13. Efecto de la depleción de los neutrófilos sobre el desarrollo de la pancreatitis aguda inducida por ceruleína.	132
Figura 14. Estudio hematológico de ratones WT y TNAP ^{+/-} del experimento de sepsis inducida por LPS.	134
Figura 15. Determinación de parámetros clínicos y plasmáticos relacionados con la sepsis.	135
Figura 16. Análisis de genes en el hígado en el modelo de sepsis por LPS.	136
Figura 17. Determinación de citoquinas en hígado.	137
Figura 18. Expresión de las isoformas de AP en yeyuno.	138
Figura 19. Determinación de la expresión de las isoformas de AP en organoides estimulados <i>in vitro</i> con LPS.	139
Figura 20. Efecto de las citoquinas sobre la expresión de las distintas isoformas de AP en organoides de yeyuno.	140

Figura 21. Expresión de proteínas de unión estrecha en el yeyuno de ratones WT y TNAP ^{+/-} ..	141
Figura 22. Genes implicados en la señalización del LPS.....	141
Figura 23. Estudio de la actividad AP..	142
Figura 24. Perfil de inhibición de la actividad AP en respuesta al levamisol.....	143
Figura 25. Estudio de citoquinas en plasma.	144
Figura 26. Análisis por citometría de flujo de las células del bazo.....	145
Figura 27. Análisis de diversos genes en macrófagos del bazo..	146
Figura 28. Estudio de la expresión de genes en macrófagos del bazo.	147
Figura 29. Producción de IL-6 por parte de macrófagos intraperitoneales.....	148
Figura 30. Evaluación de vías de señalización relacionadas con la inflamación...	149
Figura 31. Medidas de proliferación <i>in vitro</i>	151
Figura 32. Producción de IL-6 <i>in vitro</i>	151
Figura 33. Estimulación de macrófagos WT con medios condicionados.	153
Figura 34. Inhibición <i>in vitro</i> de TNAP.....	155
Figura 35. Polarización de macrófagos WT y TNAP ^{+/-} hacia M1.	156
Figura 36. Polarización de macrófagos WT y TNAP ^{+/-} hacia M2.	157

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
2. Millan, J.L. and M.P. Whyte, *Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia*. Calcif Tissue Int, 2016. **98**(4): p. 398-416.
3. Weiss, M.J., et al., *A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(20): p. 7666-9.
4. Poelstra, K., et al., *Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo*. Am. J. Pathol., 1997. **151**(4): p. 1163-1169.
5. Hanics, J., et al., *Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(2): p. 459-71.
6. Kermer, V., et al., *Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation*. Neurosci Lett, 2010. **485**(3): p. 208-11.
7. Street, S.E., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord*. J Neurosci, 2013. **33**(27): p. 11314-22.
8. Narisawa, S., et al., *Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7525-30.
9. Akiba, Y., et al., *Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(6): p. G1223-33.
10. Mizumori, M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 14): p. 3651-63.
11. Bates, J.M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 371-82.
12. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008. **105**(9): p. 3551-3556.
13. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota*. Gut, 2010. **59**(11): p. 1476-84.
14. Kaliannan, K., et al., *Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 7003-8.
15. Martinez-Moya, P., et al., *Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 144-53.
16. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
17. Lopez-Posadas, R., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(2): p. 543-56.
18. Hernandez-Mosqueira, C., C. Velez-delValle, and W. Kuri-Harcuch, *Tissue alkaline phosphatase is involved in lipid metabolism and gene expression and secretion of adipokines in adipocytes*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(12): p. 2485-96.
19. van Dijk, S.M., et al., *Acute pancreatitis: recent advances through randomised trials*. Gut, 2017. **66**(11): p. 2024-2032.

20. Spanier, B.W., M.G. Dijkgraaf, and M.J. Bruno, *Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008. **22**(1): p. 45-63.
21. Manohar, M., et al., *Food-Induced Acute Pancreatitis*. Dig Dis Sci, 2017. **62**(12): p. 3287-3297.
22. Shamoon, M., et al., *Therapeutic implications of innate immune system in acute pancreatitis*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(1): p. 73-87.
23. Yang, Z.W., X.X. Meng, and P. Xu, *Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(11): p. 2513-20.
24. Shrivastava, P. and M. Bhatia, *Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(32): p. 3995-4002.
25. Steele, C.W., et al., *CXCR2 inhibition suppresses acute and chronic pancreatic inflammation*. J Pathol, 2015. **237**(1): p. 85-97.
26. Capurso, G., et al., *Role of the gut barrier in acute pancreatitis*. J Clin Gastroenterol, 2012. **46** Suppl: p. S46-51.
27. Gotts, J.E. and M.A. Matthay, *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. BMJ, 2016. **353**: p. i1585.
28. Cavaillon, J.M. and M. Adib-Conquy, *Monocytes/macrophages and sepsis*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S506-9.
29. Marquez, C., et al., *Expression of alkaline phosphatase in murine B lymphocytes. Correlation with B cell differentiation into Ig secretion*. J Immunol, 1989. **142**(9): p. 3187-92.
30. Bauer, J. and V. Kachel, *The increase of electrophoretic mobility and alkaline phosphatase activity are parallel events during B-cell maturation*. Immunol Invest, 1990. **19**(1): p. 57-68.
31. Tsuruta, T., et al., *Alkaline phosphatase, defensin gene expression and effect of myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells*. Leuk Lymphoma, 1999. **32**(3-4): p. 237-47.
32. Hernandez-Chirlaque, C., et al., *Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase Expression is Needed for the Full Stimulation of T Cells and T Cell-Dependent Colitis*. J Crohns Colitis, 2017. **11**(7): p. 857-870.
33. Hoylaerts, M.F., T. Manes, and J.L. Millan, *Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase*. Biochem J, 1992. **286** (Pt 1): p. 23-30.
34. Henthorn, P.S., et al., *Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1234-8.
35. Knoll, B.J., K.N. Rothblum, and M. Longley, *Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. Evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 12020-7.
36. Millan, J.L. and T. Manes, *Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 3024-8.
37. Griffin, C.A., et al., *Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37*. Am J Hum Genet, 1987. **41**(6): p. 1025-34.
38. Martin, D., et al., *The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37*. Ann Hum Genet, 1987. **51**(Pt 2): p. 145-52.
39. Buchet, R., J.L. Millan, and D. Magne, *Multisystemic functions of alkaline phosphatases*. Methods Mol Biol, 2013. **1053**: p. 27-51.
40. Kishi, F., S. Matsuura, and T. Kajii, *Nucleotide sequence of the human liver-type alkaline phosphatase cDNA*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(5): p. 2129.

41. Weiss, M.J., et al., *Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7182-6.
42. Matsuura, S., F. Kishi, and T. Kajii, *Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 993-1000.
43. Studer, M., et al., *Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(3): p. 1352-60.
44. Terao, M., et al., *Mapping of gene encoding mouse placental alkaline phosphatase to chromosome 4*. Somat Cell Mol Genet, 1988. **14**(2): p. 211-5.
45. Manes, T., et al., *Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes*. Genomics, 1990. **8**(3): p. 541-54.
46. Narisawa, S., et al., *A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1068-77.
47. Komoda, T., et al., *Ontogenic and phylogenetic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development*. Gastroenterology, 1986. **91**(2): p. 277-86.
48. Merchant-Larios, H., F. Mendlovic, and A. Alvarez-Buylla, *Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse*. Differentiation, 1985. **29**(2): p. 145-51.
49. MacGregor, G.R., B.P. Zambrowicz, and P. Soriano, *Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells*. Development, 1995. **121**(5): p. 1487-96.
50. Narisawa, S., et al., *Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse*. Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 227-35.
51. Hoshi, K., et al., *Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice*. Histochem Cell Biol, 1997. **107**(3): p. 183-91.
52. Fonta, C., et al., *Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission*. Cereb Cortex, 2004. **14**(6): p. 595-609.
53. Langer, D., et al., *Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited*. Cell Tissue Res, 2008. **334**(2): p. 199-217.
54. Brun-Heath, I., et al., *Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(3): p. 521-36.
55. Eliakim, R., et al., *Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. G425-34.
56. Shao, J.S., et al., *Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach*. Microsc Res Tech, 2000. **51**(2): p. 121-8.
57. Sato, N., Y. Takahashi, and S. Asano, *Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes*. Blood, 1994. **83**(4): p. 1093-101.
58. Heath, J.K., et al., *Retinoic acid stimulates transcriptional activity from the alkaline phosphatase promoter in the immortalized rat calvarial cell line, RCT-1*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(4): p. 636-46.
59. Scheibe, R.J., I. Moeller-Runge, and W.H. Mueller, *Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21300-5.

60. Escalante-Alcalde, D., et al., *Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression*. Mech Dev, 1996. **57**(1): p. 21-32.
61. Zernik, J., B. Kream, and K. Twarog, *Tissue-specific and dexamethasone-inducible expression of alkaline phosphatase from alternative promoters of the rat bone/liver/kidney/placenta gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **176**(3): p. 1149-56.
62. Gianni, M., et al., *Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 1): p. 67-77.
63. Orimo, H. and T. Shimada, *Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-trans-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line*. Bone, 2005. **36**(5): p. 866-76.
64. Orimo, H.S.T., *Posttranscriptional modulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in MG-63 osteoblastic osteosarcoma cells*. Nutrition Research, 2006. **26**(5): p. 227-234.
65. Hatta, M., et al., *Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR*. Int J Mol Med, 2002. **9**(2): p. 147-52.
66. Yusa, N., et al., *Transcription factor Sp3 activates the liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase promoter in hematopoietic cells*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(5): p. 772-7.
67. Sowa, H., et al., *Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36024-31.
68. Sowa, H., et al., *Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(7): p. 1190-9.
69. Rawadi, G., et al., *BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(10): p. 1842-53.
70. Fakhry, M., et al., *TNAP stimulates vascular smooth muscle cell trans-differentiation into chondrocytes through calcium deposition and BMP-2 activation: Possible implication in atherosclerotic plaque stability*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1863**(3): p. 643-653.
71. Lee, H.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 1087-92.
72. Lencel, P., et al., *Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification*. Lab Invest, 2011. **91**(10): p. 1434-42.
73. Hahnel, A.C., et al., *Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo*. Development, 1990. **110**(2): p. 555-64.
74. Hustin, J., J. Collette, and P. Franchimont, *Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours*. Int J Androl, 1987. **10**(1): p. 29-35.
75. Pesce, M., F.G. Klinger, and M. De Felici, *Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling*. Mech Dev, 2002. **112**(1-2): p. 15-24.
76. Chang, C.H., D. Angellis, and W.H. Fishman, *Presence of the rare D-variant heat-stable, placental-type alkaline phosphatase in normal human testis*. Cancer Res, 1980. **40**(5): p. 1506-10.
77. Goldstein, D.J., C. Rogers, and H. Harris, *A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus*. Clin Chim Acta, 1982. **125**(1): p. 63-75.

78. Fishman, L., et al., *Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzymes of human placenta and their occurrence in human cancer*. *Cancer Res*, 1976. **36**(7 pt 1): p. 2268-73.
79. Beckman, G., et al., *Placental alkaline phosphatase types and transplacental IgG transport*. *Hum Hered*, 1995. **45**(1): p. 1-5.
80. Fishman, W.H., *Immunology and biochemistry of the Regan isoenzyme*. *Prostate*, 1980. **1**(4): p. 399-410.
81. Prakash, U.N. and K. Srinivasan, *Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats*. *Br J Nutr*, 2010. **104**(1): p. 31-9.
82. Martin, L., et al., *Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc*. *Arch Anim Nutr*, 2013. **67**(3): p. 248-61.
83. Sogabe, N., et al., *Enhancement effects of vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2007. **53**(3): p. 219-24.
84. Sogabe, N., et al., *Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats*. *Bone*, 2004. **35**(1): p. 249-55.
85. Mineo, H., et al., *Ingestion of potato starch containing esterified phosphorus increases alkaline phosphatase activity in the small intestine in rats*. *Nutr Res*, 2010. **30**(5): p. 341-7.
86. Strom, M., J. Krisinger, and H.F. DeLuca, *Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1090**(3): p. 299-304.
87. Yeh, K., et al., *Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes*. *Biochem J*, 1994. **301** (Pt 3): p. 893-9.
88. Alkhoury, F., et al., *Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. **289**(2): p. G285-90.
89. Shin, J., et al., *The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like factor 5 (KLF5)-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(36): p. 25306-16.
90. Malo, M.S., et al., *The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression*. *DNA Cell Biol*, 2006. **25**(12): p. 684-95.
91. Le Du, M.H., et al., *Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 9158-65.
92. Xu, X. and E.R. Kantrowitz, *A water-mediated salt link in the catalytic site of Escherichia coli alkaline phosphatase may influence activity*. *Biochemistry*, 1991. **30**(31): p. 7789-96.
93. Zalatan, J.G., T.D. Fenn, and D. Herschlag, *Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion*. *J Mol Biol*, 2008. **384**(5): p. 1174-89.
94. Le Du, M.H. and J.L. Millan, *Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49808-14.
95. Kozlenkov, A., et al., *Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22992-9.

96. Tsonis, P.A., W.S. Argraves, and J.L. Millan, *A putative functional domain of human placental alkaline phosphatase predicted from sequence comparisons*. *Biochem J*, 1988. **254**(2): p. 623-4.
97. Ghosh, K., et al., *Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase--role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases*. *J Struct Biol*, 2013. **184**(2): p. 182-92.
98. Martins, M.J., M.R. Negrao, and C. Hipolito-Reis, *Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated*. *Clin Biochem*, 2001. **34**(6): p. 463-8.
99. Halling Linder, C., et al., *Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms*. *Bone*, 2009. **45**(5): p. 987-93.
100. Low, M.G. and A.R. Saltiel, *Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes*. *Science*, 1988. **239**(4837): p. 268-75.
101. Gamage, D.G. and T.L. Hendrickson, *GPI transamidase and GPI anchored proteins: oncogenes and biomarkers for cancer*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013. **48**(5): p. 446-64.
102. Poelstra, K., et al., *Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(4): p. 1163-9.
103. Bobryshev, Y.V., et al., *Role of bone-type tissue-nonspecific alkaline phosphatase and PHOSPO1 in vascular calcification*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(37): p. 5821-8.
104. Azpiazu, D., et al., *Role of pyrophosphate in vascular calcification in chronic kidney disease*. *Nefrologia*, 2017.
105. Wilson, P.D., G.P. Smith, and T.J. Peters, *Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils*. *Histochem J*, 1983. **15**(3): p. 257-64.
106. Whyte, M.P., et al., *Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism*. *J Clin Invest*, 1985. **76**(2): p. 752-6.
107. Say, J.C., et al., *Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1074**(2): p. 256-62.
108. Kumar, V. and A. Sharma, *Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **616**(1-3): p. 7-15.
109. Pettengill, M., et al., *Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(38): p. 27315-26.
110. Moss, A.K., et al., *Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. **304**(6): p. G597-604.
111. Tuin, A., et al., *On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(2): p. G377-85.
112. Kapojos, J.J., et al., *Induction of glomerular alkaline phosphatase after challenge with lipopolysaccharide*. *Int J Exp Pathol*, 2003. **84**(3): p. 135-44.
113. Glogowski, J., D.R. Danforth, and A. Ciereszko, *Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline*. *J Androl*, 2002. **23**(6): p. 783-92.
114. Kozlenkov, A., et al., *Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(11): p. 1862-72.
115. Hussein, A., et al., *Theophylline stimulates cAMP-mediated signaling associated with growth regulation in human cells from pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelia*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(1): p. 155-60.

116. Vang, T., et al., *Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 497-507.
117. Lin, C.W. and W.H. Fishman, *L-Homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3082-7.
118. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(10): p. G826-38.
119. Fishman, W.H. and H.G. Sie, *Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L homoarginine*. Enzymologia, 1971. **41**(3): p. 141-67.
120. Harris, H., *The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know*. Clin Chim Acta, 1990. **186**(2): p. 133-50.
121. Glickman, R.M., et al., *Increased lymph alkaline phosphatase after fat feeding: effects of medium chain triglycerides and inhibition of protein synthesis*. Biochim Biophys Acta, 1970. **201**(2): p. 226-35.
122. Hodin, R.A., et al., *Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 1): p. G83-9.
123. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3551-6.
124. Nakano, T., et al., *Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1439-49.
125. Lynes, M., et al., *Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(6): p. R1738-47.
126. Lynes, M.D. and E.P. Widmaier, *Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet*. Life Sci, 2011. **88**(9-10): p. 384-91.
127. Tran, T.T., et al., *Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 25201-10.
128. Kaunitz, J.D. and Y. Akiba, *Purinergic regulation of duodenal surface pH and ATP concentration: implications for mucosal defence, lipid uptake and cystic fibrosis*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **201**(1): p. 109-16.
129. Fawley, J., et al., *Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to dysbiosis and bacterial translocation in the newborn intestine*. J Surg Res, 2017. **218**: p. 35-42.
130. Chen, K.T., et al., *Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(2): p. G467-75.
131. Jerala, R., *Structural biology of the LPS recognition*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(5): p. 353-63.
132. Trent, M.S., *Biosynthesis, transport, and modification of lipid A*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 71-86.
133. Huizinga, R., et al., *Endotoxin- and ATP-neutralizing activity of alkaline phosphatase as a strategy to limit neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 266.
134. Kats, S., et al., *Prophylactic treatment with alkaline phosphatase in cardiac surgery induces endogenous alkaline phosphatase release*. Int J Artif Organs, 2012. **35**(2): p. 144-51.
135. Ebrahimi, F., et al., *Local peritoneal irrigation with intestinal alkaline phosphatase is protective against peritonitis in mice*. J Gastrointest Surg, 2011. **15**(5): p. 860-9.

136. Wilkes, J.M., A. Garner, and T.J. Peters, *Studies on the localization and properties of rat duodenal HCO₃⁻-ATPase with special relation to alkaline phosphatase*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. **924**(1): p. 159-66.
137. Hessele, L., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(14): p. 9445-9.
138. Harmey, D., et al., *Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(4): p. 1199-209.
139. Ho, A.M., M.D. Johnson, and D.M. Kingsley, *Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis*. *Science*, 2000. **289**(5477): p. 265-70.
140. Yadav, M.C., et al., *Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification*. *J Bone Miner Res*, 2011. **26**(2): p. 286-97.
141. Narisawa, S., M.C. Yadav, and J.L. Millan, *In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin*. *J Bone Miner Res*, 2013. **28**(7): p. 1587-98.
142. Orimo, H., *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease*. *J Nippon Med Sch*, 2010. **77**(1): p. 4-12.
143. Demirbilek, H., et al., *Hypophosphatasia presenting with pyridoxine-responsive seizures, hypercalcemia, and pseudotumor cerebri: case report*. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2012. **4**(1): p. 34-8.
144. Amadasi, A., et al., *Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents*. *Curr Med Chem*, 2007. **14**(12): p. 1291-324.
145. Narisawa, S., C. Wennberg, and J.L. Millan, *Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization*. *J Pathol*, 2001. **193**(1): p. 125-33.
146. Waymire, K.G., et al., *Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6*. *Nat Genet*, 1995. **11**(1): p. 45-51.
147. Sebastian-Serrano, A., et al., *Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Regulates Purinergic Transmission in the Central Nervous System During Development and Disease*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2015. **13**: p. 95-100.
148. Millan, J.L., *What Can We Learn About the Neural Functions of TNAP from Studies on Other Organs and Tissues?* *Subcell Biochem*, 2015. **76**: p. 155-66.
149. Fonta, C., et al., *Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex*. *J Comp Neurol*, 2005. **486**(2): p. 179-96.
150. Diez-Zaera, M., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(7): p. 1014-24.
151. Diaz-Hernandez, M., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(42): p. 32539-48.
152. Vardy, E.R., et al., *Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease*. *Neurodegener Dis*, 2012. **9**(1): p. 31-7.
153. Diaz-Hernandez, M., et al., *TNAP Plays a Key Role in Neural Differentiation as well as in Neurodegenerative Disorders*. *Subcell Biochem*, 2015. **76**: p. 375-85.
154. Hori, Y., et al., *Impaired transport of lipopolysaccharide across the hepatocytes in rats with cerulein-induced experimental pancreatitis*. *Pancreas*, 1998. **16**(2): p. 148-53.
155. Baumann, J.M., et al., *The role of inhibitors and other factors in the pathogenesis of recurrent calcium-containing renal stones*. *Clin Sci Mol Med*, 1977. **53**(2): p. 141-8.

156. Savinov, A.Y., et al., *Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification*. J Am Heart Assoc, 2015. **4**(12).
157. Narisawa, S., et al., *Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(11): p. 1700-10.
158. Kim, M.K., et al., *Serum alkaline phosphatase, body composition, and risk of metabolic syndrome in middle-aged Korean*. Endocr J, 2013. **60**(3): p. 321-8.
159. Gomez-Zorita, S., et al., *Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress*. Br J Nutr, 2012. **107**(2): p. 202-10.
160. Ali, A.T., et al., *The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue*. Ann Clin Biochem, 2006. **43**(Pt 3): p. 207-13.
161. Ali, A.T., et al., *Ethnic differences in pre-adipocyte intracellular lipid accumulation and alkaline phosphatase activity*. Clin Chim Acta, 2015. **438**: p. 382-7.
162. Burg, D.L. and T.L. Feldbush, *Late events in B cell activation. Expression of membrane alkaline phosphatase activity*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 381-7.
163. Latheef, S.A., et al., *Differential expression of alkaline phosphatase gene in proliferating primary lymphocytes and malignant lymphoid cell lines*. Immunol Lett, 2016. **170**: p. 37-41.
164. Hossain, A. and L.K. Jung, *Expression of bone specific alkaline phosphatase on human B cells*. Cell Immunol, 2008. **253**(1-2): p. 66-70.
165. Borregaard, N., et al., *Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(1): p. 80-7.
166. Tuin, A., et al., *Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats*. Gut, 2009. **58**(3): p. 379-87.
167. Lukas, M., et al., *Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(7): p. 1180-6.
168. Biesterveld, B.E., et al., *Intestinal alkaline phosphatase to treat necrotizing enterocolitis*. J Surg Res, 2015. **196**(2): p. 235-40.
169. Rentea, R.M., et al., *Radiation-induced changes in intestinal and tissue-nonspecific alkaline phosphatase: implications for recovery after radiation therapy*. Am J Surg, 2016. **212**(4): p. 602-608.
170. Alam, S.N., et al., *Intestinal alkaline phosphatase prevents antibiotic-induced susceptibility to enteric pathogens*. Ann Surg, 2014. **259**(4): p. 715-22.
171. Heemskerk, S., et al., *Alkaline phosphatase treatment improves renal function in severe sepsis or septic shock patients*. Crit Care Med, 2009. **37**(2): p. 417-23, e1.
172. Tunjungputri, R.N., et al., *Human recombinant alkaline phosphatase inhibits ex vivo platelet activation in humans*. Thromb Haemost, 2016. **116**(6): p. 1111-1121.
173. Peters, E., et al., *Effects of a human recombinant alkaline phosphatase during impaired mitochondrial function in human renal proximal tubule epithelial cells*. Eur J Pharmacol, 2016. **796**: p. 149-157.
174. Whyte, M.P., et al., *Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia*. JCI Insight, 2016. **1**(9): p. e85971.
175. Whyte, M.P., et al., *Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(1): p. 334-42.
176. Millan, J.L. and H. Plotkin, *Hypophosphatasia - pathophysiology and treatment*. Actual osteol, 2012. **8**(3): p. 164-182.
177. Scott, L.J., *Asfotase Alfa in Perinatal/Infantile-Onset and Juvenile-Onset Hypophosphatasia: A Guide to Its Use in the USA*. BioDrugs, 2016. **30**(1): p. 41-8.

178. Zywicki, M.E., et al., *Impact of the ovarian cycle and pregnancy on plasma chemistry values in ewes*. J Vet Diagn Invest, 2018. **30**(2): p. 238-244.
179. Turan, S., et al., *Serum alkaline phosphatase levels in healthy children and evaluation of alkaline phosphatase z-scores in different types of rickets*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2011. **3**(1): p. 7-11.
180. Verma, J. and D.A. Gorard, *Persistently elevated alkaline phosphatase*. BMJ Case Rep, 2012. **2012**.
181. Moss, D.W., *Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes*. Clin Biochem, 1987. **20**(4): p. 225-30.
182. Pollock, G. and G.Y. Minuk, *Diagnostic considerations for cholestatic liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2017. **32**(7): p. 1303-1309.
183. Werner de Castro, G.R., et al., *Inflammatory cytokines in Paget's disease of bone*. Int Immunopharmacol, 2014. **18**(2): p. 277-81.
184. Cole, D.E. and M.D. Thompson, *Neurogenetic Aspects of Hyperphosphatasia in Mabry Syndrome*. Subcell Biochem, 2015. **76**: p. 343-61.
185. McKiernan, F.E., et al., *Acute hypophosphatasemia*. Osteoporos Int, 2014. **25**(2): p. 519-23.
186. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 432-46.
187. Aigner, B., et al., *Generation of N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse mutants with deviations in plasma enzyme activities as novel organ-specific disease models*. Exp Physiol, 2009. **94**(4): p. 412-21.
188. Hough, T.A., et al., *Novel mouse model of autosomal semidominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene Akp2*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(9): p. 1397-407.
189. Narisawa, S., *Genetically Modified Mice for Studying TNAP Function*. Subcell Biochem, 2015. **76**: p. 45-57.
190. Giachelli, C.M., *Vascular calcification mechanisms*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 2959-64.
191. Sheen, C.R., et al., *Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(5): p. 824-36.
192. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
193. Warrington, R., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011. **7 Suppl 1**: p. S1.
194. Fusunyan, R.D., et al., *Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes*. Pediatr Res, 2001. **49**(4): p. 589-93.
195. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S24-32.
196. Prame Kumar, K., A.J. Nicholls, and C.H.Y. Wong, *Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(3): p. 551-565.
197. Alberts, B.J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Innate Immunity*, in *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. 2002, Garland Science: New York.
198. Land, W.G., *The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2015. **15**(2): p. e157-70.
199. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.

200. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
201. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
202. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
203. Kratofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(1): p. 35-42.
204. Swirski, F.K., I. Hilgendorf, and C.S. Robbins, *From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(2): p. 137-48.
205. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
206. Jakubzick, C., et al., *Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 599-610.
207. Gordon, S. and A. Pluddemann, *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 53.
208. Wang, C., et al., *Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum*. BMC Immunol, 2013. **14**: p. 6.
209. Zhao, Y.L., et al., *Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow*. J Zhejiang Univ Sci B, 2017. **18**(12): p. 1055-1063.
210. Bain, C.C., et al., *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. Nat Immunol, 2014. **15**(10): p. 929-937.
211. Hoeffel, G. and F. Ginhoux, *Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages*. Cell Immunol, 2018.
212. Helming, L., *Inflammation: cell recruitment versus local proliferation*. Curr Biol, 2011. **21**(14): p. R548-50.
213. Mantovani, A.G., M. R.; Allavena, P.; Sica, A., *Tumor-associated Macrophages in Cancer Growth and Progression*, in *Cancer Immunotherapy*, G.J. Prendergast, E., Editor. 2007, Elsevier.
214. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 614.
215. van Stijn, C.M., et al., *Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response*. FASEB J, 2015. **29**(2): p. 636-49.
216. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
217. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
218. Na, Y.R., S. Je, and S.H. Seok, *Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer*. Cancer Lett, 2018. **413**: p. 46-58.
219. Van den Bossche, J. and D.L. Saraber, *Metabolic regulation of macrophages in tissues*. Cell Immunol, 2018.
220. O'Neill, L.A., R.J. Kishton, and J. Rathmell, *A guide to immunometabolism for immunologists*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(9): p. 553-65.
221. Ivashkiv, L.B., *Epigenetic regulation of macrophage polarization and function*. Trends Immunol, 2013. **34**(5): p. 216-23.
222. Das, A., et al., *Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration*. Am J Pathol, 2015. **185**(10): p. 2596-606.

223. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death*. *J Innate Immun*, 2010. **2**(3): p. 204-15.
224. Sugimoto, M.A., et al., *Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?* *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 160.
225. Ortega-Gomez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein, *Resolution of inflammation: an integrated view*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(5): p. 661-74.
226. Logie, C. and H.G. Stunnenberg, *Epigenetic memory: A macrophage perspective*. *Semin Immunol*, 2016. **28**(4): p. 359-67.
227. Bordon, Y., *Macrophages: innate memory training*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(11): p. 713.
228. Eruslanov, E.B., S. Singhal, and S.M. Albelda, *Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap*. *Trends Cancer*, 2017. **3**(2): p. 149-160.
229. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Granulopoiesis and granules of human neutrophils*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 11-28.
230. Yin, C. and B. Heit, *Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules*. *Cell Tissue Res*, 2018. **371**(3): p. 455-471.
231. Teng, T.S., et al., *Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered*. *J Immunol Res*, 2017. **2017**: p. 9671604.
232. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 459-89.
233. Winterbourn, C.C., A.J. Kettle, and M.B. Hampton, *Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 765-92.
234. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(3): p. e1004651.
235. Nguyen, G.T., E.R. Green, and J. Meccas, *Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 373.
236. Lim, J.J., S. Grinstein, and Z. Roth, *Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 191.
237. Delgado-Rizo, V., et al., *Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 81.
238. Gupta, S. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases*. *Nat Rev Nephrol*, 2016. **12**(7): p. 402-13.
239. Yu, Y. and K. Su, *Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus*. *J Clin Cell Immunol*, 2013. **4**.
240. Filippi, M.D., *Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route*. *Adv Immunol*, 2016. **129**: p. 25-53.
241. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
242. Petri, B. and M.J. Sanz, *Neutrophil chemotaxis*. *Cell Tissue Res*, 2018. **371**(3): p. 425-436.
243. Wantha, S., et al., *Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes*. *Circ Res*, 2013. **112**(5): p. 792-801.
244. Selders, G.S., et al., *An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration*. *Regen Biomater*, 2017. **4**(1): p. 55-68.
245. Wu, D., et al., *Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 20545.
246. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(6): p. 378-91.

247. Deniset, J.F. and P. Kubes, *Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states?* J Leukoc Biol, 2018.
248. Kobayashi, Y., *Neutrophil biology: an update.* EXCLI J, 2015. **14**: p. 220-7.
249. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond.* J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
250. Nesvaderani, M., et al., *Epidemiology, aetiology and outcomes of acute pancreatitis: A retrospective cohort study.* Int J Surg, 2015. **23**(Pt A): p. 68-74.
251. Roberts, S.E., et al., *The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe.* Pancreatology, 2017. **17**(2): p. 155-165.
252. Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, and T. Sullivan, *The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis.* Curr Gastroenterol Rep, 2009. **11**(2): p. 97-103.
253. Foster, B.R., et al., *Revised Atlanta Classification for Acute Pancreatitis: A Pictorial Essay.* Radiographics, 2016. **36**(3): p. 675-87.
254. Banks, P.A., et al., *Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus.* Gut, 2013. **62**(1): p. 102-11.
255. Petrov, M.S. and J.A. Windsor, *Classification of the severity of acute pancreatitis: how many categories make sense?* Am J Gastroenterol, 2010. **105**(1): p. 74-6.
256. Lankisch, P.G., et al., *Acute pancreatitis: does gender matter?* Dig Dis Sci, 2001. **46**(11): p. 2470-4.
257. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer.* Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1252-61.
258. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review.* Pancreas, 2006. **33**(4): p. 323-30.
259. Ho, U.C., C.F. Mu, and C.Y. Hsu, *Ethnic differences in risk factors of acute pancreatitis.* Ethn Health, 2018. **23**(3): p. 321-328.
260. Whitcomb, D.C., *Genetic risk factors for pancreatic disorders.* Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1292-302.
261. Ravi Kanth, V. and D. Nageshwar Reddy, *Genetics of acute and chronic pancreatitis: An update.* World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(4): p. 427-37.
262. Premkumar, R., et al., *The clinical relevance of obesity in acute pancreatitis: targeted systematic reviews.* Pancreatology, 2015. **15**(1): p. 25-33.
263. Martinez, J., et al., *Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis.* Pancreatology, 2004. **4**(1): p. 42-8.
264. Gonzalez-Perez, A., R.G. Schlienger, and L.A. Rodriguez, *Acute pancreatitis in association with type 2 diabetes and antidiabetic drugs: a population-based cohort study.* Diabetes Care, 2010. **33**(12): p. 2580-5.
265. Noel, R.A., et al., *Increased risk of acute pancreatitis and biliary disease observed in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study.* Diabetes Care, 2009. **32**(5): p. 834-8.
266. Sadr-Azodi, O., et al., *Patients with celiac disease have an increased risk for pancreatitis.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2012. **10**(10): p. 1136-1142 e3.
267. Antonini, F., et al., *Pancreatic disorders in inflammatory bowel disease.* World J Gastrointest Pathophysiol, 2016. **7**(3): p. 276-82.
268. Carr, R.A., et al., *Systematic review of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A more virulent etiology?* Pancreatology, 2016. **16**(4): p. 469-76.
269. Pedersen, S.B., A. Langsted, and B.G. Nordestgaard, *Nonfasting Mild-to-Moderate Hypertriglyceridemia and Risk of Acute Pancreatitis.* JAMA Intern Med, 2016. **176**(12): p. 1834-1842.
270. Malik, A.M., *Acute pancreatitis. A more common and severe complication of gallstones in males.* Int J Health Sci (Qassim), 2015. **9**(2): p. 141-5.

271. Barreto, S.G., *How does cigarette smoking cause acute pancreatitis?* Pancreatology, 2016. **16**(2): p. 157-63.
272. Ye, X., et al., *Impact of smoking on the risk of pancreatitis: a systematic review and meta-analysis.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124075.
273. Herreros-Villanueva, M., et al., *Alcohol consumption on pancreatic diseases.* World J Gastroenterol, 2013. **19**(5): p. 638-47.
274. Samokhvalov, A.V., J. Rehm, and M. Roerecke, *Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses.* EBioMedicine, 2015. **2**(12): p. 1996-2002.
275. Chowdhury, P. and P. Gupta, *Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: an overview.* World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7421-7.
276. Jones, M.R., et al., *Drug-induced acute pancreatitis: a review.* Ochsner J, 2015. **15**(1): p. 45-51.
277. Tosun, E., B. Oksuzoglu, and O. Topaloglu, *Relationship between acute pancreatitis and ACE inhibitors.* Acta Cardiol, 2004. **59**(5): p. 571-2.
278. Etienne, D. and Y. Reda, *Statins and their role in acute pancreatitis: Case report and literature review.* World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2014. **5**(3): p. 191-5.
279. Kaurich, T., *Drug-induced acute pancreatitis.* Proc (Bayl Univ Med Cent), 2008. **21**(1): p. 77-81.
280. Thrower, E.C., et al., *Zymogen activation in a reconstituted pancreatic acinar cell system.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G894-902.
281. Rinderknecht, H., *Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation.* Dig Dis Sci, 1986. **31**(3): p. 314-21.
282. Kambhampati, S., W. Park, and A. Habtezion, *Pharmacologic therapy for acute pancreatitis.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(45): p. 16868-80.
283. Gorelick, F.S. and E. Thrower, *The acinar cell and early pancreatitis responses.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(11 Suppl): p. S10-4.
284. Hammer, H.F., *An update on pancreatic pathophysiology (do we have to rewrite pancreatic pathophysiology?).* Wien Med Wochenschr, 2014. **164**(3-4): p. 57-62.
285. Dios, I.D., *Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis.* World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2010. **1**(1): p. 15-20.
286. Sandler, M., et al., *Tumour necrosis factor alpha secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice.* Gut, 2013. **62**(3): p. 430-9.
287. Watanabe, T., M. Kudo, and W. Strober, *Immunopathogenesis of pancreatitis.* Mucosal Immunol, 2017. **10**(2): p. 283-298.
288. Chen, G., et al., *Depletion of neutrophils protects against L-arginine-induced acute pancreatitis in mice.* Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(6): p. 2111-20.
289. Bhatia, M., et al., *The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury.* Int J Pancreatol, 1998. **24**(2): p. 77-83.
290. Booth, D.M., et al., *Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe?* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(10): p. 2683-98.
291. Saeki, K., et al., *CCL2-induced migration and SOCS3-mediated activation of macrophages are involved in cerulein-induced pancreatitis in mice.* Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 1010-1020 e9.
292. Gea-Sorli, S. and D. Closa, *In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis.* BMC Immunol, 2009. **10**: p. 42.

293. Gea-Sorli, S. and D. Closa, *Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis*. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2010. **1**(5): p. 107-11.
294. Gloor, B., et al., *Kupffer cell blockade reduces hepatic and systemic cytokine levels and lung injury in hemorrhagic pancreatitis in rats*. Pancreas, 2000. **21**(4): p. 414-20.
295. Closa, D., et al., *Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver*. Ann Surg, 1999. **229**(2): p. 230-6.
296. Tsukahara, Y., et al., *Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis*. J Surg Res, 1996. **66**(1): p. 43-50.
297. Dib, M., et al., *Role of mast cells in the development of pancreatitis-induced multiple organ dysfunction*. Br J Surg, 2002. **89**(2): p. 172-8.
298. Lopez-Font, I., et al., *Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(27): p. 3411-7.
299. Bedrosian, A.S., et al., *Dendritic cells promote pancreatic viability in mice with acute pancreatitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1915-26 e1-14.
300. Demols, A., et al., *CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice*. Gastroenterology, 2000. **118**(3): p. 582-90.
301. Osada, J., et al., *Platelet activation in acute pancreatitis*. Pancreas, 2012. **41**(8): p. 1319-24.
302. Abdulla, A., et al., *Role of platelets in experimental acute pancreatitis*. Br J Surg, 2011. **98**(1): p. 93-103.
303. Abdulla, A., et al., *Platelets regulate P-selectin expression and leukocyte rolling in inflamed venules of the pancreas*. Eur J Pharmacol, 2012. **682**(1-3): p. 153-60.
304. Gorelick, F.S. and M.M. Lerch, *Do Animal Models of Acute Pancreatitis Reproduce Human Disease?* Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **4**(2): p. 251-262.
305. Foster, J.R., *A review of animal models of nonneoplastic pancreatic diseases*. Toxicol Pathol, 2014. **42**(1): p. 243-59.
306. Hegyi, P.P., G.; Steer, M.L.; Rakonczay, Z.Jr., *Pancreatitis: Their Strengths and Weaknesses, Relevance to Human Disease, Selection, and Appropriate Use*. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, 2013.
307. Hyun, J.J. and H.S. Lee, *Experimental models of pancreatitis*. Clin Endosc, 2014. **47**(3): p. 212-6.
308. van Minnen, L.P., et al., *The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis*. J Gastrointest Surg, 2007. **11**(5): p. 682-9.
309. Kui, B., et al., *New insights into the methodology of L-arginine-induced acute pancreatitis*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117588.
310. Dawra, R.S., A.K., *L-arginine-induced experimental acute pancreatitis*. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, 2012.
311. Liu, Z.H., et al., *A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(45): p. 5732-9.
312. Wittel, U.A., et al., *Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice*. Pancreas, 2008. **36**(2): p. e9-21.
313. Dickson, A.P., A.K. Foulis, and C.W. Imrie, *Histology and bacteriology of closed duodenal loop models of experimental acute pancreatitis in the rat*. Digestion, 1986. **34**(1): p. 15-21.
314. Nevalainen, T.J. and A. Seppa, *Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat*. Scand J Gastroenterol, 1975. **10**(5): p. 521-7.
315. Marik, P.E. and A.M. Taeb, *SIRS, qSOFA and new sepsis definition*. J Thorac Dis, 2017. **9**(4): p. 943-945.
316. Reinhart, K., et al., *New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 609-34.

317. Vincent, J.L., et al., *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
318. Vincent, J.L., et al., *Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(5): p. 380-6.
319. Mira, J.C., et al., *Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome*. Crit Care Med, 2017. **45**(2): p. 253-262.
320. Nobre, V., F.P. Sarasin, and J. Pugin, *Prompt antibiotic administration and goal-directed hemodynamic support in patients with severe sepsis and septic shock*. Curr Opin Crit Care, 2007. **13**(5): p. 586-91.
321. Delano, M.J. and P.A. Ward, *The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 330-353.
322. Guidet, B. and E. Maury, *Sex and severe sepsis*. Crit Care, 2013. **17**(3): p. 144.
323. Moss, M., *Epidemiology of sepsis: race, sex, and chronic alcohol abuse*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S490-7.
324. Scotland, R.S., et al., *Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice*. Blood, 2011. **118**(22): p. 5918-27.
325. Moore, J.X., et al., *Black-white racial disparities in sepsis: a prospective analysis of the REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke (REGARDS) cohort*. Crit Care, 2015. **19**: p. 279.
326. Valley, T.S. and C.R. Cooke, *The epidemiology of sepsis: questioning our understanding of the role of race*. Crit Care, 2015. **19**: p. 347.
327. Nasa, P., D. Juneja, and O. Singh, *Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview*. World J Crit Care Med, 2012. **1**(1): p. 23-30.
328. Starr, M.E. and H. Saito, *Sepsis in old age: review of human and animal studies*. Aging Dis, 2014. **5**(2): p. 126-36.
329. Giamarellos-Bourboulis, E.J. and S.M. Opal, *The role of genetics and antibodies in sepsis*. Ann Transl Med, 2016. **4**(17): p. 328.
330. Barber, R.C., et al., *Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury*. Clin Med Res, 2006. **4**(4): p. 250-5.
331. Huttunen, R., T. Heikkinen, and J. Syrjanen, *Smoking and the outcome of infection*. J Intern Med, 2011. **269**(3): p. 258-69.
332. O'Brien, J.M., Jr., et al., *Alcohol dependence is independently associated with sepsis, septic shock, and hospital mortality among adult intensive care unit patients*. Crit Care Med, 2007. **35**(2): p. 345-50.
333. Upala, S., A. Sanguankeo, and N. Permpalung, *Significant association between vitamin D deficiency and sepsis: a systematic review and meta-analysis*. BMC Anesthesiol, 2015. **15**: p. 84.
334. Japiassu, A.M., et al., *Sepsis is a major determinant of outcome in critically ill HIV/AIDS patients*. Crit Care, 2010. **14**(4): p. R152.
335. Gustot, T., et al., *Severe sepsis in cirrhosis*. Hepatology, 2009. **50**(6): p. 2022-33.
336. Tektonidou, M.G., et al., *Burden of Serious Infections in Adults With Systemic Lupus Erythematosus: A National Population-Based Study, 1996-2011*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015. **67**(8): p. 1078-85.
337. Williams, M.D., et al., *Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care*. Crit Care, 2004. **8**(5): p. R291-8.
338. Vincent, J.L., et al., *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. JAMA, 2009. **302**(21): p. 2323-9.
339. Remick, D.G., *Pathophysiology of sepsis*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1435-44.

340. Wiersinga, W.J., et al., *Host innate immune responses to sepsis*. *Virulence*, 2014. **5**(1): p. 36-44.
341. Haak, B.W. and W.J. Wiersinga, *The role of the gut microbiota in sepsis*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017. **2**(2): p. 135-143.
342. Cabrera-Perez, J., V.P. Badovinac, and T.S. Griffith, *Enteric immunity, the gut microbiome, and sepsis: Rethinking the germ theory of disease*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2017. **242**(2): p. 127-139.
343. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16045.
344. Sachwani, G.R., et al., *The association between blood glucose levels and matrix-metalloproteinase-9 in early severe sepsis and septic shock*. *J Inflamm (Lond)*, 2016. **13**: p. 13.
345. Chua, H.R., et al., *Extended Mortality and Chronic Kidney Disease After Septic Acute Kidney Injury*. *J Intensive Care Med*, 2018: p. 885066618764617.
346. Woznica, E.A., et al., *Liver dysfunction in sepsis*. *Adv Clin Exp Med*, 2018.
347. Alvarez, S., T. Vico, and V. Vanasco, *Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: Interrelated aspects in endotoxemia and sepsis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **81**(Pt B): p. 307-314.
348. Srinivasan, S. and N.G. Avadhani, *Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(6): p. 1252-63.
349. Chen, X.H., Y.J. Yin, and J.X. Zhang, *Sepsis and immune response*. *World J Emerg Med*, 2011. **2**(2): p. 88-92.
350. Kuperberg, S.J. and R. Wadgaonkar, *Sepsis-Associated Encephalopathy: The Blood-Brain Barrier and the Sphingolipid Rheostat*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 597.
351. Rosenthal, M.D. and F.A. Moore, *Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism: Evolution of Multiple Organ Dysfunction*. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016. **17**(2): p. 167-72.
352. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(7): p. 499-511.
353. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.
354. Chousterman, B.G., F.K. Swirski, and G.F. Weber, *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(5): p. 517-528.
355. Calandra, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis*. *J Infect Dis*, 2003. **187** Suppl 2: p. S385-90.
356. Yu, M., et al., *HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2*. *Shock*, 2006. **26**(2): p. 174-9.
357. Boomer, J.S., J.M. Green, and R.S. Hotchkiss, *The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer?* *Virulence*, 2014. **5**(1): p. 45-56.
358. Yan, C. and H. Gao, *New insights for C5a and C5a receptors in sepsis*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 368.
359. Mantzaris, K., V. Tsolaki, and E. Zakynthinos, *Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 5985209.
360. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach*. *Lancet Infect Dis*, 2013. **13**(3): p. 260-8.
361. Maderna, P. and C. Godson, *Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1639**(3): p. 141-51.
362. Das, U., *HLA-DR expression, cytokines and bioactive lipids in sepsis*. *Arch Med Sci*, 2014. **10**(2): p. 325-35.

363. Tang, B.M., S.J. Huang, and A.S. McLean, *Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review*. Crit Care, 2010. **14**(6): p. R237.
364. Lang, J.D. and G. Matute-Bello, *Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans*. Crit Care, 2009. **13**(1): p. 109.
365. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The pathogenesis of sepsis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 19-48.
366. de Pablo, R., et al., *Role of circulating lymphocytes in patients with sepsis*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 671087.
367. Cao, C., et al., *The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis*. World J Emerg Med, 2015. **6**(1): p. 5-9.
368. Luan, Y.Y., et al., *Effect of Regulatory T Cells on Promoting Apoptosis of T Lymphocyte and Its Regulatory Mechanism in Sepsis*. J Interferon Cytokine Res, 2015. **35**(12): p. 969-80.
369. Wu, D.D., T. Li, and X.Y. Ji, *Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 3591248.
370. Flohe, S.B., et al., *Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(3): p. 473-81.
371. Taneja, R., et al., *Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity*. Crit Care Med, 2004. **32**(7): p. 1460-9.
372. Taneja, R., et al., *Immature circulating neutrophils in sepsis have impaired phagocytosis and calcium signaling*. Shock, 2008. **30**(6): p. 618-22.
373. Lerman, Y.V. and M. Kim, *Neutrophil migration under normal and sepsis conditions*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2015. **15**(1): p. 19-28.
374. van der Poll, T., et al., *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(7): p. 407-420.
375. Shen, X.F., et al., *Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update*. J Cell Mol Med, 2017. **21**(9): p. 1687-1697.
376. Kovach, M.A. and T.J. Standiford, *The function of neutrophils in sepsis*. Curr Opin Infect Dis, 2012. **25**(3): p. 321-7.
377. López-Collado, E.C.J.M.B.S.K., *Macrophages in Sepsis Progression*, in *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*, A.M. S.K. Biswas, Editor. 2014, Springer: New York. p. 315-336.
378. Santos, S.S., et al., *Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines*. Intensive Care Med Exp, 2016. **4**(1): p. 5.
379. Theodorakis, E.D., E.; Tsatsanis, C.; Georgopoulos, D.; Vaporidi, K., *Macrophage phenotype in sepsis immunosuppression*. Critical Care, 2015. **19**(Suppl 1): p. 44.
380. Fink, M.P., *Animal models of sepsis*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 143-53.
381. Nemzek, J.A., K.M. Hugunin, and M.R. Opp, *Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being*. Comp Med, 2008. **58**(2): p. 120-8.
382. Buras, J.A., B. Holzmann, and M. Sitkovsky, *Animal models of sepsis: setting the stage*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 854-65.
383. Doi, K., et al., *Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 2868-78.
384. Stortz, J.A., et al., *Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap?* ILAR J, 2017. **58**(1): p. 90-105.
385. Poli-de-Figueiredo, L.F., et al., *Experimental models of sepsis and their clinical relevance*. Shock, 2008. **30** Suppl 1: p. 53-9.
386. Cuenca, A.G., et al., *Cecal ligation and puncture*. Curr Protoc Immunol, 2010. **Chapter 19**: p. Unit 19 13.

387. Toscano, M.G., D. Ganea, and A.M. Gamero, *Cecal ligation puncture procedure*. J Vis Exp, 2011(51).
388. Dejager, L., et al., *Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?* Trends Microbiol, 2011. **19**(4): p. 198-208.
389. Lustig, M.K., et al., *Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes*. Shock, 2007. **28**(1): p. 59-64.
390. Traeger, T., et al., *Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis*. J Vis Exp, 2010(46).
391. Lewis, A.J., C.W. Seymour, and M.R. Rosengart, *Current Murine Models of Sepsis*. Surg Infect (Larchmt), 2016. **17**(4): p. 385-93.
392. Mathiak, G., et al., *An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat*. Crit Care Med, 2000. **28**(6): p. 1947-52.
393. Yu, X.X., et al., *Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(2): p. E433-46.
394. Caton, P.W., et al., *Endotoxin induced hyperlactatemia and hypoglycemia is linked to decreased mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase*. Life Sci, 2009. **84**(21-22): p. 738-44.
395. Raetzsch, C.F., et al., *Lipopolysaccharide inhibition of glucose production through the Toll-like receptor-4, myeloid differentiation factor 88, and nuclear factor kappa b pathway*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 592-600.
396. Niederau, C., L.D. Ferrell, and J.H. Grendell, *Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin*. Gastroenterology, 1985. **88**(5 Pt 1): p. 1192-204.
397. Su, K.H., C. Cuthbertson, and C. Christophi, *Review of experimental animal models of acute pancreatitis*. HPB (Oxford), 2006. **8**(4): p. 264-86.
398. Ozer Cakir, O., et al., *Effects of diclofenac sodium and octreotide on treatment of caerulein-induced acute pancreatitis in mice*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(10): p. 17551-64.
399. Ding, S.P., J.C. Li, and C. Jin, *A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(3): p. 584-9.
400. Williams, J.A., *Isolation of rodent pancreatic acinar cells and acini by collagenase digestion*. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, 2010.
401. Hoover, D.L. and C.A. Nacy, *Macrophage activation to kill Leishmania tropica: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents*. J Immunol, 1984. **132**(3): p. 1487-93.
402. Li, Y.M., et al., *Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages*. J Immunol Methods, 1997. **201**(2): p. 183-8.
403. Sabokbar, A., et al., *A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro*. Bone Miner, 1994. **27**(1): p. 57-67.
404. Wiechelmann, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick, *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. Anal Biochem, 1988. **175**(1): p. 231-7.
405. Mayerle, J.S., M.; Lerch, M., *Secretagogue (Caerulein) induced pancreatitis in rodents*. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base 2013.
406. Wicker, C., et al., *Multiple-level caerulein control of the gene expression of secretory proteins in the rat pancreas*. Eur J Biochem, 1985. **151**(3): p. 461-6.
407. Iovanna, J.L., P. Lechene de la Porte, and J.C. Dagorn, *Expression of genes associated with dedifferentiation and cell proliferation during pancreatic regeneration following acute pancreatitis*. Pancreas, 1992. **7**(6): p. 712-8.

408. Romac, J.M., et al., *Pancreatic secretory trypsin inhibitor I reduces the severity of chronic pancreatitis in mice overexpressing interleukin-1beta in the pancreas*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **302**(5): p. G535-41.
409. Mews, P., et al., *Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. **50**(4): p. 535-41.
410. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
411. Castro, A., et al., *Administration to mouse of endotoxin from gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 488-95.
412. Blanque, R., et al., *Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha*. Gen Pharmacol, 1996. **27**(6): p. 973-7.
413. Jirillo, E., et al., *The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings*. J Endotoxin Res, 2002. **8**(5): p. 319-27.
414. Chen, S., et al., *GY4137 ameliorates intestinal barrier injury in a mouse model of endotoxemia*. Biochem Pharmacol, 2016. **118**: p. 59-67.
415. Van Belle, H., *Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans*. Clin Chem, 1976. **22**(7): p. 972-6.
416. Yao, P.L., et al., *Global expression profiling of theophylline response genes in macrophages: evidence of airway anti-inflammatory regulation*. Respir Res, 2005. **6**: p. 89.
417. Fine, R. and J.F. Collins, *The effect of theophylline on macrophage elastase secretion*. Connect Tissue Res, 1982. **9**(3): p. 195-9.
418. Ghosh, N.K. and W.H. Fishman, *On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. I. Kinetic studies*. J Biol Chem, 1966. **241**(11): p. 2516-22.
419. Mornet, E., *Molecular Genetics of Hypophosphatasia and Phenotype-Genotype Correlations*. Subcell Biochem, 2015. **76**: p. 25-43.
420. Lei, W., et al., *Alkaline phosphatase protects lipopolysaccharide-induced early pregnancy defects in mice*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123243.
421. Esteve, D., et al., *Multiple Functions of MSCA-1/TNAP in Adult Mesenchymal Progenitor/Stromal Cells*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 1815982.
422. Takahara, N., et al., *Induction of alkaline phosphatase activity in cultured human intracranial tumor cells*. Cancer Res, 1982. **42**(2): p. 563-8.
423. Wagner, A.C., et al., *CEP-1347 inhibits caerulein-induced rat pancreatic JNK activation and ameliorates caerulein pancreatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(1): p. G165-72.
424. Frossard, J.L., et al., *Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas*. Gut, 2002. **50**(1): p. 78-83.
425. Sun, Y., et al., *Low-methoxyl lemon pectin attenuates inflammatory responses and improves intestinal barrier integrity in caerulein-induced experimental acute pancreatitis*. Mol Nutr Food Res, 2017. **61**(4).
426. Algul, H., et al., *Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1490-501.
427. Takeyama, Y., et al., *Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death*. J Gastrointest Surg, 2000. **4**(4): p. 379-87.
428. Li, H., et al., *Critical role of neutrophil alkaline phosphatase in the antimicrobial function of neutrophils*. Life Sci, 2016. **157**: p. 152-7.

429. Chikkappa, G., *Control of neutrophil alkaline phosphatase synthesis by cytokines in health and diseases*. *Exp Hematol*, 1992. **20**(4): p. 388-90.
430. Wang, X. and D. Chen, *Purinergic Regulation of Neutrophil Function*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 399.
431. Eltzschig, H.K., M.V. Sitkovsky, and S.C. Robson, *Purinergic signaling during inflammation*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(24): p. 2322-33.
432. Burnstock, G. and J.M. Boeynaems, *Purinergic signalling and immune cells*. *Purinergic Signal*, 2014. **10**(4): p. 529-64.
433. Hoque, R., et al., *TLR9 and the NLRP3 inflammasome link acinar cell death with inflammation in acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(1): p. 358-69.
434. Zhang, G.X., et al., *P2X7R Blockade Prevents NLRP3 Inflammasome Activation and Pancreatic Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Pancreatitis*. *Pancreas*, 2017. **46**(10): p. 1327-1335.
435. Wiewel, M.A., et al., *Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis*. *Crit Care*, 2016. **20**(1): p. 328.
436. Norris, C.A., et al., *Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e96053.
437. Zhang, L.J. and X.Z. Wang, *Interleukin-10 and chronic liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(11): p. 1681-5.
438. Brownell, J. and S.J. Polyak, *Molecular pathways: hepatitis C virus, CXCL10, and the inflammatory road to liver cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(6): p. 1347-52.
439. Weiskirchen, R. and F. Tacke, *Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology*. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014. **3**(6): p. 344-63.
440. Arroyo-Espliguero, R., et al., *CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events?* *Heart*, 2004. **90**(9): p. 983-8.
441. Minter, R.M., et al., *LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(1): p. G45-54.
442. Horras, C.J., C.L. Lamb, and K.A. Mitchell, *Regulation of hepatocyte fate by interferon-gamma*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011. **22**(1): p. 35-43.