

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



**“Fosfatasa alcalina no específica de tejido.  
Estudio de propiedades funcionales sobre la  
función de barrera intestinal y en la  
inflamación”**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

**Mireia Tena Garitaonandia**

Bajo la dirección de los Doctores

Olga Martínez Augustin

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Mireia Tena Garitaonandia  
ISBN: 978-84-1195-116-6  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/88328>







# ÍNDICE

SUMMARY .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1. FOSFATASA ALCALINA .....	12
1.1.1. Generalidades .....	12
1.1.2. Genes que codifican la fosfatasa alcalina .....	12
1.1.3. Expresión génica y factores de transcripción .....	14
1.1.4. Estructura .....	17
1.1.5. Propiedades enzimáticas .....	19
1.1.5.1. Especificidad de sustratos .....	19
1.1.5.2. Inhibición enzimática .....	20
1.1.5.3. Termoestabilidad .....	22
1.1.6. Isoenzimas de fosfatasa alcalina .....	22
1.1.6.1. Fosfatasa alcalina placentaria .....	22
1.1.6.2. Fosfatasa alcalina germinal (GCAP) .....	23
1.1.6.3. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP) .....	23
1.1.6.4. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) .....	26
1.1.7. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina .....	33
1.1.8. Utilización farmacológica de la fosfatasa alcalina .....	34
1.1.9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP 37	
1.2. FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL .....	38
1.2.1. Composición y función .....	38
1.2.1.1. Barrera física .....	39
1.2.1.2. Barrera bioquímica .....	40
1.2.1.3. Barrera inmunológica .....	40
1.2.1.4. Barrera microbiana .....	41
1.2.2. NAFLD: eje intestino-hígado .....	41
1.2.2.1. NAFLD: generalidades .....	42
1.2.2.2. Alteración de la barrera epitelial en la patogenia de NAFLD .....	44
1.2.3. Enfermedad inflamatoria intestinal .....	45
1.2.3.1. Generalidades .....	45
1.2.3.2. Incidencia .....	47
1.2.3.3. Biología detrás la EII: genética, microbioma y factores ambientales .....	48
1.2.3.4. Alteración de la función de barrera intestinal en EII .....	50
1.2.3.5. Disfunción del sistema inmunitario en EII .....	52
2. OBJETIVOS .....	54
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	58
3.1. REACTIVOS .....	60
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	60
3.2.1. Ratones heterocigotos para TNAP (TNAP <sup>+/-</sup> ) .....	60
3.2.2. Ratones deficientes en TNAP en el epitelio intestinal (Alp <sup>IEC-/-</sup> ) .....	61
3.2.3. Genotipado de los ratones .....	61

3.2.4.	Comprobación de la recombinación del gen Alpl en el epitelio intestinal	63
3.3.	EXPERIMENTOS IN VIVO	64
3.3.1.	Diseño experimental del estudio de la deficiencia en TNAP en hepatoesteatosis	64
3.3.2.	Diseño experimental de la caracterización del fenotipo de los ratones Alpl <sup>IEC-/-</sup> en estado basal	66
3.3.4.	Evaluación patológica de los modelos in vivo	67
3.3.4.1.	Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo del hígado graso	67
3.3.4.2.	Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo de la colitis experimental inducida por DSS	68
3.3.5.	Obtención del plasma sanguíneo	68
3.3.6.	Necropsia	69
3.3.7.	Determinación de glucosa en sangre	70
3.3.8.	Determinación de parámetros plasmáticos	70
3.3.9.	Estudio de la permeabilidad intestinal in vivo	71
3.3.10.	Aislamiento de células intestinales epiteliales	71
3.3.11.	Cuantificación de colina y sus metabolitos	71
3.3.12.	Determinación de contenido de grasa hepática	73
3.3.13.	Microbiota	73
3.4.	EXPERIMENTOS EX VIVO	75
3.4.1.	Obtención de organoides de yeyuno de ratón	75
3.5.	TÉCNICAS GENERALES	76
3.5.1.	Estudio histológico	76
3.5.2.	Inmunohistoquímica	76
3.5.3.	Determinación de la actividad fosfatasa alcalina	77
3.5.4.	Determinación de la actividad mieloperoxidasa	78
3.5.5.	Extracción y cuantificación de proteínas	79
3.5.6.	Western Blot	79
3.5.7.	Extracción de RNA, cuantificación y retrotranscripción	80
3.5.8.	Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR	80
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
4.	RESULTADOS	84
4.1.	ESTUDIO DEL PAPEL DE LA TNAP EN LA ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (NAFLD) MEDIANTE EL MODELO DE DIETA DEFICIENTE EN METIONINA Y COLINA	86
4.1.1.	Estudio del fenotipo general de la esteatosis	87
4.1.2.	Estudio de parámetros plasmáticos	89
4.1.3.	Estudio de genes relacionados con inflamación y fibrosis en hígado	91
4.1.4.	Estudio de genes relacionados con el metabolismo hepático	94
4.1.5.	Estudio del epitelio intestinal en esteatosis	100
4.2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES DEFICIENTES EN TNAP EN EL EPITELIO INTESTINAL	102
4.2.1.	Generación de ratones con delección condicional inducible de Alpl en el epitelio intestinal	102
4.2.2.	Comprobación de la recombinación del gen Alpl en el epitelio intestinal	104

4.2.3. Caracterización de la delección de Alpl en intestino y fenotipo general de los ratones .....	105
4.2.4. Actividad y expresión fosfatasa alcalina .....	107
4.2.5. Estudio de la expresión de genes en colon .....	111
4.2.6. Estudio de la expresión de genes en células del epitelio intestinal ..	112
4.2.7. Estudio de correlación de la expresión génica en colon e IEC.....	113
4.2.8. Estudio de la expresión de genes en tejido hepático.....	115
4.2.9. Metabolismo de la colina .....	118
4.2.10. Microbiota fecal.....	119
4.3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO EN LA COLITIS INDUCIDA POR DSS .....	121
4.3.1. Estudio macroscópico y microscópico en la colitis inducida por DSS durante 7 días .....	121
4.3.2. Estudio de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon en la colitis inducida por DSS durante 7 días .....	126
4.3.3. Estudio de parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS durante 7 días .....	128
4.3.4. Estudio de parámetros de integridad de la función de barrera intestinal en la colitis inducida por DSS durante 7 días .....	130
4.3.5. Estudio del impacto de la inflamación a nivel sistémico en la colitis inducida por DSS durante 7 días .....	131
4.3.6. Estudio macroscópico y microscópico en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	132
4.3.7. Estudio de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	135
4.3.8. Estudio de parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	137
4.3.9. Estudio de parámetros de función de barrera intestinal en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	139
4.3.10. Estudio del impacto de la inflamación a nivel sistémico en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	141
4.3.11. Estudios de correlación en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días .....	142
4.4. ALPL <sup>IEC-/-</sup> IN VITRO: ORGANOIDES .....	147
5. DISCUSIÓN .....	152
6. CONCLUSIONES .....	178
7. CONCLUSIONS.....	182
8. ANEXOS .....	186
8.1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	188
8.2. ÍNDICE DE FIGURAS.....	190
8.3. ÍNDICE DE TABLAS.....	198
9. BIBLIOGRAFÍA.....	200





# **SUMMARY**





## 1. INTRODUCTION

Alkaline phosphatases (APs) are homodimeric glycoproteins (EC. 3.1.3.1) widely distributed in numerous species that catalyze the hydrolysis, at alkaline pH, of phosphate groups releasing inorganic phosphate and an alcohol group. They can dephosphorylate a wide variety of molecules, such as nucleotides, bacterial lipopolysaccharide (LPS), or inorganic pyrophosphate (PPi). In humans, four AP isoenzymes exist, including tissue-specific forms: intestinal alkaline phosphatase (IAP, encoded by the ALPI gene), placental (PLAP, encoded by ALPP), and germinal (GCAP, encoded by ALPPL2), along with tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), encoded by the ALPL gene. TNAP has several isoforms differing in glycosylation and sensitivity to inhibitors that receive the name of the tissue where they are mainly expressed: the liver, bone, and kidney (1).

TNAP plays a crucial role in bone mineralization by hydrolyzing inorganic pyrophosphate, facilitating skeletal and dental mineralization (2). It is also involved in purinergic signaling, acting as an ectonucleotidase to hydrolyze extracellular ATP to adenosine (3). Recent research has highlighted TNAP's significance in hepatic metabolism (4), thermogenesis (5), and immune cell maintenance (6,7). Choline, a TNAP substrate, may link TNAP activity to liver metabolism (8). This alkaline phosphatase isoform is also expressed in the gut, specifically in the lamina propria leukocytes and in intestinal epithelial cells (IECs) (9).

Among APs, IAP is well-characterized and is involved in lipid absorption (10,11), bicarbonate secretion (12,13), attenuation of LPS mediated inflammation (14–17), and dephosphorylation of nucleotides and other inflammatory molecules (18,19).

## SUMMARY

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the main hepatic manifestation of metabolic syndrome and the most frequent chronic liver disease in Western countries with an overall prevalence of approximately 25% in the adult population, especially in people with obesity and diabetes. NAFLD is characterized by hepatic steatosis (accumulation of triglycerides in hepatocytes) in presence of metabolic risk factors (particularly obesity and type 2 diabetes) and in the absence of excessive intake of alcohol ( $\geq 30\text{g/day}$  for men and  $\geq 20\text{g/day}$  for women) or other chronic liver diseases (20–22). Multiple factors, including insulin resistance, microbiota, genetics, and environmental factors, contribute to NAFLD. Intestinal barrier function may also play a role in NAFLD pathogenesis, with increased bacterial permeability potentially contributing to liver and extrahepatic damage (23–29). TNAP's actions, including dephosphorylation of pro-inflammatory molecules and maintenance of intestinal permeability, may affect NAFLD susceptibility.

Inflammatory bowel disease (IBD) comprises Crohn's disease and ulcerative colitis, characterized by chronic inflammation and immune dysregulation. IBD patients require prolonged medical and surgical interventions that impair their quality of life. The exact causes of IBD remain unclear, but it involves a disrupted intestinal mucosal immune system in genetically susceptible individuals. TNAP (30). TNAP induction has been observed in inflamed intestines (31), but its role in IBD is poorly understood.

Therefore, this Doctoral Thesis aims to elucidate the role of TNAP in NAFLD and in intestinal epithelium in basal and inflamed conditions.

## **2. AIMS**

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

1. To characterize the involvement of TNAP in the development of hepatic steatosis mediated by dietary lipids.
2. To determine the role of intestinal epithelial TNAP in basal conditions.
3. To study the role of intestinal epithelial TNAP in experimental colitis induced by DSS.

### **3. MATERIAL AND METHODS**

To carry out the objectives of the Thesis, we performed *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* experiments using a wide variety of techniques or procedures, including steatosis model diets, dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis, real time quantitative PCR, multiplex, histology techniques or western blot.

Haplodeficient mice for TNAP (TNAP<sup>+/-</sup>) and mice with a conditional intestinal epithelial ablation of TNAP (Alpl<sup>IEC-/-</sup>) were used to clarify the role of TNAP in steatosis and in the intestinal barrier integrity. The latter were obtained in our laboratory to carry out this Thesis.

### **4. RESULTS AND DISCUSSION**

Our results can be split into three sections.

#### **(1) Role of TNAP in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease through the Methionine and Choline Deficient (MCD) diet model**

Wild-type (WT) and haplodeficient animals were fed either a control diet or a methionine-choline-deficient (MCD) diet for 17 days. Ethical considerations led to the premature termination of the experiment due to severe weight loss observed in mice fed the MCD diet. Mice fed the MCD diet exhibited typical signs of this animal model, including elevated

## SUMMARY

alanine aminotransferase (ALT) activity and decreased blood glucose levels, with no discernible differences between genotypes. The characteristic hepatic fat accumulation was also confirmed. Interestingly, haplodeficient mice on the control diet displayed microsteatosis and increased hepatic fat content compared to chow diet fed mice (4% w:w), implicating TNAP in fat diet-induced steatosis. Of note, the content of fat and sucrose in the control diet of this experiment were higher than those of a normal chow diet.

Additionally, genotype influenced alterations in various plasma parameters when mice were fed the control diet. TNAP mice exhibited higher levels of IL-6, pancreatic peptide, resistin, and glucagon in plasma. Notably, there was increased expression of fibrotic genes (*Des* and *Tgfb1*, the last one without being statistically significant) in the liver of haplodeficient mice on the control diet, along with higher levels of *Il1b* and *Tnf* genes ( $p=0.08$ ). In addition, the haplodeficiency combined with the control diet induced changes in genes related to carbohydrate, fatty acid, and bile acid metabolism. All these results suggest that TNAP may be involved in the development of the high-fat diet-associated steatosis phenotype.

### **(2) Consequences of intestinal epithelial *Alpl* deletion in mice**

To determine the role of TNAP in the intestinal epithelium WT and *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mice were sacrificed 7 days after the first tamoxifen injection. By employing *Alpl\_flox* primers, successful gene silencing was confirmed in both colonic and small intestinal epithelial cells (IECs). The resulting phenotype following the deletion of *Alpl* within the intestinal epithelium appeared seemingly normal.

At the intestinal level, no histological differences were discerned. Alkaline phosphatase activity remained unaltered across all intestinal



segments (jejunum, ileum, colon); however, notable changes in in vitro sensitivity to levamisole and TNAP inhibitor were observed. The absence of *Alpl* in IECs induced modifications in the expression of intestinal isoenzymes. Specifically, in the small intestine, a decrease in the expression of *Akp3* and *Akp6* was noted, whereas the converse was observed in the colon (though not statistically significant). These genes codify IAP isoenzymes in the intestine of mice. *Akp3*, is expressed specifically in the duodenum while *Akp6*, is expressed at high levels throughout the gut.

For the evaluation of potential extraintestinal effects, greater AP activity was identified in both bone and kidney of *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mice, with no alterations in sensitivity to inhibitors. The deletion of *Alpl* in IECs resulted in an upregulation of fibrotic and inflammatory genes in the liver (*Tgfb1*, *Des*, *Tnf*). Additionally, increased expression of *Nt5e* (linked to the purinergic system) and *Tff3* (associated with hepatic metabolism) was detected. In line with this, knockout mice exhibited reduced levels of choline and phosphocholine (not significant for the latter), potentially correlated with diminished choline dephosphorylation capacity and subsequent absorption within the intestine. Collectively, these findings underscore the significance of intestinal TNAP not only within the intestine itself but also systemically.

### **(3) Role of intestinal epithelial *Alpl* in experimental colitis**

WT and *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mice were exposed to DSS 2.5% (w:v) for 7 days after inducing the deletion of the *Alpl* gene through tamoxifen administration. DSS-induced colitis resulted in greater weight loss in knockout mice and a higher Disease Activity Index (DAI) at early stages of the disease. There were no differences between genotypes in colon length or thickness in this experimental colitis model. Histologically, colitic

## SUMMARY

knockout mice exhibited increased submucosal infiltration. Macroscopic results indicated a worse condition in *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mice during colitis. However, the colonic biochemical analysis revealed that these mice had a lower degree of inflammation, as evidenced by reduced expression of inflammatory markers. The protective effect becomes apparent as early as 4 days and is not associated with changes in the expression of other alkaline phosphatase isoforms but is instead attributed to the early increase in enzyme activity within the colon.

## 5. CONCLUSION

1. TNAP haploinsufficiency associated with a high-fat diet (10% w:w) induces a steatogenic response similar to that observed in WT animals fed a choline and methionine-deficient diet, with an increase in certain inflammatory and fibrotic parameters and modulation of specific genes related to bile acid metabolism. Therefore, TNAP is implicated in the adaptive response to fat.
2. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* was achieved in both small intestine and colon, without producing discernible morphological or molecular changes in either segment, nor substantial alterations in the microbiota. The deletion of *Alpl* induced changes in the expression of certain genes, such as *Akp3*, *Akp6*, *Tjp1*, *Cxcl1*, or *Cxcl10*, in primary epithelial cells (IECs) and jejunal organoids, although the nature of these changes was not consistent across these cell populations, presumably due to differences in the biological context, such as the presence or absence of colonic microbiota and non-epithelial cells.
3. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* alters extraintestinal AP activity under basal conditions, resulting in increased AP activity in bone and kidney, with no changes in sensitivity to specific

inhibitors. This suggests that the glycosylation pattern does not appear to be modified in these tissues.

4. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* increases the expression of genes related to liver fibrosis and inflammation and modulates the expression of genes associated with lipid metabolism in the liver. These changes are associated with a choline deficit in hepatocytes. Therefore, the deficiency of TNAP activity in the intestinal epithelium results in a reduced supply of this important metabolite to the liver, likely contributing to the establishment of a proinflammatory and profibrotic phenotype, and presumably to alterations in lipid metabolism. Long-term experiments will be necessary to confirm this hypothesis.
5. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* results in a complex phenotype in DSS-induced experimental colitis, characterized by both increased macroscopic deterioration and neutrophilic infiltration, along with attenuated expression of inflammatory markers in the colon. This appears to reflect a reduced state of activation within the mucosal infiltrate. The protection is evident as early as 4 days and is not related to the modulation of the expression of other alkaline phosphatase isoforms but rather to the early increase in enzyme activity in the colon.
6. The results obtained in this doctoral thesis confirm that intestinal epithelial TNAP is biologically relevant both to the intestinal and extraintestinal tissues. TNAP thus continues to emerge as a pivotal player in intestinal barrier function.



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. Fosfatasa alcalina

### 1.1.1. Generalidades

Las fosfatasas alcalinas (APs) son una familia de glicoproteínas homodiméricas (EC. 3.1.3.1) ampliamente distribuidas en numerosas especies tanto procariontas como eucariotas. Catalizan la hidrólisis de grupos fosfato liberando fosfato inorgánico y un grupo alcohol a pH alcalino. En los organismos vertebrados, estas enzimas diméricas se encuentran unidas covalentemente a la superficie celular actuando como ectoenzimas. Son capaces de desfosforilar una gran variedad de moléculas, como, por ejemplo, nucleótidos, lipopolisacárido (LPS) bacteriano o pirofosfato inorgánico (PPi).

### 1.1.2. Genes que codifican la fosfatasa alcalina

La familia de AP está compuesta por varias isoenzimas que están codificadas por genes específicos que se expresan en múltiples tejidos. En el caso del humano, son cuatro los genes que codifican para estas glicoproteínas (Tabla 1). Tres isoenzimas son específicas de tejido, siendo designadas por su localización mayoritaria: la fosfatasa alcalina intestinal (IAP codificada por el gen *ALPI*), la placentaria (PLAP codificada por *ALPP*) y la germinal (GCAP codificada por *ALPPL2*). La cuarta isoenzima, codificada por el gen *ALPL*, se denomina como fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) ya que puede encontrarse en varios tejidos, aunque mayoritariamente se expresa en hueso, hígado y riñón, denominada por ello la isoenzima de hígado-hueso-riñón (*Liver-Bone-Kidney*, L/B/K) (1).

Los genes que codifican para las isoenzimas específicas de tejido (*ALPI*, *ALPP* y *ALPPL2*) se encuentran en el cromosoma 2 lo que indica

## INTRODUCCIÓN

que un posible origen común. Tienen una estructura similar que consiste en 11 exones interrumpidos por pequeños intrones de 74-425 pb en posiciones análogas, todo comprimido en menos de 5 kb de DNA genómico (32–34). La similitud estructural de las tres isoenzimas sugiere una evolución divergente, lo que es coherente con la distribución en tres *loci* que forman parte de un clúster en el que están localizados en ese orden del centrómero al telómero en la misma región del brazo largo del cromosoma 2, bandas q34-q37 (35,36).

En cuanto al gen *ALPL*, este se encuentra en el cromosoma 1 vinculado a la banda cromosómica 1p36.12. Su estructura supera los 50 kb y contiene 12 exones. El exón 1 contiene dos secuencias 5' que se transcriben de forma alternativa, dando lugar a versiones diferentes de mRNA. Cada exón tiene su propio promotor, por lo que se definen dos formas, el exón 1A y el exón 1B (37–39). De esta forma, se ha descrito que la transcripción del exón 1A corriente arriba se lleva a cabo principalmente en osteoblastos mientras que la transcripción con el exón 1B se ve impulsada por un promotor activo en hígado y riñón (37,38).

En ratones, las fosfatasas alcalinas están codificadas por 5 loci (Tabla 1): *Alpl* (o *Akp2*) que codifica TNAP, *Akp3* que codifica la fosfatasa alcalina intestinal duodenal (dIAP), *Akp5* que codifica la AP embrionaria (EAP), *Akp6* que codifica la AP intestinal global (gIAP) y *Akp-ps1*, que corresponde a un pseudo-gen inactivo. No se han encontrado la isoenzima placentaria ni de células germinales en ratón, luego en esta especie, la IAP es la única AP específica de tejido. El gen *Alpl* (*Akp2*) se localiza en el cromosoma 4 (40), mientras que, al igual que en el humano, el resto de las isoenzimas se encuentran en el cromosoma 1 formando un clúster: *Akp3* (AP duodenal), *Akp5* (AP embrionaria), *Akp-ps1*, *Akp6* (AP intestinal global) (41,42).



**Tabla 1. Nomenclatura génica, proteica, nombre común y distribución de las distintas isoenzimas de fosfatasa alcalina de humano y ratón (43).**

Especie	Gen	Isoenzima	Nombre común	Distribución tisular
Humano	<i>ALPL</i>	TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido o AP tipo hígado-hueso riñón	SN en desarrollo, tejido óseo, hígado, riñón, sincitiotrofoblasto, tumores
	<i>ALPP</i>	PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria	Sincitiotrofoblasto, tumores
	<i>ALPPL2</i>	GCAP	Fosfatasa alcalina de células germinales	Testículos, trofoblastos
	<i>ALPI</i>	IAP	Fosfatasa alcalina intestinal	Intestino
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
	<i>Akp3</i>	dIAP	Fosfatasa alcalina intestinal duodenal	Intestino
	<i>Akp5</i>	EAP	Fosfatasa alcalina embrionaria	Embrión preimplantado
	<i>Akp6</i>	gIAP	Fosfatasa alcalina intestinal global	Intestino

### 1.1.3. Expresión génica y factores de transcripción

La expresión del gen que codifica la TNAP en ratón (*Alpl* o *Akp2*) se regula durante el desarrollo del animal. Se expresa también en el embrión unicelular, por lo que se le ha atribuido un papel en el mantenimiento de las células madres embrionarias (44). Se ha observado su expresión en el tubo neural y el cerebro del ratón (45,46), en células endoteliales, túbulos renales y el canalículo biliar en hígado (47). Sin embargo, el gen de la TNAP se expresa de forma predominante en el tejido óseo, cartílago y dientes (47), y también se ha detectado en distintos tipos celulares en el cerebro (48,49). Esta isoenzima también se expresa en células del sistema inmunitario (6,7).

## INTRODUCCIÓN

Además, nuestro grupo de investigación y otros han puesto de manifiesto la presencia de TNAP a nivel colónico (31).

La modulación de la expresión de *Alpl* se debe a procesos tanto transcripcionales como postranscripcionales. A nivel transcripcional, el promotor 1A puede estar regulada por ácido retinoico y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (50–53). Concretamente, se vio una expresión predominante del mRNA de tipo óseo en neutrófilos periféricos y en neutrófilos cultivados *in vitro* con G-CSF (50). En rata también se han encontrado dos transcritos de mRNA de *Alpl*. Existe una regulación específica tisular de los dos promotores alternativos, viéndose una inducción del promotor 1B por dexametasona (54). Además de por este glucocorticoide, el promotor 1B también es activado por AMP-cíclico y el ácido holo-trans-retinoico (55,56). Los factores de transcripción FKHR (57) y Sp3 activan el promotor de *ALPL* (58). Por otro lado, Smad3 activa la expresión de TNAP y la mineralización en líneas celulares osteobásticas de ratón (59,60). También BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) (61,62) y diversas citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , que provocan la inhibición de PPAR $\gamma$  (63,64), se han visto implicadas en la regulación de la expresión de TNAP.

La enzima AP embrionaria (EAP) de ratón, codificada por *Akp5*, se expresa de forma mayoritaria en estado embrionario blastocisto (41), junto con *Alpl*. En ratón adulto, la EAP se expresa en los testículos, en el timo y en el intestino (41). En el feto humano, la isoenzima GCAP, codificada por *ALPPL2*, se expresa en las células germinales primordiales (CGP) migratorias y en las gónadas fetales (65). Esta isoenzima también se encuentra en los testículos, pulmón, cérvix y timo (66,67).

La isoenzima placentaria (PLAP) se expresa en grandes cantidades en las células sincitiotrofoblásticas de la placenta desde aproximadamente la octava semana de gestación y a lo largo del resto de embarazo (68).

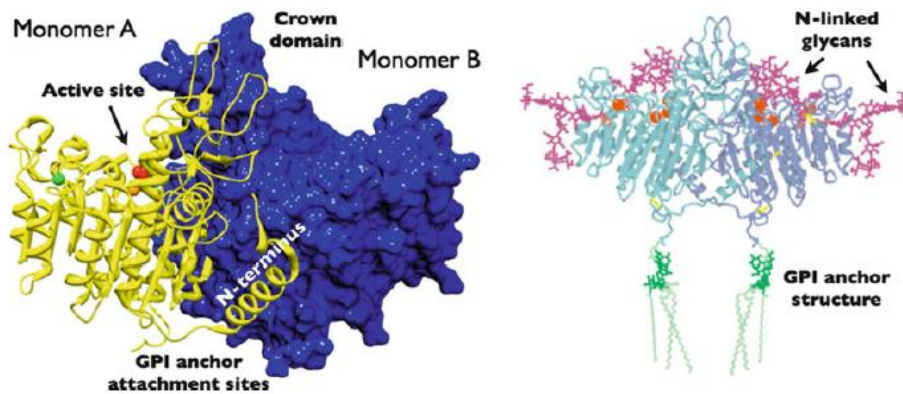
En cuanto a la IAP, se expresa en el intestino de muchas especies. En intestino de ratón, existe la coexpresión de tres isoenzimas, *Akp3*, *Akp5* y *Akp6*. La isoenzima *Akp3* se expresa en el duodeno justo antes del destete, mientras que las otras dos se expresan en el intestino desde el nacimiento y va aumentando su expresión con la edad (42). En adultos, distintos componentes dietéticos y factores de crecimiento y hormonales estimulan la expresión de IAP. Por ejemplo, Prakash y colaboradores (2010) mostraron que la pimienta negra, la piperina, el pimiento rojo, la capsaicina y el jengibre en la dieta provocaban el aumento de la actividad fosfatasa alcalina intestinal (20–100 %) en ratas, siendo entre estos la piperina la más efectiva (69). Otros compuestos administrados en la dieta, como pueden ser el zinc (70), vitamina K1 y K2 (71), lactosa (72) y fosfato esterificado proveniente de almidón de patata (73) se asocian igualmente al aumento en la expresión o actividad de IAP. Por otra parte, la cortisona sola o con tiroxina es capaz de estimular la actividad de la enzima IAP (74). En cuanto a factores de transcripción, se identificó IAP como un gen diana del factor KLF4 (*gut-enriched Kruppel-like*) (75). Otros estudios identificaron la interacción entre dos factores transcripcionales intestinales, Cdx1 y Cdx2, en el contexto de la regulación de la expresión de IAP. Vieron que Cdx1 activa el gen de IAP a diferencia de Cdx2 que inhibe los efectos de Cdx1 (76). También se han descrito regulaciones epigenéticas para IAP. Por ejemplo, el butirato inhibe la histona deacetilasa, regulando la expresión de la IAP de manera dependiente de KLF5 (77). Por el contrario, las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  provocan específicamente la inhibición la región promotora de IAP (78).

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.4. Estructura

Las APs son enzimas homodiméricas que contienen metales en el sitio catalítico. Cada monómero contiene dos iones de zinc y uno de magnesio necesarios para su actividad (43). Durante muchos años, la AP de la bacteria *Escherichia coli* fue la única estructura cristalográfica que se conocía. La obtención de la estructura de una AP de mamífero en 2001 (79), concretamente la de PLAP, mostró que consiste en una lámina  $\beta$  rodeada de dos  $\alpha$ -hélices a los lados. PLAP es un dímero formado por monómeros de 484 residuos, cuatro átomos de metal, un ion fosfato y moléculas de agua. La estructura de las isoenzimas GCAP, IAP y TNAP (ordenadas según su similitud estructural de mayor a menor) se construyó a partir de la estructura de PLAP utilizando el método de alineación de secuencias. GCAP e IAP muestran un 98% y 87% de identidad frente a PLAP, respectivamente, mientras que TNAP y PLAP muestran una identidad del 57% y una homología del 74% (80).

Solo algunos de los residuos del centro activo se conservan al comparar las enzimas AP de diferentes especies. No obstante, el residuo Ser se conserva en todas ellas. Los ligandos de los iones metálicos también tienen funciones conservadas. La fracción N-terminal de uno de los monómeros envuelve al segundo monómero, aportando propiedades alostéricas a la enzima. El dominio corona (Figura 1), parte flexible que queda en la parte superior de la AP, contiene residuos importantes para la estabilización de inhibidores (81,82) o para conferirle estabilidad al calor (83).



**Figura 1. Estructura tridimensional de PLAP.** Representación del monómero A (en amarillo) y el B (en azul), sitio catalítico, dominio corona, extremo N-terminal y sitio de anclaje GPI (43).

La AP contiene cadenas de carbohidratos que, en el caso de la isoenzima no específica de tejido, tienen mucha importancia debido a que influyen en su actividad catalítica. A nivel proteico, la secuencia aminoacídica de TNAP es la misma (507 aminoácidos), a pesar de que el RNA mensajero del que provienen estas proteínas es diferente dependiendo del exón que se haya traducido: exón 1A para hueso o exón 1B para hígado y riñón. No obstante, las distintas isoformas de TNAP difieren en las modificaciones de glicosilación postraduccionales (84). La secuencia de *ALPL* sugiere 5 puntos de N-glicosilación, siendo N140, N230, N271, N303 y N430 (85). Se ha visto que la TNAP hepática y ósea están N-glicosiladas, y que solamente la ósea está O-glicosilada, mientras que la hepática se encuentra únicamente N-glicosilada. El patrón de glicosilación de las isoformas de TNAP influye significativamente en las propiedades catalíticas de la enzima, provocando, además, diferente sensibilidad a ciertos inhibidores (86).

En organismos vertebrados, estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana plasmática mediante glicosil-fosfatidil-inositol (GPI)

## INTRODUCCIÓN

(Figura 1). La estructura de fosfatidilinositol es un ancla de fosfatidilinositol-glicolípido que se une covalentemente al extremo C-terminal de la proteína a través de un enlace amida (87).

### 1.1.5. Propiedades enzimáticas

#### 1.1.5.1. Especificidad de sustratos

Las APs tienen una amplia especificidad y tienen la capacidad de hidrolizar una variedad de sustratos *in vitro*, aunque solo algunos de estos se han descrito como sustratos naturales de las isoenzimas de AP.

Uno de los sustratos más estudiados de la TNAP es el pirofosfato inorgánico (PPi) debido a que la función principal de esta isoenzima en el hueso consiste en hidrolizarlo para mantener una concentración adecuada de este y así garantizar una correcta mineralización ósea (2).

También se ha descrito como sustrato natural de la TNAP el piridoxal-5'-fosfato (PLP), presente en sangre obtenida a partir de la ingesta de alimentos que lo contengan. La TNAP hidroliza el PLP extracelular permitiendo a su forma desfosforilada (piridoxal) atravesar la barrera hematoencefálica, donde servirá como cofactor de enzimas en la formación de neurotransmisores (88).

Por otro lado, se ha descrito la actividad nucleotidasa de las APs, papel importante para sistema purinérgico, dado que estas enzimas pueden desfosforilar nucleótidos trifosfato a nucleósidos de forma secuencial (89). Este papel ectonucleotidasa de las APs se ha visto relacionado en diferentes procesos biológicos en diversos tipos celulares, como las células neuronales NG108-15 (90), en las vías respiratorias humanas (91,92) y en las neuronas del hipocampo (93).

Recientemente se ha puesto de manifiesto el papel crítico de la TNAP mitocondrial en la termogénesis mediante la desfosforilación de la fosfocreatina (5).

Las APs también tienen funciones metabólicas. Se ha constatado que la TNAP actúa sobre sustratos como la fosfocolina, cuya desfosforilación es necesaria para la captación de colina en el hígado y generar así fosfatidilcolina (8,94).

Por último, se ha demostrado que las isoenzimas de AP son capaces de hidrolizar LPS bacteriano y otros componentes como el DNA CpG (citocina fosfo guanina) o flagelina por desfosforilación (14,15,95–97).

### **1.1.5.2. Inhibición enzimática**

A partir de los años 60 se han descubierto numerosos inhibidores de las distintas isoenzimas de AP. Se describió cómo los L-aminoácidos como L-fenilalanina, L-triptófano, L-leucina y L-homoarginina, o compuestos no relacionados, como levamisol y teofilina, son capaces de inhibir las APs de forma incompetitiva. Sin embargo, las APs responden de forma diferente a los inhibidores a causa de los diferentes residuos aminoacídicos entre las isoenzimas y de los distintos patrones de glicosilación (Tabla 2). Las isoenzimas específicas de tejido (IAP, PLAP y GCAP) son sensibles a la inhibición por L-fenilalanina pero no por L-homoarginina, mientras que con la isoenzima TNAP el perfil se invierte (98,99). El levamisol ha sido el inhibidor más específico de la TNAP (conjuntamente con el tetramisol), aunque recientemente se han desarrollado nuevos inhibidores (ver más adelante). Cabe mencionar que las distintas glicosilaciones en la TNAP afectan a su sensibilidad frente a ciertos inhibidores. Concretamente, las isoformas ósea y renal de TNAP son sensibles a la inhibición por levamisol, mientras que la

## INTRODUCCIÓN

isoforma hepática y la IAP son resistentes, pudiendo incluso verse potenciada dicha actividad (9).

**Tabla 2. Sensibilidad de las APs a L-fenilalanina, L-homoarginina, levamisol y teofilina.**

	<b>L-Fenilalanina</b>	<b>L-Homoarginina</b>	<b>Levamisol</b>	<b>Teofilina</b>
<b>IAP</b>	Sensible	Resistente	Resistente, incluso potenciado	Resistente
<b>PLAP</b>	Sensible	Resistente		Resistente
<b>GCAP</b>	Sensible	Resistente		Resistente
<b>TNAP</b>	Resistente	Sensible	TNAP ósea/renal – Sensible TNAP hepática - Resistente	Sensible

El levamisol, a pesar de ser el inhibidor comercial más potente, no puede utilizarse *in vivo* porque sería necesaria una concentración de orden de milimolar para que surtiera efecto. Además, estos inhibidores clásicos no son compuestos específicos de una isoenzima y muestran una inhibición débil. Por ello, han desarrollado una gran variedad de moléculas análogas del levamisol que reemplazan el grupo fenilo, como tiofenos (100), benzotiofenos (101) y benzofuranos (102). En general, se ha observado que estos compuestos modificados presentan una potencia modesta. En consecuencia, se han intentado desarrollar y optimizar inhibidores biodisponibles por vía oral que además proporcionen una inhibición robusta de las isoenzimas *in vivo*. Por ejemplo, el inhibidor SBI-425 que se ha utilizado para esclarecer el papel de la TNAP en esta tesis doctoral mostró ser un inhibidor potente y selectivo de TNAP tras su administración vía oral (103).



Concretamente, estudios preclínicos muestran como el SBI-425 reduce la calcificación ectópica en modelos animales (104).

Actualmente se están llevando a cabo estudios con el inhibidor DS-1211 de TNAP patentado en 2017 (WO2017007943A1), el cual ha mostrado características adecuadas para la aplicación clínica y ha sido empleado en humanos con resultados satisfactorios (105). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* muestran a este inhibidor como un inhibidor de TNAP potente y selectivo en múltiples especies animales y modelos (106).

### **1.1.5.3. Termoestabilidad**

PLAP es la isoenzima con mayor estabilidad térmica, ya que no sufre inactivación a temperaturas inferiores a 75 °C en presencia de magnesio  $10^{-2}$ M. Sin embargo, las demás isoenzimas pierden más del 50% de actividad al someterlas a temperaturas de 56°C durante 30 minutos. Aunque la IAP es más termoestable que la TNAP, ambas son inactivadas rápidamente a temperaturas superiores a 65°C. Cabe mencionar que entre las isoformas de TNAP, la isoforma hepática es más termoestable que la ósea (107).

### **1.1.6. Isoenzimas de fosfatasa alcalina**

En mamíferos existen cuatro isoenzimas: tres específicas de tejido, que son la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), la intestinal (IAP) y la germinal (GCAP), y una no específica de tejido (TNAP), la cual abunda en hígado, hueso y riñón.

#### **1.1.6.1. Fosfatasa alcalina placentaria**

PLAP está presente en la placenta y sus niveles varían durante el embarazo, de forma que son bajos en los primeros meses y aumentan

## INTRODUCCIÓN

hasta llegar a 250 ng/ml en el tercer trimestre. Sin embargo, la preeclampsia, la diabetes o el retraso del crecimiento uterino pueden provocar una disminución en los niveles de PLAP en comparación con las mujeres sanas, pudiendo afectar al desarrollo del feto (108). Recientemente se ha constatado que los niveles de PLAP en el líquido cefalorraquídeo pueden tener un papel decisivo en el diagnóstico diferencial de los tumores intracraneales de células germinales (109). Por otra parte, se ha descrito que existe una alteración en la expresión de esta isoenzima en mujeres embarazadas fumadoras (110) y en individuos con cáncer de ovarios o de testículos (111). Por el contrario, se han observado niveles bajos PLAP en la placenta de mujeres con enfermedad de Chagas (112,113).

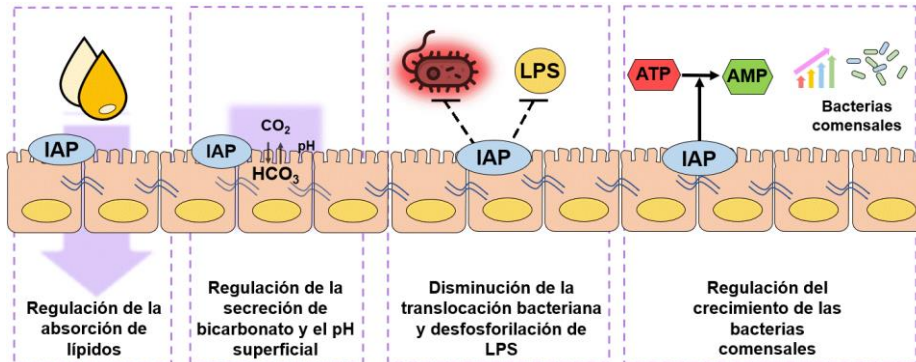
### **1.1.6.2. Fosfatasa alcalina germinal (GCAP)**

Esta isoenzima se expresa en células germinales, tejidos embrionarios y neoplásicos y en la placenta. En los testículos, la GCAP se localiza en la membrana celular de las células inmaduras germinales, unida mediante GPI. Se ha detectado la expresión del gen GCAP en células de coriocarcinoma humano (114).

### **1.1.6.3. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)**

En roedores, a nivel de RNA mensajero, la IAP se expresa abundantemente en el duodeno, yeyuno e íleon, mientras que apenas se expresa en colon. Concretamente, en el intestino delgado de roedores sanos los niveles de mRNA y actividad de IAP están íntimamente relacionados con el grado de diferenciación de las células epiteliales intestinales (IEC), siendo mayores los niveles en células de las vellosidades (115). Por ello, la IAP suele utilizarse como marcador de diferenciación.

Las funciones más importantes en las que participa la IAP están recogidas en la Figura 2, aunque la importancia de esta isoenzima se basa en su implicación en la absorción de lípidos y sobre todo en la función de barrera intestinal.



**Figura 2. Funciones principales de la isoenzima IAP.**

**Regulación de la absorción de lípidos:** el ayuno reduce la actividad de la IAP, mientras que la administración de alimentos restaura los niveles (116), y se observa un incremento especial tras la ingesta de comida rica en grasa en roedores (10). En ratones, se ha descrito que la ausencia de *Akp3* (que codifica la dIAP) modula la transcitosis lipídica, provocando acumulación de grasa visceral y esteatosis hepática. Precisamente, los ratones *Akp3*<sup>-/-</sup> tienen una mayor ganancia de peso corporal y mayor transporte de ácidos grasos respecto a los ratones WT, por lo que los autores concluyeron que la IAP es un regulador negativo en la absorción de grasa en el intestino (117). Otros estudios detectaron un incremento de expresión de *Akp6* (gIAP) y *Cd36* (translocasa de ácidos grasos) junto con una mayor absorción de ácidos grasos (118,119). El transportador CD36 se expresa mayoritariamente en el yeyuno y su expresión está regulada por los ácidos grasos de la dieta (120,121). Se ha sugerido que la IAP puede modular la captación

## INTRODUCCIÓN

de ácidos grasos mediada por CD36 por los enterocitos, tanto directamente, al controlar el nivel de fosforilación de CD36, como indirectamente, al hidrolizar localmente el ATP extracelular producido por los enterocitos (11,12).

**Regulación de la secreción de bicarbonato y el pH superficial:** la mucosa duodenal está expuesta constantemente a un ambiente ácido, por lo que su protección mediante la capa de mucus y la secreción de bicarbonato es imprescindible. Se ha sugerido la existencia de un circuito regulado donde están involucradas la IAP, el ATP extracelular y el receptor purinérgico P2Y<sub>1</sub> acoplado a proteína G. Concretamente, a pH ácido en el duodeno, la actividad nucleasa de IAP es baja, lo que provoca una acumulación de ATP extracelular secretado por las IEC. Este ATP estimula los receptores P2Y<sub>1</sub>, que, a su vez, inducen la secreción de bicarbonato por los enterocitos. El bicarbonato neutralizará los protones del lumen presentes en ese pH ácido, generando así CO<sub>2</sub> que difundirá al enterocito, donde se convertirá en bicarbonato para su posterior secreción. El pH de la zona apical del enterocito aumentará y, en consecuencia, lo hará también la actividad ATPasa de la IAP, lo que provocará la disminución de concentración de ATP local, una menor estimulación del receptor P2Y<sub>1</sub> y una menor secreción de bicarbonato. Por lo tanto, la IAP regula el pH del duodeno y contribuye a la protección de la mucosa duodenal frente a los ácidos gástricos (12,13).

**Homeostasis intestinal:** el lipopolisacárido bacteriano (LPS) es abundante en el tracto gastrointestinal, puesto que está presente en las bacterias Gramnegativas. El lípido A y su estado de fosforilación determinan la toxicidad del LPS (122,123). Se ha descrito que la IAP es capaz de desfosforilar el LPS bacteriano reduciendo su toxicidad a nivel intestinal (14–17). De hecho, esto puede ser decisivo puesto que el

paso de antígenos bacterianos a sangre puede provocar inflamación sistémica y shock séptico (123). Estudios realizados en peces cebrá revelaron que en ausencia de microbiota (*germ free*) se observaba una incompleta diferenciación intestinal, con una drástica disminución de la expresión de la IAP (124). Sorprendentemente, se observó que la actividad IAP aumentaba con la introducción de bacterias gramnegativas o LPS (124). Por su parte, los ratones *knockout* para IAP presentan una menor cantidad de bacterias aerobias y anaerobias en heces en comparación con los WT (125). Además, la administración de IAP favoreció el crecimiento de bacterias comensales perdidas al administrar estreptomicina y redujo la colonización por la bacteria patógena *Salmonella typhimurium* (125). En ratas, la deficiencia de IAP en recién nacidos se asocia con disbiosis intestinal, incremento en la permeabilidad intestinal y translocación bacteriana (126).

#### **Desfosforilación de nucleótidos y otras moléculas de carácter**

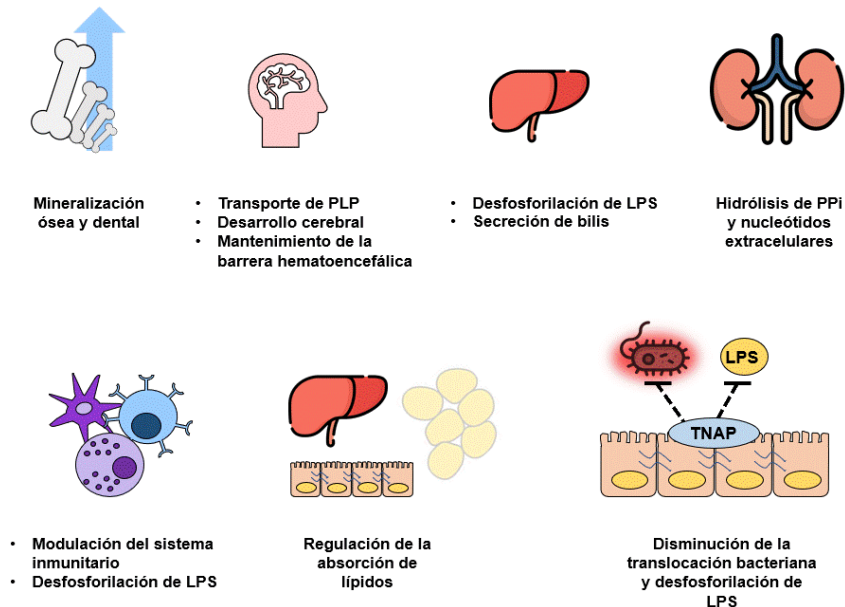
**inflamatorio:** la IAP es capaz de desfosforilar nucleótidos con actividad proinflamatoria como ATP (18) y UDP (19), así como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), entre los que se encuentran la flagelina y CpG DNA (15). Varios estudios han demostrado que elevadas concentraciones de ATP conducen a una menor diversidad bacteriana e inhibe el crecimiento de bacterias comensales. La desfosforilación del ATP por la IAP provoca un aumento significativo en el crecimiento de bacterias comensales en el intestino (127).

#### **1.1.6.4. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)**

La TNAP se expresa, además de en hígado, hueso y riñón, en infinidad de tejidos y células, como tejido adiposo (128), intestino (9), células del sistema inmunitario (6), células acinares (129) o cerebro, y está involucrada en la desfosforilación de varios sustratos fisiológicos.

## INTRODUCCIÓN

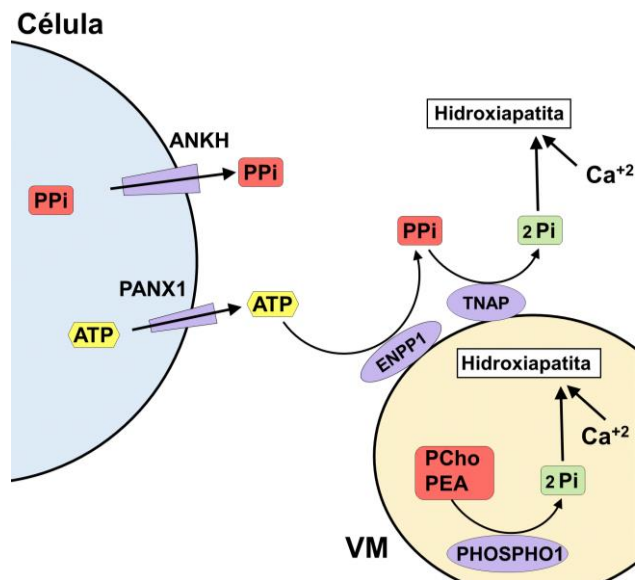
Además de participar en funciones fisiológicas vitales como la mineralización ósea y dental, el desarrollo neuronal y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, la TNAP tiene un papel antiinflamatorio (Figura 3). Así pues, se ha estudiado el papel de esta isoenzima en las siguientes funciones fisiopatológicas:



**Figura 3. Funciones fisiopatológicas de la TNAP.**

**Mineralización ósea y dental:** la TNAP ha sido ampliamente estudiada por su implicación en la mineralización ósea. La TNAP es la impulsora del proceso de la mineralización debido a su papel en la desfosforilación de los principales inhibidores de la mineralización, principalmente PPI (130), y también p-OPN (osteopontina) (2). La producción de Pi es necesaria para la formación de cristales de hidroxapatita junto con el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). El proceso comienza en el interior de las vesículas de la matriz (VM) donde participan varias enzimas, las cuales regulan la concentración de PPI y ATP en el ambiente extracelular (Figura 4). El acúmulo de PPI en el espacio extracelular se propicia por su paso

mediante la proteína de anquilosis transmembrana de paso múltiple (ANKH) y a través de la acción de la enzima ENPP1 (*ectonucleotidase pyrophosphatase phosphodiesterase 1*), que hidroliza ATP en el espacio extracelular dando PPI. El canal PANX1 promueve el paso del ATP al espacio extracelular, donde las enzimas ENPP1 y TNAP pueden desfosforilarlo (131). La enzima PHOSPHO1 (*phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase 1*) es necesaria para la formación de cristales de hidroxiapatita en el interior de las VM ya que esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfoetanolamina (PEA) y fosfocolina (PCho) para generar colina y etanolamina, además de Pi (132–134). A su vez, la TNAP participa en la desfosforilación de PPI, pero de manera no redundante ya que está unida a la membrana y actúa en el espacio extracelular (135).



**Figura 4. Proceso de mineralización ósea.** ANKH: proteína de anquilosis transmembrana de paso múltiple, PANX1: panexina 1, ATP: adenosina trifosfato, PPI: pirofosfato inorgánico, Pi: fosfato inorgánico, ENPP1: miembro de la familia 1 de la ectonucleotidasa pirofosfatasa/fosfodiesterasa, TNAP: fosfatasa alcalina no específica de tejido, PHOSPHO1: *phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase 1*, PCho: fosfocolina, PEA: fosfoetanolamina, VM: vesícula de la matriz.

## INTRODUCCIÓN

En este contexto, se ha estudiado la TNAP en profundidad por su papel en la hipofosfatasia (HPP), enfermedad hereditaria caracterizada por mutaciones en el gen *ALPL* que conllevan una pérdida de función de la enzima. Los pacientes con HPP acumulan P<sub>i</sub>, inhibiendo la mineralización ósea y por tanto pudiendo derivar a el crecimiento de los niños en raquitismo o provocando osteomalacia en adultos (2,130).

**Sistema nervioso central:** otro sustrato de la TNAP es el piridoxal-5'-fosfato (PLP, la forma activa de la vitamina B6) (136). La desfosforilación de PLP en sangre es necesaria para formar piridoxal, que se transportará a células y se volverá a fosforilar mediante quinasas. En el interior de las células el PLP es fundamental para la síntesis de neurotransmisores como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) o la serotonina (137). En ausencia de TNAP, como es el caso de la HPP en humanos o en modelos animales (ratones *Alpl<sup>-/-</sup>*), se han observado mayores niveles de PLP en sangre, una menor síntesis de GABA y episodios de ataques epilépticos. Los ratones *knockout* para TNAP sufren ataques epilépticos y mueren pasados unos días de vida (88). Sin embargo, la administración de vitamina B6 o de piridoxal retrasa la aparición de ataques epilépticos y prolonga la vida de estos ratones, lo que sugiere que la acción de TNAP es fundamental (138). En humanos, la presencia de TNAP en vasos cerebrales sugiere un papel en el transporte activo a través de las células endoteliales capilares y en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (139,140). La TNAP participa en la desfosforilación de PLP en sangre y el transporte del piridoxal a través de la barrera hematoencefálica.

La TNAP juega un papel importante en el desarrollo y las funciones del cerebro. Durante el desarrollo, se ha observado actividad TNAP en la sustancia gris y blanca del cerebro (141). Además, en roedores, la implicación de la TNAP en la neurogénesis se mantiene también en la



edad adulta (142). En niños con HPP se han detectado múltiples anomalías neuroanatómicas, como hipodensidad de la sustancia blanca, encefalopatía multiquistica, ventrículos dilatados (143–147). A su vez, en ratones deficientes en *Alpl* se describieron anomalías en la mielinización y disfunción sináptica (148,149).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la contribución de la TNAP en el desarrollo del cerebro: la interacción o desfosforilación de proteínas de la matriz extracelular (laminina o colágeno) (79,150), su interacción con la proteína priónica celular (PrPc) (151), la desfosforilación de PLP modulando la síntesis de GABA, serotonina y dopamina (88,152,153), o la implicación de su función ectonucleotidasa involucrada en la formación y crecimiento de axones (93), entre otros.

**Desfosforilación de LPS en el hígado:** al igual que la IAP, se ha descrito el papel de la TNAP en la detoxificación de LPS circulante. Poelstra y col. demostraron la capacidad de desfosforilación de LPS por parte de la TNAP. En concreto, la utilización del inhibidor levamisol redujo significativamente la supervivencia de las ratas tras la inyección de la bacteria gram negativa *E.coli* por vía intraperitoneal (154). Además, en estudios *in vivo*, la actividad AP se vio incrementada en hepatocitos en presencia de LPS (96). Ciertos hallazgos sugieren la participación de TNAP en la desfosforilación de LPS para mitigar las complicaciones en el embarazo inducidas por LPS o bacterias Gram negativas (155).

**Riñón:** la función de la TNAP en el riñón está relacionada con la hidrólisis de PPI y nucleótidos extracelulares. La ratio Pi/PPI juega un papel crucial en el proceso de calcificación arterial renal. Un nivel elevado de Pi sérico induce a este proceso de calcificación, ya que el Pi se incorpora a los cristales de hidroxiapatita, mientras que el PPI es un potente inhibidor de la calcificación (156). Por tanto, la imposibilidad

## INTRODUCCIÓN

de acumular PPI conduce al desarrollo de calcificación arterial (157,158). Por ejemplo, los pacientes con enfermedad renal crónica presentan calcificaciones en la arteria renal y defectos en la mineralización ósea a causa de una hiperfosfatemia (159). Ciertos estudios llevados a cabo en roedores han revelado que la inhibición de TNAP con SBI-425 incrementa los niveles de PPI (103) de tal forma que previene el desarrollo de la calcificación de arterias (104,160–163).

**Tejido adiposo:** se ha relacionado la actividad de TNAP con la acumulación de lípidos y en el proceso de adipogénesis (164). En este estudio se observó una disminución de la actividad de TNAP y acumulación de lípidos en presencia de los inhibidores de TNAP levamisol e histidina. De la misma manera, en preadipocitos humanos primarios de mama se vio la disminución de la adipogénesis tras la inhibición de TNAP (165). Además, la localización de la TNAP en las membranas que rodean las gotas de lípidos sugiere su implicación funcional en el control de la acumulación de lípidos (164,165). Por otra parte, la ausencia de TNAP en adipocitos moduló la expresión de los genes de adiponectina, leptina y FABP4 (166).

**Secreción de bilis:** en el hígado, la TNAP se localiza en la membrana del canalículo de los hepatocitos y en el área apical del citoplasma de las células epiteliales de los conductos biliares (167–169). En este contexto, la TNAP hepática puede ser secretada al lumen junto con la bilis, con fragmentos de hepatocitos o colangiocitos (170). Además de la TNAP hepática, la isoforma ósea también se libera de los huesos a sangre, contribuyendo a la presencia de la TNAP en plasma. Se ha observado un aumento en los niveles de TNAP hepática en sangre en casos de colangitis, lo que sugiere que la TNAP participa en la secreción de bilis (171). Además, investigaciones adicionales han sugerido que la TNAP, al igual que la IAP, podría estar involucrada en

la regulación del pH de la bilis debido a su capacidad para desfosforilar ATP (172).

**Metabolismo hepático:** la presencia de TNAP en las células endoteliales de las arterias hepáticas sugiere funciones asociadas con la desfosforilación de moléculas circulantes (169). Un posible sustrato de TNAP en hígado es CD36, ya que en presencia de niveles altos de glucosa o ácidos grasos se observó el aumento de TNAP junto con CD36 (173,174). Además, la inhibición de TNAP con levamisol o mediante siRNA redujo la acumulación de triglicéridos (128,174). Se ha descrito el papel de TNAP en la desfosforilación de fosfocolina, necesaria en el hígado para la producción de VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) (8,175).

**Intestino:** nuestro grupo de investigación observó un incremento en la expresión de la TNAP en el colon de ratas en diferentes modelos de EII (9,14,31). Este incremento de TNAP se asoció no solo al flujo de leucocitos al sitio de inflamación, sino también al incremento en la expresión de esta enzima en las propias células epiteliales. Es más, se demostró que el incremento de la actividad está acompañado de un cambio en el patrón de glicosilación, concretamente de tipo hepático en condiciones basales a tipo óseo-renal en condiciones de inflamación (9), lo que podría contribuir a la defensa en el intestino.

**Señalización purinérgica:** la TNAP es capaz de desforforilar ATP y ADP para obtener adenosina monofosfato (AMP), por lo que esta enzima es considerada como un importante modulador de la señalización purinérgica celular (176).

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.7. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina

La medida de los niveles de fosfatasa alcalina en suero es una determinación que se suele realizar como control de rutina. En la clínica se usa para detectar enfermedades hepáticas y óseas.

El rango normal de AP en suero es de 44-147 unidades internacionales por litro (UI/L). Pueden observarse incrementos de AP en suero por diversas razones (hiperfosfatasa). Por ejemplo, durante el embarazo se incrementa la actividad de PLAP en el plasma de la madre (177), y puede verse un incremento de la isoforma TNAP ósea durante el crecimiento repentino en la pubertad (178). En otros casos, este incremento de la actividad AP puede ayudar a diagnosticar un daño en el tejido de liberación de esa isoenzima. Por ejemplo, observamos un mayor nivel de TNAP hepática en individuos con problemas hepáticos (168) o un mayor nivel de IAP en casos de enfermedad inflamatoria intestinal (179).

En algunos casos la hiperfosfatasa es más persistente. Por ejemplo, en la enfermedad de Paget juvenil se eleva la TNAP ósea debido al crecimiento desordenado del hueso (180,181). El síndrome de Mabry es un desorden neurodegenerativo posnatal moderado-severo, que se caracteriza por la aparición de ataques epilépticos y déficit cognitivo a consecuencia de mutaciones en genes responsables de la síntesis y anclaje de AP a la membrana (GPI), en el que la TNAP está aumentada en el plasma (182).

Por el contrario, cuando los valores de AP en plasma son inferiores a los normales se trata de hipofosfatemia, que puede deberse a desnutrición proteica, déficit de magnesio, hipotiroidismo, escorbuto o hipofosfatasa (183). Además de la HPP clásica, con descenso marcado de la actividad AP en plasma, ciertos pacientes presentan síntomas

más sutiles de la enfermedad que cursan con un fenotipo difuso. Nuestro grupo está colaborando con el grupo liderado por el Dr. Muñoz Torres de la UGR y el CIBERFES (Centro de Investigación Biomédica en Red Fragilidad y Envejecimiento Saludable).

### **1.1.8. Utilización farmacológica de la fosfatasa alcalina**

En los últimos años se han estudiado los beneficios de la suplementación con IAP en casos preclínicos y clínicos por su papel protector en varias enfermedades. Principalmente se ha descrito como herramienta protectora de la función de barrera intestinal. En primer lugar, se vio su papel protector en distintos modelos de colitis experimental. Precisamente, varios grupos han evidenciado que la administración oral de IAP a animales colíticos ejerce efectos protectores dando como resultado la atenuación de la liberación de citoquinas proinflamatorias, entre otras manifestaciones (97,184,185). Nuestro grupo de investigación administró IAP oral o intrarrectal a ratas en las que se indujo colitis experimental con TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico), observando también una reducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación colónica (14). Además de en estudios pre-clínicos, se ha demostrado que la administración de IAP puede mejorar los índices de la colitis ulcerosa en pacientes asociado con la reducción en proteína C-reactiva y calprotectina fecal (186). Además de LPS, la IAP es capaz de desfosforilar nucleótidos luminales promoviendo el crecimiento de bacterias comensales intestinales (187). Por lo tanto, como se ha demostrado en numerosos estudios, la administración de IAP puede constituir una gran herramienta frente a la protección de trastornos gastrointestinales.

## INTRODUCCIÓN

Por otra parte, la IAP participa en la defensa de la integridad de la barrera intestinal en otros modelos intestinales. Por ejemplo, se ha observado que la administración de IAP previene la fibrosis hepática causada por ligadura del conducto biliar común (CBDL) y la administración de cloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (188). Los autores del estudio relacionaron este efecto con una atenuación de la disminución de la expresión génica de proteínas de unión estrecha del intestino delgado y a la protección de la función de barrera intestinal. La eficacia de la terapia oral con IAP para preservar la función de barrera intestinal se ha descrito también en modelos de quemadura en ratones, viéndose una menor permeabilidad intestinal y un incremento de la expresión de proteínas de uniones estrechas (189). Además, recientemente se ha descrito que el tratamiento oral con IAP protege a ratones de la hepatotoxicidad y la esteatosis inducidas por el alcohol (190). De modo que la suplementación con IAP podría representar una terapia novedosa para prevenir enfermedades hepáticas. También se han realizado estudios en peritonitis y sepsis por punción de ligación cecal (CLP), demostrándose que la suplementación con IAP también reduce la permeabilidad intestinal en estos modelos (191,192).

Por otro lado, se ha asociado la suplementación oral con IAP a la prevención y mejora del síndrome metabólico inducido por una dieta alta en grasas en roedores (193).

Se ha utilizado también la IAP como tratamiento profiláctico en intervenciones quirúrgicas cardíacas (194) y como tratamiento en pacientes con daño renal agudo asociado a sepsis (195). En este sentido, se ha constatado que la IAP humana recombinante atenúa la respuesta inflamatoria provocada por la disfunción mitocondrial (196), lo que confirmaría el efecto antiinflamatorio protector a nivel renal que se había observado previamente en roedores (197) y humanos (198).

Con el objetivo de paliar alguno de los efectos de la hipofosfatasa se ha utilizado el reemplazo enzimático con TNAP. La utilización de ENB-0040 en niños, una proteína TNAP recombinante diseñada para conseguir una elevada especificidad de localización ósea que había sido probada en ratones *knockout*, con el resultado de una mejora en las manifestaciones de hipofosfatasa, se asoció con mejoras en los esqueletos de los niños y una mejor función pulmonar y física en bebés y niños con hipofosfatasa potencialmente mortal (199). Pocos años después, la utilización de otra enzima recombinante de TNAP, asfotasa, supuso una mejora en la prevención de manifestaciones óseas de pacientes con HPP de inicio perinatal/infantil o juvenil, logrado mejorar la estatura, fuerza y agilidad de los niños (200,201). Varios estudios han aportado recientemente resultados a largo plazo de la utilización de la asfotasa alfa. En general es bien tolerada, su tratamiento se asocia con la normalización de los sustratos de TNAP circulantes y mejora las capacidades funcionales en adultos y adolescentes con HPP de inicio pediátrico (202). Asimismo, en estudios realizados en pacientes con hipofosfatasa perinatal o infantil y administración de asfotasa alfa durante 7 años se manifiestan mejoras en la mineralización esquelética, además de resultados positivos en la función respiratoria, crecimiento, función cognitiva y motora (203). En diciembre de 2008 la asfotasa alfa (Strensiq®) obtuvo la designación de medicamento huérfano por la Comisión Europea para tratar la HPP de inicio pediátrico en “circunstancias excepcionales” (204). No fue hasta 2015 cuando fue aprobado como el primer tratamiento médico para la HPP en Japón y único en Canadá, la UE y EE. UU. (205).

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP

Los ratones genéticamente modificados pueden resultar de gran ayuda para dilucidar y entender la función de genes y proteínas. Los modelos más comunes son los animales *knockin* y *knockout*, pero nos centraremos en los *knockout* pues son los que se han utilizado para la realización de esta tesis doctoral.

Ratones *knockout* convencionales para TNAP: los grupos de investigación de Soriano (45) y Millán (148) han desarrollado ratones *knockout* para TNAP mediante recombinación homóloga, dando como resultado los ratones  $Alpl^{tm1Sor}$  y  $Alpl^{tm1Jlm}$ , respectivamente. Los animales TNAP<sup>-/-</sup> presentan altos niveles de los sustratos PPI y PLP, que eliminan por la orina. Concretamente, debido al metabolismo defectuoso de este último, aproximadamente a los 6 días de vida manifiestan un crecimiento deficiente y sufren ataques epilépticos, apnea y muerte antes de las dos semanas de vida (88). La administración de piridoxal reducía los ataques epilépticos y aumentaba la esperanza de vida de los ratones, lo que demuestra la relevancia de este mecanismo en la patología temprana (138). Además, el modelo animal TNAP<sup>-/-</sup> simula la hipofosfatasa infantil, mostrando mineralización ósea disminuida, desarrollo anormal de las raíces nerviosas lumbares, signos de apoptosis en el timo, timo apoptótico y alteraciones en el intestino y bazo (148). Por su parte, los ratones heterocigóticos (TNAP<sup>+/-</sup>) no presentan alteraciones fenotípicas obvias y fueron considerados originalmente normales. Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto que presentan diferencias funcionales que se traducen en respuestas alteradas en ciertos modelos de enfermedad, como pancreatitis, o en un comportamiento anómalo de determinados tipos celulares, como



linfocitos T, neutrófilos o células acinares (6,129). Por todo ello, en numerosas investigaciones incluidas esta tesis doctoral, se ha decidido utilizar ratones heterocigotos TNAP<sup>+/-</sup> para estudiar el papel de esta enzima debido a que son fértiles y viables.

Ratones *knockout* condicionales: Sonoko Narisawa y cols. (2015) generaron una línea de ratones Alpl<sup>flox/flox</sup> colocando los sitios loxP en los intrones 2 y 4, permitiendo la delección de los exones 3 y 4 y causando un desplazamiento del marco de lectura del exón 5 cuando se expresa la recombinasa Cre. La utilización de estos ratones en combinación con líneas transgénicas Cre apropiadas puede ser una herramienta con prometedora para estudiar el papel de la TNAP en todo tipo de células. En esta tesis doctoral se ha generado la línea Alpl<sup>flox/flox</sup>; Vill-Cre para el estudio del papel de la TNAP intestinal.

## **1.2. Función de barrera intestinal**

### **1.2.1. Composición y función**

La función de barrera intestinal es la capacidad del intestino para proporcionar una contención adecuada de los microorganismos y moléculas lumbinales, conservando la capacidad de absorber nutrientes. La capa epitelial separa físicamente el lumen del medio interno, encargándose del transporte de nutrientes, iones y otras moléculas. La secreción de mucinas, sIgA y péptidos antimicrobianos, además de la presencia de células del sistema inmunitario, refuerzan la barrera intestinal. Asimismo, la microbiota intestinal tiene un efecto protector frente a los patógenos intestinales y participa en el equilibrio del entorno luminal para mantener la homeostasis (207). Por lo tanto, la barrera intestinal es una estructura compleja formada por barreras físicas, bioquímicas, inmunológicas y microbianas.

## INTRODUCCIÓN

La alteración de la función de barrera intestinal, y en particular el incremento de la permeabilidad intestinal desempeña un papel crítico en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades, incluidas el hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que serán estudiadas en esta tesis doctoral.

### 1.2.1.1. Barrera física

La capa epitelial es el principal componente de la barrera intestinal. Las células del epitelio intestinal (IECs) componen la barrera física que mantiene los microorganismos en la luz intestinal mientras que se mantiene la capacidad de absorber nutrientes, agua y otras moléculas. Las IEC se mantienen unidas por el complejo de unión en la zona apical, que consiste en uniones intracelulares, entre las que se incluyen las uniones intracelulares estrechas (en inglés *tight junctions*, TJ), uniones adherentes y desmosomas. Las uniones adherentes y los desmosomas proporcionan fuerza adhesiva entre los enterocitos, sin determinar la permeabilidad paracelular. Las TJ constituyen un elemento fundamental de la barrera física intestinal, al ser las responsables de regular el paso paracelular de moléculas. Estas uniones están formadas por el ensamblaje de múltiples proteínas, como claudina, ocludina, tricelulina, la molécula de adhesión de unión A (JAM-A), y las proteínas de la placa intracelular como *zonula occludens* (ZO) y cingulina (208). Las claudinas están codificadas por una familia multigénica compuesta por al menos 24 miembros y cada proteína muestra un patrón de expresión tisular único. Se dividen en base a su función en dos grupos: las isoformas que forman una barrera selectiva y las isoformas formadoras de poros. Las claudinas 3, 4, 7 y 14 forman una barrera selectiva para moléculas e iones, mientras que las claudinas 2, 12 y 15 están relacionadas con la formación de poros y aumentan la permeabilidad intestinal (209). Las proteínas ZO interactúan con

muchas proteínas transmembrana a través de la región N-terminal, mientras que el extremo C-terminal interactúa con el citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas al citoesqueleto (208).

### **1.2.1.2. Barrera bioquímica**

Esta barrera está formada por péptidos antimicrobianos y otros mediadores solubles, cuya función es regular el equilibrio entre la tolerancia de bacterias comensales y la inmunocompetencia ante microorganismos patógenos. Las células de Paneth están altamente implicadas en la defensa del hospedador gracias a la producción y secreción de péptidos antimicrobianos como son las  $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas, lisozimas, fosfolipasas, lectinas tipo C como las *regenerating islet-derived protein* (REG) Reg3 $\gamma$  o Reg3 $\alpha$ , y también quimioquinas como CCL14 o CCL15 (210). Estas moléculas, además de su actividad antimicrobiana, presentan un vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa, generando por ejemplo, un gradiente quimiotáctico para las para las células del sistema inmunitario (211).

### **1.2.1.3. Barrera inmunológica**

Las células del sistema inmunológico participan en la defensa del organismo para combatir el paso de microorganismos, antígenos y patógenos al ambiente interno (212). El sistema inmunitario de la mucosa está compuesto por células polimorfonucleares infiltradas (neutrófilos mayoritariamente), monocitos, macrófagos, células dendríticas, células linfoides innatas (ILC), células B y células T. Los neutrófilos son reclutados a las zonas inflamadas, donde contribuyen a la reacción inflamatoria, además de limitar la actividad bacteriana, la invasión de la mucosa y la translocación. Los macrófagos y células dendríticas participan en la reparación tisular y en la tolerancia inmunológica en el intestino. Los macrófagos intestinales están

## INTRODUCCIÓN

continuamente expuestos a una presión antigénica, lo cual hace que tengan un comportamiento de tolerancia, manteniendo intacta su capacidad fagocítica y de destrucción microbiana (213). Sin embargo, en la inflamación, los monocitos son reclutados y contribuyen en la respuesta inflamatoria (214). Las ILC ejercen un papel relevante en procesos relacionados con la inmunidad inespecífica temprana y la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, entre otros procesos.

Las células del sistema inmunitario adaptativo ejercen un papel importante en la defensa del organismo. Esta respuesta está mediada por linfocitos T, que serán activados por células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presentin cells*), y por linfocitos B, que producen anticuerpos. El sistema adaptativo presenta un desarrollo más lento, ya que se lleva a cabo la expansión clonal de los linfocitos T y B con receptores específicos para un antígeno.

### **1.2.1.4. Barrera microbiana**

La relación huésped/microbiota en un individuo sano es homeostática, en la que el huésped proporciona nutrientes a la microbiota y un entorno estable, mientras que la microbiota ayuda en la maduración del tracto intestinal y prepara al sistema inmunitario, además de proporcionar nutrientes al huésped. Además, la microbiota intestinal ofrece protección frente a la invasión de patógenos (207).

### **1.2.2. NAFLD: eje intestino-hígado**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) es la afección crónica hepática más común a nivel mundial. Los mecanismos implicados en la aparición de la enfermedad son complejos y multifactoriales. La patogénesis de NAFLD ha sido descrita como la suma de dos eventos: el primero es la

acumulación de lípidos en el hígado causada por una dieta grasa, obesidad o resistencia a la insulina, y el segundo, la inflamación, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo que se genera a consecuencia del primer hito. Sin embargo, dado que esta hipótesis no es capaz de explicar por completo los cambios metabólicos y moleculares que se dan en la patología de esta enfermedad, se ha aceptado la teoría del impacto múltiple para explicar la patogenia de NAFLD. En esta teoría, se consideran la resistencia a la insulina, la microbiota y los factores genéticos y ambientales junto con el característico acúmulo de grasa hepático. Además, la alteración de la función de barrera intestinal puede desempeñar un papel importante en la patogenia de la enfermedad, tanto en el inicio como en la progresión del daño hepático y extrahepático.

### **1.2.2.1. NAFLD: generalidades**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico es la principal manifestación hepática del síndrome metabólico, así como la enfermedad hepática crónica más frecuente en países occidentales, con una prevalencia global de aproximadamente el 25% en la población adulta, especialmente en personas con obesidad y diabetes (20–22). La NAFLD se define por la presencia de esteatosis, que se caracteriza por el almacenamiento de triglicéridos en el citoplasma de hepatocitos, en asociación con factores de riesgo metabólicos (en particular, obesidad y diabetes de tipo 2), en ausencia de un consumo excesivo de alcohol ( $\geq 30\text{g/día}$  para hombres y  $\geq 20\text{g/día}$  para mujeres) u otras enfermedades hepáticas crónicas. Concretamente, se considera esteatosis cuando más del 5% del hígado contiene depósitos de grasa (215). Mientras que la mayoría de los pacientes con NAFLD presentan la enfermedad de forma asintomática, ciertos individuos pueden presentar una forma más agresiva de esta enfermedad y desarrollar

## INTRODUCCIÓN

esteatohepatitis no alcohólica (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis*, NASH), mostrando inflamación, fibrosis y daño hepático, además del característico almacenamiento de grasa. A pesar de que la esteatosis puede no ser progresiva, los pacientes tienen un mayor riesgo de derivar a una etapa de enfermedad hepática avanzada, como la cirrosis o el carcinoma hepatocelular (216), así como de enfermedad cardiovascular, siendo esta la principal causa de muerte en pacientes con NAFLD.

Como se ha indicado, la esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación reversible de grasa en los hepatocitos. Este fenómeno puede ser debido a (1) un mayor suministro y absorción de lípidos por parte de los hepatocitos a causa de una ingesta excesiva o a la liberación de las reservas de tejido adiposo; (2) aumento de la lipogénesis *de novo* (biosíntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el citoplasma de los hepatocitos); (3) una menor biosíntesis y liberación de VLDL a sangre; y (4) una menor tasa de eliminación de ácidos grasos debido a una alteración en la  $\beta$ -oxidación en hepatocitos. Es decir, la esteatosis ocurre cuando la tasa de importación y síntesis de ácidos grasos en los hepatocitos excede la tasa de exportación o catabolismo (217).

En las etapas iniciales del NAFLD existe una tasa elevada de  $\beta$ -oxidación y secreción de VLDL para compensar la entrada excesiva de ácidos grasos al hígado (218,219). Una entrada sostenida de ácidos grasos al hígado, junto con una inapropiada lipólisis y una mayor lipogénesis *de novo*, superaría la capacidad metabólica. Ese desequilibrio en el metabolismo lipídico conduce a la formación de lípidos lipotóxicos que contribuyen a la producción de estrés oxidativo, activación del inflammasoma y muerte de las propias células, lo que genera una respuesta inflamatoria asociada a fibrogénesis y

regeneración tisular (220,221). Todo ello conduciría a un mayor daño hepático y finalmente a NASH. Los pacientes con NASH tienen una menor secreción de VLDL y menor oxidación de ácidos grasos que los pacientes con hígado graso (218,219). Por lo tanto, la patogenia de NAFLD parece estar basada en un círculo vicioso entre esteatosis, lipotoxicidad e inflamación que da como resultado complejas alteraciones en las características histopatológicas y bioquímicas del hígado.

### **1.2.2.2. Alteración de la barrera epitelial en la patogenia de NAFLD**

Tanto la pérdida de la integridad de la barrera intestinal como la disbiosis contribuyen a NAFLD. La modificación de las uniones estrechas está estrechamente relacionada con la aparición y desarrollo de NAFLD. Concretamente, los pacientes con NAFLD muestran una menor expresión de ZO-1 y ocludina, que se correlaciona negativamente con los niveles de transaminasas (23). También se ha observado que la pérdida de proteínas de adhesión (JAM-A) conduce a un aumento de la permeabilidad intestinal en ratones alimentados con una dieta rica en grasas saturadas, fructosa y colesterol (24). Estudios de metaanálisis revelaron que los pacientes con NAFLD exhiben un aumento de la permeabilidad intestinal en comparación con personas sanas, detectado por niveles de zonulina sérica y pruebas de absorción de azúcar (222). Además, numerosos estudios clínicos revelan la asociación entre el aumento de la permeabilidad intestinal y NAFLD-NASH (25,26), asociados directamente con mayores niveles de endotoxina en plasma (27–29).

En consecuencia, el aumento de la permeabilidad intestinal conduce a un aumento de la translocación bacteriana, produciendo efectos hepatotóxicos a través de la activación de TLR4, dando como resultado

## INTRODUCCIÓN

el inicio de una cascada de respuestas inmunitarias innatas proinflamatorias. En este ambiente, los macrófagos activados liberan citoquinas inflamatorias y las células dendríticas estimulan la diferenciación de células T, activando la respuesta inmunitaria adaptativa. Todo ello causa un estado inflamatorio en el hígado. A través de la vena porta pueden llegar al hígado LPS, PAMPs y DAMPs (*Danger Associated Molecular Pattern*) e inducir inflamación mediante los receptores TLR4.

Por otro lado, la microbiota intestinal puede jugar un papel importante en la patogénesis de NAFLD, por ejemplo, en presencia de un alto número de bacterias productoras de etanol (223–225). El alcohol producido por estas bacterias compromete la integridad de la barrera intestinal, promoviendo una respuesta inflamatoria. Diversos estudios han evidenciado que existe una firma de la microbiota fecal puede permitir la detección de pacientes NAFLD con fibrosis avanzada (226) y cirrosis (227). Sin embargo, no está claro si la disbiosis observada en NAFLD es una consecuencia de los cambios en la dieta asociados a la enfermedad o si es realmente relevante para el desarrollo de esta.

### **1.2.3. Enfermedad inflamatoria intestinal**

#### **1.2.3.1. Generalidades**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un desorden inflamatorio crónico y recurrente asociado a una respuesta inmunológica alterada, en el cual el paciente pasa por periodos de inflamación y remisión. La EII abarca dos formas clínicas: la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) (228). A pesar de que tienen un mecanismo fisiopatológico global común y pueden resultar muy similares a nivel clínico, existen diferencias a nivel anatomopatológico y al tipo de respuesta inmunológica.



La enfermedad de Crohn puede manifestarse en diversos segmentos que abarcan desde la cavidad bucal hasta el ano, principalmente de forma transmural y parcheada, es decir, puede verse afectado todo el grosor de la pared intestinal y puede aparecer de manera simultánea en varios segmentos del intestino (229). La sintomatología varía en función de la ubicación del segmento intestinal afectado. En términos generales, los pacientes experimentan síntomas como dolor abdominal recurrente, diarrea, fiebre, pérdida de peso, así como la posible aparición de estenosis, abscesos o fístulas en el intestino (230). Los segmentos inflamados del intestino de los pacientes con enfermedad de Crohn se caracterizan por su rigidez y engrosamiento, atribuibles a la presencia de fibrosis y edema. En situaciones de afectación transmural, pueden originarse fístulas (231,232). A nivel microscópico, la mucosa intestinal y la lámina propia presentan infiltración de células del sistema inmunitario.

En contraste, la colitis ulcerosa se distingue por una inflamación de naturaleza superficial que se limita únicamente a la mucosa y se restringe al colon. La clasificación de esta enfermedad varía según la extensión del segmento colónico involucrado: se habla de proctitis cuando se ve afectado solamente el recto, proctosigmoiditis en casos donde la inflamación abarca de 25 a 30 cm en dirección proximal desde el recto, colitis izquierda cuando está afectado el recto, sigma y colon ascendente, y pancolitis cuando se encuentra afectada la totalidad del colon. Algunos pacientes con CU pueden experimentar inflamación en la zona distal del íleon (conocido como *backwash ileitis*), dificultando así la realización de un adecuado diagnóstico diferencial entre EC y CU. Los pacientes con CU sufren dolor abdominal postprandial, diarrea con deposiciones mucosas, rectorragia y anorexia derivando en pérdida de peso o, si hablamos de pacientes pediátricos, retraso en el crecimiento. Cuando la sintomatología es muy intensa se utiliza la denominación de

## INTRODUCCIÓN

colitis ulcerosa fulminante. Además, si los síntomas perduran en el tiempo si ser controlados clínicamente, puede desembocar en un megacolon tóxico, que se caracteriza por una hemorragia intraluminal intensa y una notable fragilidad de la pared intestinal. En esta etapa, la única alternativa viable es la colectomía. Además, los pacientes con colitis ulcerosa pueden desarrollar complicaciones extraintestinales.

La mucosa en fase inflamatoria de un paciente con CU muestra hiperemia y hemorragias puntiformes. Conforme evoluciona el proceso inflamatorio surgen úlceras superficiales que tienden a extenderse y fusionarse llegando a afectar grandes áreas de la mucosa del colon. Frecuentemente también puede observarse la presencia de pólipos inflamatorios que pueden confundirse con adenomas. El estado del colon tiende a normalizar en fase de remisión, pero la mucosa permanece lisa, brillante, granulosa y atrófica. Sin embargo, en fases avanzadas de la enfermedad el colon presenta un aspecto fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con pérdida de las marcas haustrales (233). A nivel microscópico, en la lámina propia encontramos infiltraciones de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Además, se pierde la estructura normal de las criptas.

### **1.2.3.2. Incidencia**

La EII es una enfermedad que se da a nivel mundial (234). En el siglo XXI, la incidencia de EII se está estabilizando en la mayoría de los países del mundo occidental, mientras que la prevalencia de la EII ha aumentado en los países recientemente industrializados (235). De hecho, desde 1990, la incidencia ha ido en aumento en países de África, Asia y América del Sur, tanto para enfermedad de Crohn como para colitis ulcerosa (235). No obstante, estudios recientes han mostrado que Canadá tiene una de las mayores incidencias y prevalencias de EII

del mundo (236). Al ser una enfermedad crónica con una mortalidad relativamente baja, y que se diagnostica en individuos jóvenes, la prevalencia de EII aumenta con el tiempo, de modo que los nuevos casos se suman a la población a un ritmo significativamente mayor que la pérdida de pacientes. Una mayor concienciación, el mejor acceso a tecnología y atención médica y una mayor exposición ambiental asociada con la occidentalización de la sociedad han contribuido al aumento en la incidencia de la EII (237).

En el siglo XXI, la EII se considera una enfermedad global que puede manifestarse en cualquier región geográfica y dentro de cualquier raza o etnia (30). Durante el siglo XX, se consideraba principalmente una enfermedad de caucásicos con ascendencia europea, debido a que las tasas de incidencia más altas se encontraron en Europa occidental, Australia y América del Norte en comparación con una baja incidencia en países en desarrollo (30). Sin embargo, el aumento de casos en países recientemente industrializados ha cambiado el paradigma. Además, esta enfermedad puede ser diagnosticada en cualquier grupo de edad, pero se diagnostica con mayor frecuencia en la edad adulta temprana (235,236,238), y, en cuanto al sexo, el riesgo de ser diagnosticado con CU o EC es el mismo para mujeres y hombres (234).

### **1.2.3.3. Biología detrás la EII: genética, microbioma y factores ambientales**

La etiología de EII es desconocida y su patogenia no está completamente establecida aún. Estudios actuales sugieren que la enfermedad es el resultado de la alteración de la homeostasis del sistema inmunológico de la mucosa intestinal en personas genéticamente predispuestas (30). Es fundamental comprender la biología que está detrás de esta enfermedad para desarrollar

## INTRODUCCIÓN

estrategias que mejoren la calidad de vida de las personas que viven con EII, además de buscar nuevas herramientas de detección, tratamientos o vías de prevención.

La importancia de la genética en EII ha estado presente desde que, en 2001, se descubrió el primer gen relacionado con la EC, *NOD2*, gen relacionado en la respuesta inmunitaria a bacterias intestinales (239–241). Posteriormente, gracias a la secuenciación del genoma humano se han identificado más de 200 mutaciones asociadas con el desarrollo de EC y CU (242). Se han encontrado alteraciones en genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata, inmunidad adaptativa, la autofagia, la función de la barrera epitelial y las vías de defensa frente a microorganismos (242–244).

El microbioma intestinal tiene un papel muy importante en la patogenia de la EII (245,246). La composición de la microbiota de los pacientes con EII y de pacientes sanos es muy diferente. Sin embargo, dado que la microbiota de pacientes con EII se ha estudiado una vez se ha manifestado la enfermedad, no está claro si los cambios en la microbiota y respuesta inmunitaria son causa o efecto de la enfermedad (247). Estudios de metagenómica y *microarray* han mostrado la existencia de cambios en el perfil de la microbiota en los pacientes con EII: se observa una menor presencia de bacterias productoras de butirato (*Roseburia hominis* y *Faecalibacterium prausnitzii*), *Firmicutes*, *Bifidobacterium* y *XIVa Clostridia*; y un incremento en poblaciones como *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium* adherente-invasiva y *Proteus* (245,246,248–250).

Finalmente, numerosos estudios han insistido en la importancia de los factores ambientales en el desarrollo de la EII. Ciertos estudios respaldan la hipótesis de la higiene, y postulan que las personas que

viven con mascotas en la infancia, se crían en una región rural, tienen familia numerosa o beben leche sin pasteurizar muestran menos probabilidades de sufrir EII (251,252). Sin embargo, esta hipótesis no se da igualmente en todas las poblaciones, ya que en India la falta de higiene fue asociada al incremento de riesgo de padecer colitis ulcerosa (253). El tabaco se ha determinado como un factor de riesgo en el desarrollo de la EC, mientras que las personas que dejan de fumar tienen un mayor riesgo de padecer CU (254). Los anticonceptivos orales (255) y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos también se han relacionado con un mayor riesgo de padecer EII (256). Por el contrario, se ha descrito una disminución de la incidencia de la CU y una patología menos agresiva en pacientes sometidos a apendicectomía antes de los 10 años (257).

La dieta es el factor ambiental más estudiado en EII debido a su influencia en el microbioma. Dietas con mayor consumo de grasas y azúcares refinados, y menor porcentaje de fibras dietéticas provocan un gran cambio en el microbioma intestinal y pueden afectar al desarrollo de EII (258–261). Además, se ha demostrado que los endulzantes, emulsionantes, el consumo de alimentos procesados y la dieta rica en grasas pueden provocar inflamación en el intestino y pueden ser un factor de riesgo en el desarrollo de la EII, de la misma manera que la ausencia de estos alimentos pueden ayudar en la remisión de esta (262).

### **1.2.3.4. Alteración de la función de barrera intestinal en EII**

Los pacientes con EII muestran una estructura, función y composición alterada de las proteínas que componen las uniones entre los enterocitos (263), hito que se ha utilizado como un indicador pronóstico sensible de recaída en pacientes con EII quiescente (264,265).

## INTRODUCCIÓN

Sorprendentemente, no solo se detectó un aumento de la permeabilidad intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn, sino también en un subconjunto de familiares de primer grado (266). Estudios recientes han revelado la relación entre el aumento de la permeabilidad intestinal con el posterior desarrollo de EC, indicando que esta alteración de la barrera intestinal puede contribuir a la patogenia de EII y puede ser utilizada como biomarcador de aparición de EC (267).

En modelos experimentales, el modelo del sulfato de dextrano sódico (DSS) es el más utilizado. La administración del DSS provoca la disfunción de la barrera intestinal con cambios en la expresión en proteínas como ocludina, *zonula occludens-1* (ZO-1) y varias claudinas (268–270). La expresión alterada de las uniones además de la apoptosis epitelial contribuyen a la permeabilidad intestinal (268,270,271), sangrado severo y muerte (272). En protocolos de DSS agudos, se induce la depleción de las células caliciformes y menor producción de mucinas, erosión epitelial, ulceración e infiltración de granulocitos en la lámina propia y submucosa, provocando respuestas inmunitarias (268,272). En protocolos de DSS crónicos, los animales desarrollan hiperplasia o ampliación de la brecha entre la base de la cripta y la capa muscular, con presencia de linfocitos en la mucosa (272). Además, en ratones pueden aparecer criptitis y abscesos debido a la migración de neutrófilos, tal y como se encuentra en pacientes con EII (272).

Los pacientes con EII presentan un sistema inmunitario innato alterado (229): se observa un incremento de TLR4 y NOD2 en pacientes con EII, lo que daría lugar a una inflamación exacerbada o crónica (239,240,243).

### **1.2.3.5. Disfunción del sistema inmunitario en EII**

En la EII se da una respuesta inapropiada del sistema inmunitario hacia las bacterias y antígenos que se hallan en el intestino.

Primeramente, el reconocimiento antigénico y el procesamiento por parte de las células presentadoras de antígenos están alterados en la EII. Se ha demostrado que se genera una respuesta inflamatoria tipo Th1 y Th17 debido a un incorrecto reconocimiento antigénico de bacterias comensales por parte de las células dendríticas. Estudios realizados en humanos mostraron un aumento significativo en la expresión TLR2 y TLR4 en células dendríticas de pacientes con EII (273). Es más, las células dendríticas de tejido inflamado de pacientes con EC expresaron niveles elevados del marcador de maduración CD40, marcador que se redujo tras tratar a los pacientes con anti-TNF $\alpha$  (273). En células dendríticas humanas de pacientes con EII se ha observado también un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino, además de una respuesta anormal frente a antígenos bacterianos (274). Esta respuesta aberrante a estos antígenos puede provocar una activación repetida de ciertas células T memoria, lo que perpetuaría la inflamación (275,276).

Además, las IEC de los pacientes con EII sufren alteraciones, mostrando un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN $\gamma$  o TNF. Contribuyen también al mantenimiento de un estado de tolerancia intestinal y prevención de una inadecuada activación de células T CD4 (277). De hecho, se ha demostrado la existencia de una vía de presentación de antígenos a células T por parte de las IECs mediante CD1d (278).

## INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado, pacientes con EII muestran una incorrecta tolerancia central y periférica, de tal forma que las células T activadas persisten. De hecho, se ha trabajado en buscar terapias para corregir este defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas (279,280).

Con todos estos eventos, el paciente de EII desarrolla inflamación intestinal, que, al perpetuarse en el tiempo, da lugar a la inflamación crónica. En este ambiente, se genera un estado de desequilibrio entre las células T reguladoras y efectoras. Varios estudios han demostrado que existe un desequilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras (281,282).

En resumen, los cambios en la microbiota, acompañados por cambios en la composición del mucus, inducen una ruptura o alteración de la barrera epitelial intestinal. La translocación de bacterias desde la luz intestinal hacia capas interiores induce la activación de células T dendríticas y macrófagos, lo que provocará la infiltración de células T CD4 inflamatorias. Los pacientes con EII tienen un mayor contenido en células T inflamatorias Th1 y Th17, y un menor número de células T reguladoras. Las células T inflamatorias guiarán la función de las células innatas estimulando así una hiperreactividad constante hacia los antígenos bacterianos (283). Todo ello provocará daño en el tejido epitelial y una inflamación crónica.



## **2. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es esclarecer el papel de la TNAP en la fisiopatología hepática e intestinal. Basándonos en lo mencionado en la introducción, los objetivos concretos de la tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudiar la implicación de la TNAP en el desarrollo de esteatosis hepática mediada por lípidos de la dieta.
2. Estudiar el papel de la TNAP epitelial intestinal en condiciones basales.
3. Estudiar el papel de la TNAP epitelial intestinal en la colitis experimental inducida por DSS.



# **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1. Reactivos

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

### 3.2. Animales de experimentación

Los animales fueron mantenidos bajo estrictas condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon (hembras y machos separados) sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal (Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada). Para su alimentación, a menos que se indique lo contrario, se utilizó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014, Harlan Ibérica, Barcelona) y agua esterilizada *ad libitum*, exceptuando el caso del estudio de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS). Los estudios *in vivo* fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y de la Junta de Andalucía.

#### 3.2.1. Ratones heterocigotos para TNAP (TNAP<sup>+/-</sup>)

Se emplearon ratones C57BL/6 heterocigotos para el gen *Alpl* (B6.129S7-Akp2<sup>tm1Sor</sup>/J, denominados TNAP<sup>+/-</sup>) y sus compañeros de camada *wild type* (WT) como controles para los experimentos *in vivo* en el estudio del papel de la TNAP en el hígado. Como se ha indicado, los ratones *Alpl knockout* homocigotos no son viables más allá de unos pocos días (88). Los ratones fueron suministrados por Jackson Laboratory (Sacramento, CA, EE. UU.) y criados en la Unidad de Mantenimiento de la Universidad de Granada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.2. Ratones deficientes en TNAP en el epitelio intestinal ( $Alpl^{IEC-/-}$ )

Para los experimentos *in vivo* y *ex vivo* de la implicación de la TNAP en el epitelio intestinal, se cruzaron ratones C57BL/6J que tienen el gen *Alpl* flanqueado por secuencias flox (ratón,  $Alpl_{flox/flox}$ ) con ratones que expresan la enzima Cre, inducible por tamoxifeno, bajo el control del promotor de la villina Tg (*Vil Cre/ERT2*) 23Syr (*Vil-Cre*) (284). Los primeros fueron adquiridos en Jackson Laboratories (Sacramento, CA, EE. UU.) y los segundos fueron generosamente cedidos por la Dra. Sagrario Ortega (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) con permiso de la investigadora que los generó, la Dra. Sylvie Robine. De esta forma, se obtuvieron ratones  $Alpl_{flox/flox} -VilCre/ERT2$ , a los que denominaremos  $Alpl^{IEC-/-}$ . En estado basal, la recombinasa Cre se encuentra secuestrada en el citoplasma de las células por un receptor de estrógenos mutado. La administración de tamoxifeno permite que la recombinasa entre al núcleo y escinda parte del gen *Alpl*, haciendo que los ratones sean deficientes en *Alpl* únicamente en células del epitelio intestinal debido a que la expresión de la enzima Cre se encuentra bajo el control del promotor de la villina.

El cruce de ratones  $Alpl_{flox/flox}$  con ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ , genera no solo ratones *knockout* que presentan la enzima Cre, sino también ratones que no expresan la enzima, los cuales se utilizarán como controles (denominados, por simplificar, WT).

### 3.2.3. Genotipado de los ratones

#### **Extracción del DNA**

Para la determinación del genotipo, se extrajeron fragmentos de 2 mm de diámetro de las orejas de los ratones con un punzón, de forma que la posición del agujero identificara permanentemente al ratón a



genotipar. Los fragmentos se introdujeron en 75  $\mu$ l de una solución 25 mM NaOH y 0,2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se sometieron a 98°C durante 1 hora seguido de un enfriamiento a 15°C. A continuación, se añadieron 75  $\mu$ l de Tris HCl 40 mM a pH 5,5 para equilibrar el pH.

### **Genotipado de ratones TNAP<sup>+/-</sup>**

Se emplearon 2  $\mu$ l de la solución de DNA total obtenida para determinar el genotipo de los ratones por PCR convencional. Se añadieron 10  $\mu$ l de solución comercial REExtract-N-Amp<sup>TM</sup> PCR REady Mix y 2  $\mu$ l de cada cebador, siendo los cebadores sentido 5'-CTGGCACAAAAGAGTTGGTAAGGCAG-3' para el gen *wild type* y 5'-CCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGA-3' para el gen mutado, y el cebador antisentido común 5'-GATCGGAACGTCAATTAACGTCAAT-3'. La mezcla de PCR se ajustó con agua hasta un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo de PCR consiste en un ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de una secuencia 94°C-15s, 62°C-30s, 72°C-30s, y finalmente 72°C durante 10 min.

Los productos de PCR, junto con el marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) se analizaron en un gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) adicionando Midori Green (Nippon genetics, Japón) para su posterior visualización en transiluminador ultravioleta.

### **Genotipado de Ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup>**

Se empleó el DNA extraído de las orejas de los ratones para determinar el genotipo de los mismos por PCR convencional. Para la caracterización del genotipo Alpl<sup>flox/flox</sup>, se utilizaron los cebadores *Alpl* sentido 5'-GTTGCGATGTGTGAAGATGTCCTCG-3' y 2  $\mu$ l de *Alpl*

## MATERIAL Y MÉTODOS

antisentido 5'-CTTGGGCTTGCTGTGCCAGTAAC-3' a 0,1  $\mu$ M, permitiéndonos diferenciar entre el gen mutado (floxado) de *Alpl* de 263 pb del gen normal de 229 pb. La mezcla de PCR contenía 2  $\mu$ l del DNA extraído anteriormente, los cebadores y 10  $\mu$ l de REExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix™, ajustado con agua hasta un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo de PCR consiste en un ciclo inicial de 1 minuto a 94° 1 min, seguidos de 40 ciclos de una secuencia (30s-94°C, 30s-64°C, 30s-72°C) y 1 min a 72°C.

Para el genotipado del genotipo Villin-Cre la mezcla de PCR contenía un cebador del gen Cre sentido 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3' y un cebador del gen Cre antisentido 5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT-3' a 0,8  $\mu$ M. Además, se añadieron dos cebadores correspondientes a un control interno (beta-actina) a 0,8  $\mu$ M siendo sus secuencias las siguientes: cebador sentido 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3' y antisentido 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94° 3min, 35 ciclos de una secuencia (94°C-30s, 51,7°C-1 min, 72°C-1 min), y finalmente 72°C 2 min.

Los productos de PCR, junto con el marcador Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.), se analizaron en un gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x adicionando Midori Green (Nippon genetics, Japón) para su posterior visualización en transiluminador ultravioleta.

### **3.2.4. Comprobación de la recombinación del gen *Alpl* en el epitelio intestinal**

Se extrajo el ADN (JetFlex Genomic DNA purification Kit, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) de las células epiteliales del intestino delgado y colon de ratones tratados con tamoxifeno vía intraperitoneal durante

5 días consecutivos. Con el fin de comprobar la recombinación del gen *Alpl* y la consiguiente delección inducida del gen, se llevó a cabo una PCR convencional. La mezcla de PCR contenía 2,5 µl de buffer 10x, 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de dNTPs, 0,2 µl de Taq polimerasa, todas estas de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.), y 1 µl de ADN, ajustado a 25 µl con agua destilada estéril, y 1 µl de cada uno de los siguientes cebadores a 10 µM: 5'- TTGCCTGGAACCTGTTCACA-3' y 3'-ACATCGACGTGTACCTGACC-5'. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94 °C 5 min, 40 ciclos de una secuencia (62°C-2 min, 72°C-3 min, 94°C-1 min), una fase a 62°C 2 min y finalmente 72 °C 3 min.

Los alelos recombinados (415 pb) y no recombinados (1134 pb), junto con el marcador molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) fueron analizados en un gel de agarosa del 1,5% (p:v) en tampón TAE 1x adicionando Midori Green (Nippon genetics, Japón) para su posterior visualización con iluminación ultravioleta.

### **3.3. Experimentos *in vivo***

#### **3.3.1. Diseño experimental del estudio de la deficiencia en TNAP en hepatoesteatosis**

Para este estudio se utilizó igual número de ratones *wild type* y ratones heterocigotos para el gen *Alpl* (TNAP<sup>+/-</sup>). Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos que fueron alimentados durante 17 días con una dieta deficiente en colina y metionina (MCD) (TD. 90262) o una dieta control (TD. 94149) (Tabla 3), teniendo un seguimiento del peso durante ese periodo de tiempo. Ambas dietas tienen un porcentaje de grasa del 10% (p:p).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 3. Composición de la dieta control y la dieta MCD.**

	<b>g/Kg</b>	<b>Dieta control</b>	<b>Dieta MCD</b>
Sacarosa		443,597	455,294
Almidón de maíz		198,783	200,0
Aceite de maíz		100,0	100,0
Celulosa		30,0	30,0
Mezcla de minerales, AIN-76 (170915)		35,0	35,0
Fosfato de calcio dibásico		3,0	3,0
L-Alanina		3,5	3,5
L-Arginina HCl		12,1	12,1
L-Asparagina		6,0	6,0
L-Ácido aspártico		3,5	3,5
L-Cisteína		3,5	3,5
L-Ácido glutámico		40,0	40,0
Glicina		23,3	23,3
L-Histidina HCl, monohidratada		4,5	4,5
L-Isoleucina		8,2	8,2
L-Leucina		11,1	11,1
L-Lisina HCl		18,0	18,0
L-Metionina		8,2	-
L-Fenilalanina		7,5	7,5
L-Prolina		3,5	3,5
L-Serina		3,5	3,5
L-Treonina		8,2	8,2
L-Triptófano		1,8	1,8
L-Tirosina		5,0	5,0
L-Valina		8,2	8,2
Mezcla de vitaminas, Teklad (400600) + Citrato de dihidrógeno de colina		10,0 (1,4)	-
Mezcla de vitaminas A, D, E (83171)		-	5,0
Vitamina E (500 IU/g)		-	0,242
Palmitato de vitamina A (500.000 IU/g)		-	0,0396
Colecalciferol (vitamina D3) (500.000 IU/g)		-	0,0044
Etoxiquina (antioxidante)		0,02	0,02

### **3.3.2. Diseño experimental de la caracterización del fenotipo de los ratones $Alpl^{IEC-/-}$ en estado basal**

Se indujo la delección del gen mediante la administración intraperitoneal de 100  $\mu$ l de tamoxifeno (TMX) a 10 mg/ml en etanol/aceite de girasol (1:10) durante 5 días consecutivos. Se administró TMX tanto a los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  como a los ratones WT.

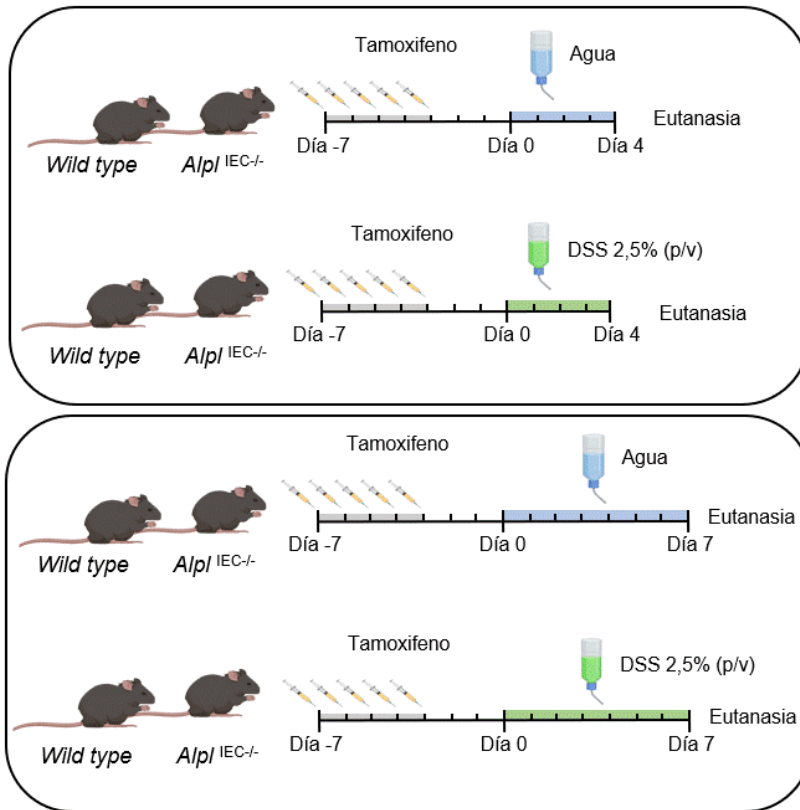
Para la caracterización del fenotipo basal de estos ratones se utilizó una cohorte de ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  y WT de al menos 5 experimentos independientes.

### **3.3.3. Diseño experimental del estudio del efecto de la delección de $Alpl$ en la colitis experimental**

Una vez administrado el tamoxifeno, se procedió a inducir colitis experimental. Para ello, se puso sulfato de dextrano sódico (DSS) en el agua de bebida durante 7 días a ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  ( $Alpl_{flox/flox}; VillCre+$ ) y a sus controles WT ( $Alpl_{flox/flox}$ ). En paralelo, un grupo control de cada genotipo recibió agua en vez de DSS. Tras 7 días de procedimiento los ratones fueron sacrificados para obtener las muestras biológicas.

Se llevó a cabo un modelo experimental alternativo en el que los ratones fueron sacrificados a día 4 y a día 7 para poder evaluar la colitis temprana y tardía (Figura 5).

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 5.** Diseño experimental en el estudio del efecto de la delección de  $Alpl$  en la evolución de la colitis experimental en ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ .

### 3.3.4. Evaluación patológica de los modelos in vivo

#### 3.3.4.1. Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo del hígado graso

Se realizó un seguimiento diario de la evolución del peso de los animales y se representó como porcentaje relativo al peso inicial de cada animal. Se monitorizó el nivel de glucosa a mitad del experimento (ver más adelante).

### 3.3.4.2. Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo de la colitis experimental inducida por DSS

La monitorización se realizó mediante el seguimiento diario de la evolución del peso representado como porcentaje relativo al peso inicial y conforme a los criterios que se recogen en el índice de daño de la enfermedad (DAI, *Disease Activity Index*) (Tabla 4). Para ello, se valoró la consistencia de las heces y la presencia de sangre con la prueba Hemocult-SENSA (Beckman Coulter, CA, EE. UU.) durante el desarrollo de la colitis.

**Tabla 4. Criterios de valoración del índice de daño de la enfermedad (DAI) en la colitis experimental por DSS.**

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

### 3.3.5. Obtención del plasma sanguíneo

Los ratones fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución compuesta por 24 mg/ml de ketamina (Ketamidol® Richter Pharma, Viena, Austria) y 1,6 mg/ml de xilacina (Nerfasin, FATRO, Barcelona, España). Una vez comprobada la anestesia en los ratones, se procedió a extraer sangre vía intracardiaca. Para ello se utilizó heparina de litio como anticoagulante (5000 UI/ml) y

## MATERIAL Y MÉTODOS

la sangre se depositó en tubos BD Microstainer PST LH (Becton Dickinson, NJ, EE. UU.). Las muestras se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos a 4°C. El plasma obtenido se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C.

### **3.3.6. Necropsia**

Después de la extracción de sangre y una vez comprobada la muerte del animal, se extrajeron los órganos de los ratones y se procesaron según la finalidad de los mismos.

#### Hígado

Se guardaron varios fragmentos para la extracción de RNA en *RNA later*, un fragmento en formaldehído al 4% para el estudio histológico y varios fragmentos congelados en nitrógeno líquido para el estudio de proteínas y la determinación de actividad fosfatasa alcalina.

#### Bazo

Se procedió a pesar el bazo para determinar la esplenomegalia típica del modelo de DSS. Se conservó un fragmento en *RNA later* y otro se congeló en nitrógeno líquido.

#### Colon

El colon fue fotografiado, lavado, medido y pesado. Se guardaron fragmentos trasversales del colon distal en formaldehído al 4% para el estudio histológico y en *RNA later* para la obtención de RNA. El resto de tejido fue picado, dividido en tubos, congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C.



### Hueso

Se obtuvieron la tibia y el fémur de los ratones de ambas patas traseras. Una vez limpias de piel y músculo, se sumergieron en solución salina. Tras eliminar la epífisis de ambos huesos, se introdujo una jeringa para arrastrar la médula del interior del hueso. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que el hueso quedó totalmente blanco, es decir, sin restos de médula.

### Intestino delgado

El intestino delgado fue extraído y dividido en duodeno, yeyuno e íleon. Cada segmento fue picado, dividido en tubos, congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C.

#### **3.3.7. Determinación de glucosa en sangre**

Se determinó utilizando tiras reactivas y un glucómetro (Accu-Chek, Aviva®, Roche, Barcelona, España) utilizando una pequeña muestra de sangre obtenida del extremo distal de la cola del ratón.

#### **3.3.8. Determinación de parámetros plasmáticos**

Se analizó la actividad de alanina aminotransferasa en muestras de plasma de ratones en ayunas. Los parámetros plasmáticos se midieron utilizando Metabolic Hormone Expanded Panel multiplex (ref. MMHE-44K, Merk Millipore, MA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El índice de la resistencia a insulina (HOMA-IR) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$HOMA - IR = \frac{glucosa \left( \frac{mg}{dl} \right) \times insulina}{405}$$

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **3.3.9. Estudio de la permeabilidad intestinal *in vivo***

Se administró a los ratones una solución de FITC dextrano 4 kD vía oral a una concentración de 40mg/100g de peso en PBS 4 horas antes del sacrificio de los animales. Se determinaron los niveles de FITC dextrano 4 kD ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el plasma de los ratones teniendo como referencia una curva de FITC dextrano disuelta en PBS:plasma (1:1, v:v), haciendo uso del fluorímetro FLUOstar-Control (Polarstar OPTIMA BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

### **3.3.10. Aislamiento de células intestinales epiteliales**

Para la obtención de células intestinales epiteliales (IEC) se limpiaron los fragmentos de intestino delgado y colon y se abrieron longitudinalmente. Se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) estéril y se cortaron en fragmentos de 3 mm. Los fragmentos se sometieron a dos incubaciones sucesivas con 20 ml de Hanks (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) suplementado con 5% (v:v) de suero bovino fetal (FBS), ditioneitol (DTT) 1 mM y EDTA 5 mM. Las células se filtraron por filtros de 70  $\mu\text{m}$  y se centrifugaron a 550 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras someterlas a un percoll 80:40 (v:v), se obtuvieron las IEC de la fase superior. Se centrifugaron a 550 g durante 5 minutos a 4 °C y se resuspendieron en solución salina.

### **3.3.11. Cuantificación de colina y sus metabolitos**

Para la extracción y determinación de los niveles de colina, fosfocolina, dimetilglicina (DMG), betaína, creatina y metionina se siguió el protocolo descrito por Koc y colaboradores (285). Para ello, se homogeneizaron las muestras de hígado (100 mg) en 1 ml de metanol/cloroformo (2:1, v:v), se agitaron vigorosamente durante 2 min

y se incubaron durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se centrifugaron a 1.500 g durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Se realizó una segunda extracción añadiendo 650  $\mu\text{l}$  de metanol/cloroformo/agua (2:1:0,8, v:v:v) al resto del tejido homogeneizado. Después de agitar y centrifugar las muestras (1.500 g / 5 min), se combinaron los sobrenadantes de las dos extracciones. A esa solución se le añadieron 250  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 250  $\mu\text{l}$  de agua para formar dos fases. Tras la centrifugación de las muestras, se rescató la fase acuosa y esta se secó utilizando una centrífuga de vacío. Las muestras se disolvieron en 50  $\mu\text{l}$  de agua y 950  $\mu\text{l}$  de metanol.

Para la preparación de los estándares, tanto los internos como los externos (los analitos, siendo colina, fosfocolina, DMG, betaína, creatina y metionina), se disolvieron en metanol: agua MilliQ (95:5, v:v) y se almacenaron en cristal ámbar a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La curva de calibrado se preparó mediante la dilución de una solución madre que contenía 1ppm de todos los analitos. Además, se añadieron dos estándares internos, glicerosfosfocolina-d9 (GPC-d9) y L-metionina-d3, a 20ppb y 400ppb respectivamente.

Para identificar y cuantificar los compuestos de interés se utilizó un cromatógrafo Acquity UPLC System I-Class (Waters, MA, EE. UU.), utilizando una columna Acquity UPLC BEH Amide  $1,7\mu\text{m}$  (Waters, MA, EE. UU.) a temperatura ambiente. La fase móvil se compuso por el disolvente A (0,1% (v:v) de ácido fórmico en agua) y el disolvente B (0,1% (v:v) de ácido fórmico en acetonitrilo) con un flujo de 0,30 ml/min. Se llevó a cabo un sistema de gradiente de 0min/40%, 30s/40%, 1min/60%, 2min/60%, 1,5min/40% con el disolvente A, con un tiempo total de análisis de 6,5 minutos. El volumen de inyección de las muestras fue de 1 $\mu\text{l}$ . Después de la separación por UPLC, el eluyente se introdujo en la fuente de ionización por electrospray (ESI) de un

## MATERIAL Y MÉTODOS

analizador de masas de triple cuadrupolo XEVO-TQ-XS (Waters, MA, EE. UU.). Así, la cuantificación de los analitos se llevó a cabo midiendo en área bajo la curva de los analitos frente a la de los estándares internos.

### **3.3.12. Determinación de contenido de grasa hepática**

Se procedió a la homogeneización de 100 mg de tejido hepático utilizando un homogeneizador manual. El homogeneizado resultante se transfirió a tubos de vidrio, a los cuales se les añadió 1 ml de cloroformo y 2 ml de metanol. Tras una vigorosa agitación de las muestras durante 1 minuto, se incorporaron 1 ml de agua y 1 ml adicional de cloroformo. Los tubos se sometieron a una nueva agitación antes de ser sometidos a una centrifugación de 20 minutos a una velocidad de 1000 g a 4°C. Posteriormente, se procedió a recolectar la fase inferior (fase del cloroformo) y se trasvasó a un tubo previamente pesado con precisión. Se añadieron 2 ml de cloroformo al residuo resultante para llevar a cabo una segunda extracción. La fase del cloroformo obtenida en esta segunda extracción se unió a la fase correspondiente de la primera extracción. Luego de evaporar el cloroformo con una corriente de nitrógeno, se procedió a pesar los tubos nuevamente, permitiendo así el cálculo del contenido de grasa (mg de grasa/mg de tejido hepático).

### **3.3.13. Microbiota**

Para el análisis de las poblaciones microbianas intestinales, se recopilaron muestras de heces al final del experimento de ratones WT y *knockout*. La extracción y análisis de las muestras fue llevada a cabo por el centro GENYO (Granada, España). La extracción de ADN de las muestras se realizó utilizando columnas G-spin (iNtRON Biotechnology) a partir de materia fecal resuspendida en PBS. Todas las muestras se trataron con RNAsas y Proteinasa K. Las concentraciones de ADN se

cuantificaron utilizando el reactivo Quant-IT PicoGreen (Thermo Fischer, MA, EE.UU.). Luego, se procedió a amplificar la región V4 515F-806R de la subunidad pequeña ribosomal 16S en todas las muestras. Dichos cebadores llevaban incluidos además de la región conservada de interés, los adaptadores de Illumina y un Barcode de 12 pares de bases para poder multiplexar hasta 96 muestras en la misma carrera. Se realizó un control de calidad mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar que haya amplificado la muestra. El tamaño del amplicón está en torno a 380pb. Tras la cuantificación de las muestras por fluorimetría, se juntaron equimolarmente con una cantidad óptima de 240 ng por muestra. Las muestras se purificaron mediante columnas magnéticas y se realizaron controles de calidad utilizando un Bioanalizador HS para comprobar que no quedaban restos de cebadores. Este grupo se purificó aún más, se cuantificó y se determinó su concentración mediante qPCR (Kapa Biosystems). Finalmente, las muestras de DNA resultantes se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq usando un cartucho V3 de 600 ciclos, lo cual proporciona lecturas de 300 pares de bases en *paired-end*.

Tras la obtención de los datos, se detectaron los códigos de cada muestra y se combinaron las secuencias para obtener un único *fastQ* por muestra, utilizando la herramienta *cutadapt*. Una vez obtenido un único archivo por muestra se realizó un control de calidad de los archivos generados, y mediante *BMTagger* y *DeconSeq* se detectarán y eliminarán cualquier tipo de contaminación. Gracias a la herramienta *DNAclust* se eliminarán los duplicados. Tras los controles se realizó la detección de los microorganismos, alineando las secuencias contra las referenciadas bases del dato del proyecto de microbioma humano.

### 3.4. Experimentos ex vivo

#### 3.4.1. Obtención de organoides de yeyuno de ratón

Tras sacrificar el ratón se extrajo el yeyuno, se limpió con PBS estéril y se abrió longitudinalmente. Después, se cortó en fragmentos de 3 mm y se pasó a un tubo de 15 ml para lavarlos dos veces con PBS frío en agitación durante 5 minutos. Tras dejar sedimentar los fragmentos de intestino, se retiró el PBS y se añadieron otros 10 ml de PBS con EDTA a una concentración final de 2 mM. Tras una incubación durante 30 minutos a 4°C en agitación, se retiró el PBS. El tejido sedimentado se resuspendió en 10 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y se procedió a realizar una agitación manual durante 2 minutos para extraer las criptas de los tejidos intestinales. La suspensión se filtró a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$  y se contaron las criptas obtenidas. Se sembraron 1000 criptas en gotas de 50  $\mu\text{l}$  formadas por IntestiCult Organoid Growth Medium (STEMCELL, Vancouver, Canadá) y Matrigel (Corning, NY, EE.UU.) a partes iguales en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 15 minutos a 37°C para que se formasen cúpulas sólidas debido a la solidificación del matrigel. Una vez formada una cúpula estable, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de IntestiCult como medio de cultivo. Los experimentos llevados a cabo en organoides se realizaron 5-7 días después de la siembra, una vez observado su desarrollo morfológico, en subcultivos posteriores.

Para caracterizar el papel de la TNAP en el epitelio intestinal, se desarrollaron organoides de yeyuno de ratones WT ( $\text{Alpl}_{\text{flox/flox}}$ ) y  $\text{Alpl}^{\text{IEC-/-}}$  ( $\text{Alpl}_{\text{flox/flox}};\text{VillCre}$ ). Se les indujo la delección incubando con tamoxifeno (1  $\mu\text{M}$  concentración final) durante 24 h a ambos genotipos *in vitro*.

### **3.5. Técnicas generales**

#### **3.5.1. Estudio histológico**

Después del sacrificio del ratón, se conservó una pequeña muestra de hígado o colon, según el caso, transversal en formaldehído al 4% (p:v) durante 24h. A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 5 µm con un micrótopo. Los cortes realizados fueron montados en portas y guardados hasta su posterior tinción. Se realizaron 3 o más cortes de cada muestra de tejido que fueron empleados para llevar a cabo la tinción con hematoxilina-eosina o con el procedimiento de inmunohistoquímica. Se utilizó un microscopio Leica DMI3000B con un aumento de 10x para la obtención de las imágenes a estudiar.

Se utilizó la tinción hematoxilina-eosina para evaluar el daño hepático y colónico. La evaluación hepática se hizo con base en el tamaño de las partículas de grasa (0-3) y su frecuencia (0-3). Se evaluó el daño colónico de acuerdo con los siguientes parámetros: infiltración (0-3), pérdida de criptas (0-3), pérdida de células caliciformes (0-3), hiperplasia (0-3), engrosamiento muscular (0-3) e infiltración en la submucosa (0-3). Ambas evaluaciones fueron llevadas a cabo mediante codificación de las muestras.

#### **3.5.2. Inmunohistoquímica**

La detección del antígeno MRP8 (Abcam, ab92331) fue llevada a cabo con el kit VECTASTAIN® Elite® ABC Universal PLUS Kit Peroxidase (PK-8200) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas mediante su incubación sucesiva en xileno y concentraciones decrecientes de etanol (99%, 90% y 70% (v:v)). Las muestras se expusieron a tampón citrato sódico 10mM pH 6

## MATERIAL Y MÉTODOS

durante 30 minutos a 100°C para la recuperación de los antígenos. Después de enfriarse, las muestras se lavaron en TBS (Tris 50mM y NaCl 0.15M) durante 5 minutos. A continuación, se bloquearon las peroxidasas endógenas con la solución de bloqueo BLOXALL® durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ese periodo de tiempo, las muestras se lavaron en TBS durante 5 minutos y se incubaron durante 20 minutos en Normal Horse Serum 2,5% (S-2012, Vector Laboratories) para bloquear las uniones inespecíficas. Después, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (anti-MRP8) diluido 1:250 en Normal Horse Serum a 4°C en atmósfera húmeda durante toda la noche. Pasado ese tiempo, se lavaron 3 veces en TBS durante 5 minutos para, a continuación, incubarlas durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado provisto en el kit (Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG, Biotinylated). Se lavaron las muestras de nuevo tres veces con TBS, se incubaron durante otros 30 minutos con el complejo enzimático avidina/biotina provisto en el kit (VECTASTAIN Elite ABC Reagent). Se lavaron los cortes 3 veces con TBS y una última vez en agua destilada para posteriormente revelarlos utilizando la solución de revelado (1:1 reactivos 1 y 2 ImmPACT DAB EqV). Tras una adecuada exposición, se aclararon en agua de grifo y se llevó a cabo la tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 3 segundos. Por último, los cortes fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol y finalmente se sumergieron en xileno, para poder así proceder al montaje. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Leica DMI3000B con un aumento de 10x.

### **3.5.3. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina**

La actividad fosfatasa alcalina fue determinada en hígado, colon, bazo, hueso y enterocitos de colon e intestino delgado. Estos tejidos fueron



homogeneizados mecánicamente en un tampón compuesto por bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (p:v) y Tris Base (0,2M) utilizando el sistema Bullet Blender®, donde bolas de acero golpean vigorosamente los tejidos hasta homogeneizarlos. Las muestras fueron sonicadas y centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y sometido a la determinación de la actividad fosfatasa alcalina empleando un método espectrofotométrico. En este método, descrito por Sabokbar y col. (286), se utiliza el sustrato de coloración p-nitrofenilfosfato sódico en tampón glicina 50 mM con MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM a pH 10,5. Se emplearon inhibidores de fosfatasa alcalina como levamisol (0,1, 1 y 10 mM), fenilalanina (5mM), homoarginina (1mM) o inhibidor específico de la TNAP a 40 µM (496014-13-2, al que denominaremos TNAP<sub>inh</sub>) para caracterizar la actividad. Los resultados de actividad enzimática se expresaron como mU/mg de proteína total, y la sensibilidad a inhibidores como porcentaje de inhibición.

### **3.5.4. Determinación de la actividad mieloperoxidasa**

La actividad MPO, utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, fue determinada en colon. El tejido recién descongelado fue homogeneizado mecánicamente en un tampón compuesto por HTAB al 0,5% (p:v) y Tris Base (0,2 M) utilizando el sistema Bullet Blender®, donde bolas de acero golpean vigorosamente los tejidos hasta homogeneizarlos. Las muestras fueron sometidas a 5 fases de congelación y descongelación, con 2 sonicaciones intercaladas en el proceso, y a continuación, se centrifugaron a 7000 x g durante 10 minutos a 4°C. El nivel de actividad mieloperoxidasa se determinó espectrofotométricamente observando el aumento de la absorbancia debido a la oxidación de la o-dianisidina en presencia de peróxido de hidrógeno a 37°C. El aumento de absorbancia fue monitorizado durante

## MATERIAL Y MÉTODOS

2 minutos a intervalos de 10 segundos. Se utilizaron concentraciones decrecientes de peroxidasa de rábano para construir el patrón de peroxidasa. Los resultados fueron expresados como mU/g de tejido o mg de proteína.

### **3.5.5. Extracción y cuantificación de proteínas**

Los tejidos fueron homogeneizados en tampón RIPA (0.1% w/v SDS, 0.1% w/v desoxicolato de sodio y 1% v:v Triton X-100 en PBS) con inhibidores de proteasa (1:200, v:v) (P9599; MilliporeSigma, Madrid, Spain) y fosfatasa (1:100, v:v) (SC-45045; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.) utilizando el homogeneizador Bullet Blender® (Next Advance, Averill Park, NW, EE. UU.). Las muestras se sonicaron y se centrifugaron a 12.000 g 4°C durante 10 minutos para recuperar las proteínas en el sobrenadante. Se utilizó el método del ácido bicinchonínico para determinar el contenido proteico de las muestras utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

### **3.5.6. Western Blot**

Tras determinar la concentración proteica de las muestras, se les añadió Laemmli Sample Buffer (BioRad, Hercules, CA, EE. UU) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2µm (BioRad). Una vez verificada la transferencia de las proteínas utilizando la tinción con Rojo Ponceau S, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con leche en polvo desnatada al 5% (p:v) en TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0,15M y Tween-20 1% (v:v)). A continuación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T y fueron expuestas al anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos primarios empleados, diluidos a 1:1000 (v:v)

en TBS-T con BSA al 5% (p:v), fueron los siguientes: p-AMPK $\alpha$  (ref. 2535s), AMPK $\alpha$  (ref. 2532L), p-AKT (ref. 4060s), AKT (ref. 9272s) todos ellos de Cell Signaling Technology (MA, EE. UU.), PPAR $\alpha$  (ref. ab3484, Abcam, Cambridge, UK), actina (A5441, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.), y ZO-1 (ref. 61-7300) y Claudina-4 (ref. 32-9400) de Thermo Fisher Scientific (MA, EE. UU.). Las membranas fueron lavadas con TBS-T para retirar el anticuerpo primario y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario adecuado, que depende del origen del anticuerpo primario, y que está conjugado con peroxidasa de rábano. Esta enzima permite la reacción quimioluminiscente que se lleva a cabo al añadir el reactivo ECL (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, EE. UU.). Las bandas fueron detectadas mediante el sistema de imagen Amersham ImageQuant 800 (Cytiva). Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría mediante ImageJ.

### **3.5.7. Extracción de RNA, cuantificación y retrotranscripción**

El RNA total de las muestras fue obtenido usando el kit *RNease Mini Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total obtenido se cuantificó utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.), evaluándose a su vez la integridad y pureza de las muestras a través de los índices A260/A280 y A260/A230. Se retrotranscribió 1 $\mu$ g de RNA por muestra utilizando el kit iScript Select cDNA Synthesis (BioRad). El DNA complementario obtenido se congeló a -20°C mientras, que el RNA restante se conservó a -80°C.

### **3.5.8. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR**

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se llevó a cabo con GoTaqPCR Supermix (Promega®, Francia), el cual utiliza SYBR Green como fluoróforo para cuantificar a tiempo real la amplificación del gen de interés. La expresión del RNA del gen de interés se normalizó

## MATERIAL Y MÉTODOS

con un mínimo de dos genes de referencia: peptidil-prolil cis-trans isomerasa B (*Ppib*), la subunidad 18S del RNA ribosómico (18s) o hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*). La amplificación de cada gen se hizo por triplicado para cada muestra y se calculó el ciclo de umbral promedio (Ct). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la RT-qPCR.**

	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 3'-5'
<b>18s</b>	ACACGGACAGGATTGACAGATTG	GCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG
<b>Acaca</b>	CTGTATGAGAAAGGCTATGTG	AACCTGTCTGAAGAGGTTAG
<b>Acot5</b>	ATCTGGAGTACTTTGAGGAAG	TTGAAATAACGTTGACCGTG
<b>Acsm2</b>	ACAATGAAAGTCAAACCAGG	GATTGTCCACATATCCAGAG
<b>Akp3</b>	GAAAGCAGGAAAATCCGTAG	CATGTTGGAGATGAGTTGTG
<b>Akp6</b>	CATGGACATTGATGTGATCC	AGACTGGTTACTGTCACTTG
<b>Alpl_flox</b>	GTTGCGATGTGTGAAGATGTCCT	CTTGGGCTTGCTGTCCGAGTAA
<b>Alpl_p1</b>	CTGCCACTGCCTACTTGTGT	GATGGATGTGACCTCATTGC
<b>Ccl2</b>	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TTGGTGACAAAACTACAGC
<b>Cd14</b>	GAATCTACCGACCATGGAG	AAGTTGCAGGAACAACCTTC
<b>Cldn4</b>	GACTGTGCAAAGTTACTAGC	ACCAGCAATTTGGATGTAAG
<b>Cxcl1</b>	CCGAAGTCATAGCCCACTCAAG	ACCAGACAGGTGCCATCAGAG
<b>Cxcl1</b>	CCGAAGTCATAGCCCACTCAAG	ACCAGACAGGTGCCATCAGAG
<b>Cxcl10</b>	AAAAAGGTCTAAAAGGGCTC	AATTAGGACTAGCCATCCAC
<b>Cxcl2</b>	GGGTTGACTTCAAGAACATC	CCTTGCCTTTGTTCAAGTATC
<b>Cyp7b1</b>	ATGCTCCAAAGGAATTTAGG	TCCAAAAGGCATAACGTAAG
<b>Defa1</b>	GTCCTACTCTTTGCCCTTG	GCAGCCTCTTGATCTACAATA
<b>Defa2</b>	ATGAAGACACTTGTCTCCTCTC TGCCCT	CTGAGCAGGTCCCATAACTTGTCT CCTC
<b>Des</b>	CAGGATCAACCTTCCTATCC	CTGTCTTTTGGTATGGACTTC
<b>Fads1</b>	TTCTATTTTGTGGTTCAGCG	ATGGGGATATGGTTCATCTG
<b>Fads2</b>	TCATCATGACAATGATCAGC	CAGGAACCTGATAAAGTTGAG
<b>Fasn</b>	GATTCAGGGAGTGGATATTG	CATTCAGAATCGTGGCATAG
<b>G6pc</b>	TTCAAGTGGATTCTGTTTGG	AGATAGCAAGAGTAGAAGTGAC
<b>Glut2</b>	TTGTGCTGCTGGATAAATTC	AAATTCAGCAACCATGAACC
<b>Gpx1</b>	GGAGAATGGCAAGAATGAAG	TTCGCACTTCTCAAACAATG
<b>Hprt</b>	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG

<i>Hsd3b5</i>	CATGAAGAGGAATTGTCCAAG	GCTGAGTACCTTTCAGATTG
<i>lfng</i>	TGAGTATTGCCAAGTTTGAG	CTTATTGGGACAATCTCTTCC
<i>Il17c</i>	GATGACCCACCAAGATCC	GTGAGATAATTCCTCAGCAG
<i>Il1b</i>	GGATGATGATGATAACCTGC	CATGGAGAATATCACTTGTTGG
<i>Il6</i>	CTCTGGGAAATCGTGGAAT	TGTACTIONCAGGTAGCTATGG
<i>Lbp</i>	CACTCCCCAGATATACAAAAG	AGGCAAATACATTAGTGACC
<i>Lgr5</i>	AGAACACTGACTTTGAATGG	CACTTGGAGATTAGGTAAGT
<i>Lyz1</i>	CAAGATCTAAGAATGCCTGTG	TTCCGAATATACTGGGACAG
<i>Muc4</i>	GGATTCCCTTACGTTACAG	GTAGAGAAATCAGCATCAG
<i>Nt5e</i>	CTATGAGCCTCTTGAATGG	CTGATATCTTGATCACCAGAG
<i>Ocln</i>	ACGGACCCTGACCACTATGA	TCAGCAGCAGCCATGTACTION
<i>Panx1</i>	AGTTCAAAAGATTTGGACCTG	GACACACACTACATCAATACC
<i>Pck1</i>	AATATGACAACCTGTTGGCTG	AATGCTTTCTCAAAGTCTC
<i>Pdk4</i>	ACAATCAAGATTTCTGACCG	TCTCCTTGAAAATACTTGGC
<i>Ppib</i>	TGGAGATGAATCTGTAGGAC	CAAATCCTTTCTCTCCTGTAG
<i>Reg3g</i>	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAG
<i>S100a8</i>	GATGGTGATAAAAAGTGGGTG	CTGTAGACATATCCAGGGAC
<i>S100a9</i>	CTTTAGCCTTGAGCAAGAAG	TCCTTCTAGAGTATTGATGG
<i>Scd1</i>	GTGGGGTAATTATTTGTGACC	TTTTTCCCAGACAGTACCAAC
<i>Sis</i>	GAAGATAACTCTGGCAAGTC	GTCCAATGAGCTCTTGATATTG
<i>Spp1</i>	GGATGAATCTGACGAATCTC	GCATCAGGATACTGTTTCATC
<i>Srebf1</i>	AATAAATCTGCTGTCTTGCG	CCTTCAGTGATTTGCTTTTG
<i>Star</i>	GCGGAATATGAAAGGATTAAGG	GTCACTATAGAGTGTGCTTC
<i>Sult2a1</i>	GTCTTTCTTCAGTCCAAAGG	CCCAGAAAAAGTAACCAGAC
<i>Sult3a1</i>	TTCTAGATGGAGATGTGGTAG	CTTCACTIONCAGTTCTTTCTCC
<i>Tff3</i>	CCTGGTTGCTGGGTCTCTG	GCCACGGTTGTACACTGCTC
<i>Tgfb1</i>	CCCTATTTAAGAACACCC	AAGGTGTCTCAGTATACCAC
<i>Tjp1</i>	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
<i>Tlr4</i>	GATCAGAAACTCAGCAAAGTC	TGTTTCAATTTACACCTGG
<i>Tnf</i>	CGTGGAACCTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC

### 3.6. Análisis estadístico

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La significación estadística fue determinada con un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) y,

## MATERIAL Y MÉTODOS

posteriormente, con el método de comparaciones múltiples de Tukey o Sidak. Para determinaciones pareadas se utilizó el test de la t de Student. Los resultados se consideraron estadísticamente significativas para un valor de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó mediante GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Boston MA).

## **4. RESULTADOS**





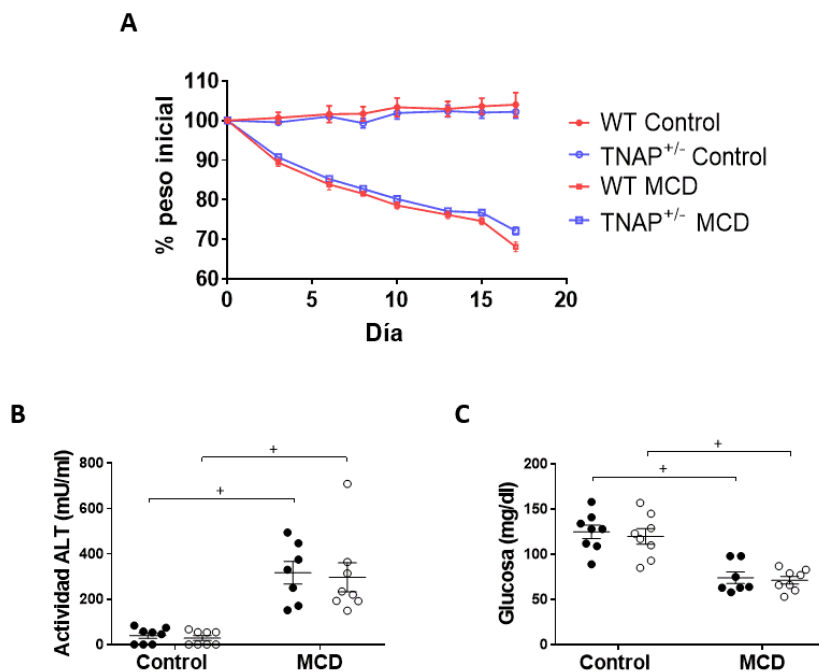
#### **4.1. Estudio del papel de la TNAP en la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) mediante el modelo de dieta deficiente en metionina y colina**

Con el objetivo de estudiar el papel de la TNAP en la esteatosis hepática se utilizaron ratones heterocigotos para la expresión de *Alpl* (ratones TNAP<sup>+/-</sup> y WT) debido a que los *knockout* homocigotos (TNAP<sup>-/-</sup>) no sobreviven a consecuencia de un incorrecto metabolismo del piridoxal 5'-fosfato, lo que se traduce en ataques epilépticos y en una defectuosa mineralización ósea (88). Los ratones heterocigotos son viables y normales en cuanto a apariencia, aunque se ha observado cierta alteración en las células del sistema inmunológico (6). El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es uno de los problemas hepáticos con más incidencia a nivel mundial, el cual está asociado a la aparición de resistencia a la insulina, desórdenes metabólicos e incluso alteraciones en la función de barrera intestinal (217), resultando en el aumento de los niveles de antígenos bacterianos circulantes. Diversos estudios han mostrado la implicación de la isoenzima IAP en múltiples procesos metabólicos. Por ejemplo, ratones deficientes en IAP y alimentados con dieta grasa desarrollan síndrome metabólico, fenómenos que se ve revertido administrar IAP oral (193). Además, la isoenzima intestinal dIAP (codificada por *Akp3*) participa en la absorción de lípidos. Concretamente, ratones deficientes en *Akp3* (*Akp3*<sup>-/-</sup>) mostraban un transporte de lípidos alterado y una ganancia corporal mayor a los de sus controles, traduciéndose en acumulación de grasa visceral y esteatosis hepática (117). Dado que la TNAP comparte mecanismos con la isoenzima intestinal, se ha planteado que la TNAP podría tener un papel en la hepatoesteatosis. Por lo tanto, se ha estudiado el papel de la TNAP en un modelo de hígado graso no alcohólico mediante una dieta deficiente en colina y metionina.

## RESULTADOS

### 4.1.1. Estudio del fenotipo general de la esteatosis

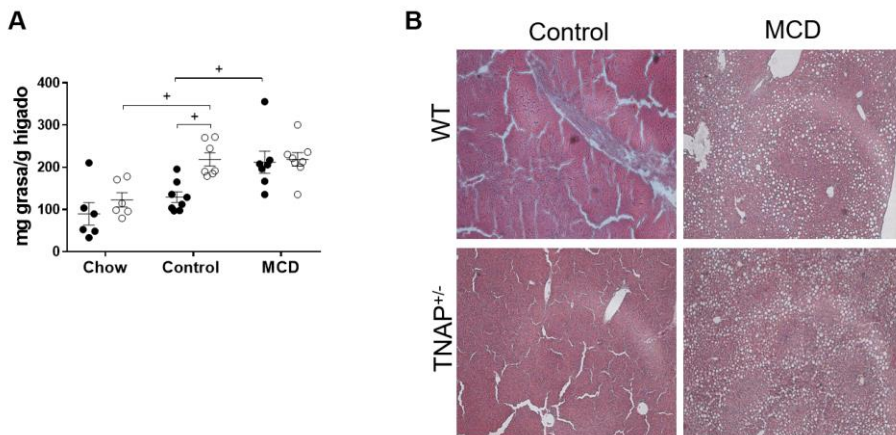
Los animales WT y TNAP<sup>+/-</sup> fueron distribuidos para recibir la dieta control o MCD, siguiendo un diseño 2x2. Se observó una pérdida de peso acusada y progresiva tanto en ratones WT como en ratones heterocigotos alimentados con dieta MCD durante los 17 días (Figura 6A), cuando se decidió sacrificarlos por razones éticas. Durante el experimento se midieron niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y glucosa, viendo un incremento en ALT (Figura 6B) y una bajada en los niveles de glucosa (Figura 6C) en ambos grupos alimentados con dieta MCD y sin diferencias entre genotipos.



**Figura 6. Desarrollo del modelo MCD en ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>.** Evolución de pesos (A). Actividad ALT en plasma (B). Concentración de glucosa en plasma (C). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

La acumulación de lípidos hepáticos característica de este modelo se observó mediante la medida del contenido de grasa hepática (Figura 7A) y mediante el estudio histológico (Figura 7B) y. Sorprendentemente, los ratones TNAP<sup>+/-</sup> presentaban mayores niveles de grasa en el hígado, además de unos microdepósitos de grasa observados a nivel histológico comparando con los ratones WT. Puesto que la dieta control utilizada incluye un contenido en grasa superior a la normal (10%(p/p) vs 4%(p/p)) (Tabla 3), decidimos analizar el estado de hígado utilizando una dieta estándar. Tal y como se muestra en la Figura A, no se observaron diferencias en el contenido de grasa hepática en los ratones alimentados con una dieta estándar. En este aspecto, queda reflejada la participación de TNAP en la esteatosis mediada por una dieta rica en grasa.

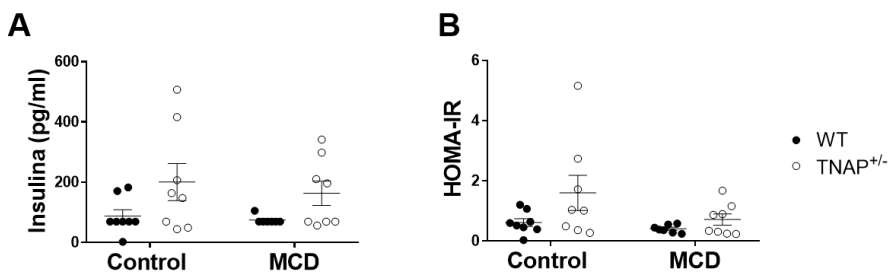


**Figura 7. Contenido de grasa hepática y estudio histológico del hígado.** Contenido graso en hígado (A) e imágenes histológicas (10x) de secciones de tejido hepático sometidas a la tinción con H&E (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 4.1.2. Estudio de parámetros plasmáticos

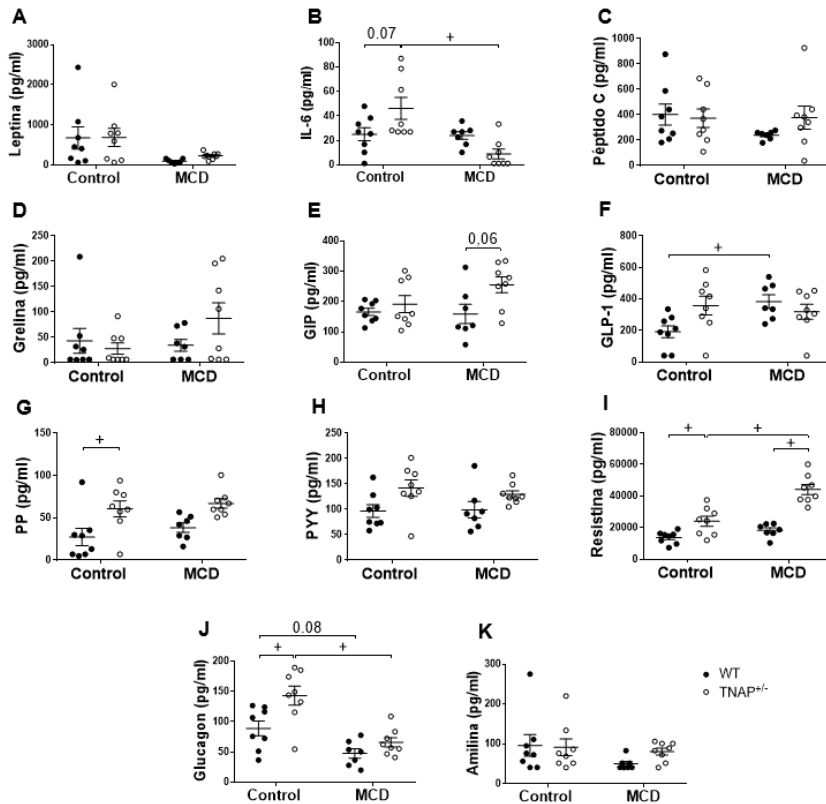
Además de la hipoglucemia, la esteatosis viene acompañada de una alteración de marcadores plasmáticos. Los ratones TNAP<sup>+/-</sup> presentaron mayores niveles de insulina independientemente de la dieta (ANOVA  $p=0,0165$ , TNAP<sup>+/-</sup> vs WT) (Figura 8A). Sin embargo, no mostraron diferencias en el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (Figura 8B).



**Figura 8. Concentraciones plasmáticas de insulina e índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR).** Resultados de multiplex de la concentración plasmática de insulina (A) y HOMA-IR (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p<0,05$ .

Curiosamente, se observaron diferencias significativas en la concentración de diversos parámetros plasmáticos en los grupos control (Figura 9). Concretamente, la deficiencia de TNAP supuso la presencia de mayores niveles plasmáticos de IL-6 (aunque no significativos,  $p=0,07$ ) (Figura 9B), péptido pancreático (PP) (Figura 9G), resistina (Figura 9I) y glucagón (Figura 9J) en ratones alimentados con la dieta control. Los ratones WT manifestaron cambios en las concentraciones plasmáticas de GLP-1 (el péptido similar al glucagón tipo 1) en ratones WT MCD respecto a sus controles (Figura 9F) y una tendencia a la baja de los niveles de glucagón ( $p=0,08$ ) (Figura 9J). No

obstante, los efectos de la dieta MCD en ratones TNAP<sup>+/-</sup> fueron muy similares a los de los ratones WT, a excepción de un aumento en los niveles plasmáticos de resistina (Figura 9I) y un aumento casi significativo del polipéptido inhibidor gástrico (GIP) (p=0,06) (Figura 9E).

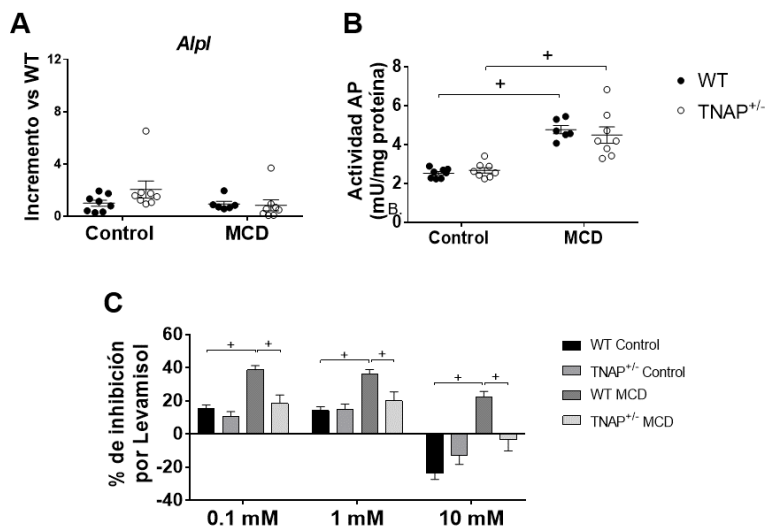


**Figura 9. Concentraciones plasmáticas de marcadores de inflamación, obesidad y esteatosis en plasma de ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>.** Niveles plasmáticos de leptina (A), IL-6 (B), péptido C (C), grelina (D), polipéptido inhibidor gástrico (E), péptido similar al glucagón tipo 1 (F), péptido pancreático (PP) (G), péptido YY (PYY) (H), resistina (I), glucagón (J) y amilina (K) medidos mediante multiplex. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

## RESULTADOS

### 4.1.3. Estudio de genes relacionados con inflamación y fibrosis en hígado

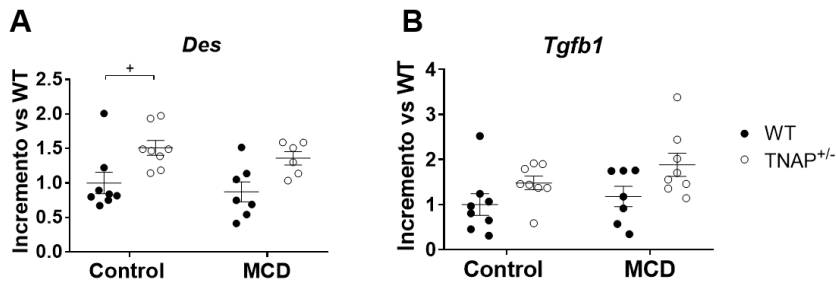
Se estudió la expresión de *Alpl* en el tejido hepático de los ratones sin observar diferencias a causa del genotipo ni de la dieta administrada (Figura 10A). Sin embargo, la dieta MCD provocó un incremento en la actividad fosfatasa alcalina en el tejido hepático de los ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup> (Figura 10B). Sorprendentemente, la sensibilidad a levamisol reflejó un aumento significativo con la dieta MCD en el caso de los ratones WT, efecto que no se dio en los ratones heterocigotos (Figura 10C).



**Figura 10. Estudio de la expresión de *Alpl*, actividad AP y su perfil de inhibición en tejido hepático en ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>.** Expresión de *Alpl* (A), actividad AP (B) y sensibilidad a levamisol (C). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

Para valorar el estado del hígado de los ratones, se analizó la expresión de genes relacionados con fibrosis mediante RT-qPCR. La expresión

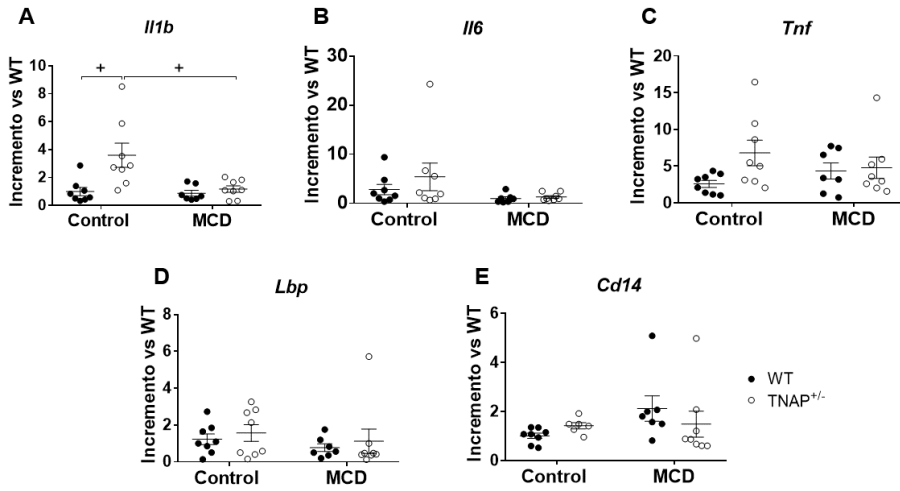
del gen de la desmina (*Des*) aumentó en el hígado de los ratones haplodeficientes alimentados con la dieta control (Figura 11A), en consonancia con una posible fibrosis, y la expresión de *Tgfb* mostró un patrón similar, sin llegar a significancia (Figura 11B). La dieta MCD no modificó estos parámetros mencionados anteriormente siendo los niveles de TNAP<sup>+/-</sup> muy similares a los de los ratones WT (Figura 11A/B).



**Figura 11. Expresión de genes relacionados con fibrosis en tejido hepático en ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>.** Expresión de *Des* (A) y *Tgfb1* (B) mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

A continuación, se pasó a medir genes relacionados con inflamación y con la señalización de LPS. Los ratones TNAP<sup>+/-</sup> presentaron mayores niveles de *Il1b* (Figura 12A) y una tendencia al alza de *Tnf* (p=0,08) (Figura 12C), sin verse alterados otros genes relacionados con la inflamación o señalización de LPS (*Il6*, *Lbp* y *Cd14*) (Figura 12A/D/E). Por otro lado, la dieta MCD no modificó estos parámetros siendo los niveles de TNAP<sup>+/-</sup> muy similares a los de los ratones WT (Figura 12B-E). Como excepción, la administración de dieta MCD supuso la disminución de expresión de *Il1b* alcanzando niveles de WT (Figura 12A). Todos estos datos sugieren la existencia de un daño leve en el hígado de los ratones TNAP<sup>+/-</sup> independientemente de la dieta.

## RESULTADOS

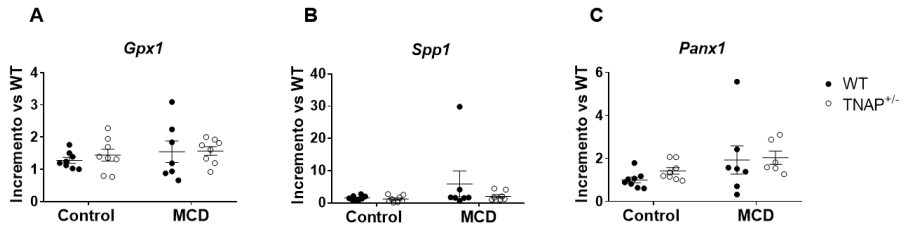


**Figura 12. Expresión de genes relacionados con inflamación y señalización de LPS en tejido hepático.** Expresión de *Il1b* (A), *Il6* (B), *Tnf* (C), *Lbp* (D) y *Cd14* (E). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

Después, pasamos a medir genes que se ven alterados por la administración de una dieta alta en grasa. En primer lugar, se midió la expresión de la enzima glutatión peroxidasa-1 (*Gpx1*), cuya deficiencia en hepatocitos se ha visto relacionada con la mejora del metabolismo de la glucosa y con la disminución de la esteatohepatitis en ratones (287). No obstante, el genotipo ni la dieta administrada provocaron cambios en la expresión de *Gpx1* (Figura 13A). También se midieron la expresión de la osteopontina (codificado por *Spp1*), a la cual recientemente se le ha atribuido un papel importante en la patogenia de NASH (288), y la expresión de panexina-1 (*Panx1*), que participa en respuestas inflamatorias hepáticas y se ha observado que su delección tiene un efecto protector frente a NAFLD (289). No se dieron diferencias en la expresión de *Spp1* (Figura 13B) ni *Panx1* (Figura 13C). Cabe mencionar que la administración de la dieta deficiente en colina y



metionina alteró en cierta medida la expresión de *Panx1*, sin diferencias entre genotipos (ANOVA  $p=0,04$ , MCD vs Control) (Figura 13C).



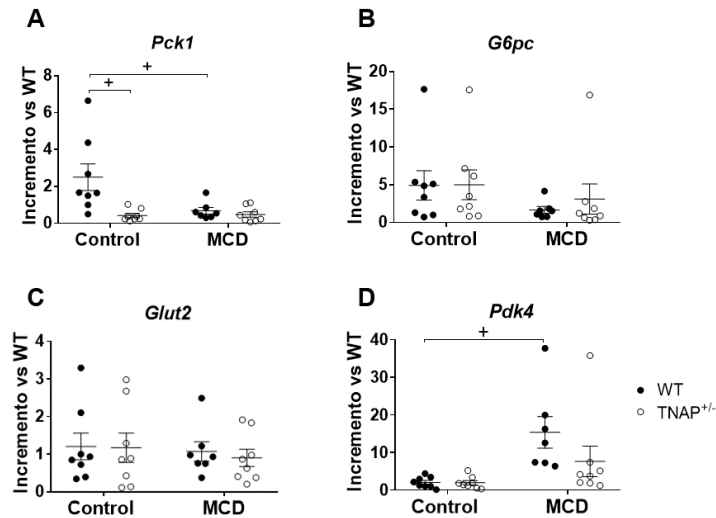
**Figura 13. Expresión de genes relacionados con inflamación y fibrosis hepáticas.** Expresión de *Gpx1* (A), *Spp1* (B) y *Panx1* (C). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

#### 4.1.4. Estudio de genes relacionados con el metabolismo hepático

Dado que la dieta MCD provoca cambios en el metabolismo glucídico y lipídico a nivel hepático, se estudió la expresión de ciertos genes relacionados mediante RT-qPCR. En cuanto al metabolismo glucídico, la deficiencia de TNAP provocó la disminución drástica en la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (*Pck1*), la enzima gluconeogénica clave (Figura 14A). La administración de la dieta MCD no moduló la expresión de la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*) (Figura 14B), subunidad catalítica de la enzima clave en la gluconeogénesis y la glucogenólisis, o del transportador de glucosa 2 (*Glut2*) (Figura 14C), el principal transportador de glucosa en el hígado, en ratones WT ni TNAP<sup>+/-</sup>. No obstante, se observó la inhibición de *Pck1* en ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control, viéndose la misma supresión en ratones alimentados con dieta MCD (Figura 14A). Además, se midió la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (*Pdk4*), la cual inhibe la oxidación de piruvato y media el cambio metabólico del metabolismo de la glucosa al de los

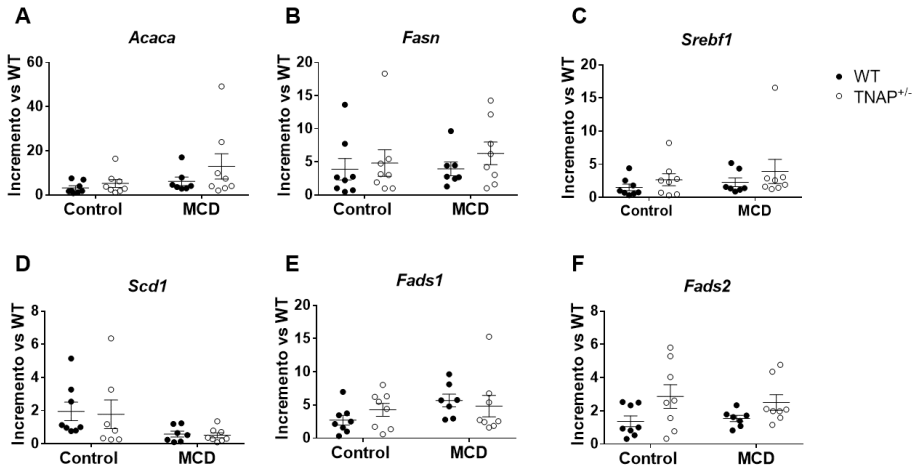
## RESULTADOS

ácidos grasos. Tal y como se ha descrito anteriormente (290), la dieta MCD indujo la expresión de piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (*Pdk4*) en ratones WT (Figura 14D).



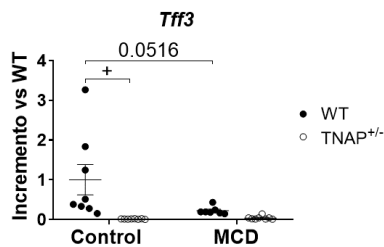
**Figura 14. Expresión de genes relacionados el metabolismo glucídico en hígado.** Expresión de *Pck1* (A), *G6pc* (B), *Glut2* (C) y *Pdk4* (D). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

Después se determinó la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Las enzimas clave en la síntesis de ácidos grasos, como la acetil-CoA carboxilasa (*Acaca*) (Figura 15A) y la enzima ácido graso sintasa (*Fasn*) (Figura 15B), no sufrieron cambios en su expresión a causa del genotipo ni de la dieta administrada. Tampoco se observaron cambios en la expresión de la proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides (*Srebf1*) (Figura 15C), la cual tiene un papel clave en la inducción de la lipogénesis, ni en genes que codifican desaturasas de ácidos grasos (*Scd1*, *Fads1* o *Fads2*) (Figura 15D-F).



**Figura 15. Expresión de genes relacionados el metabolismo lipídico en hígado.** Expresión de *Acaca* (A), *Fasn* (B), *Srebf1* (C), *Scd1* (D), *Fads1* (E) y *Fads2* (F). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

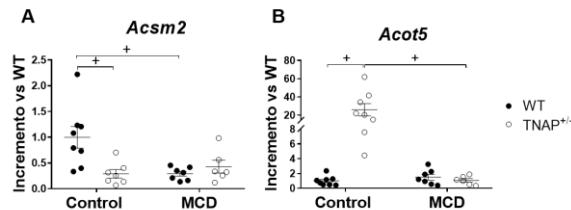
Sin embargo, se observaron cambios en la expresión de *Tff3*, cuya deficiencia se ha relacionado con la alteración del metabolismo lipídico a nivel hepático (291). La haplodeficiencia en TNAP supuso supresión en la expresión de *Tff3*, al mismo nivel observado en ratones alimentados con la dieta MCD (Figura 16).



**Figura 16. Expresión de *Tff3* en hígado.** Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

## RESULTADOS

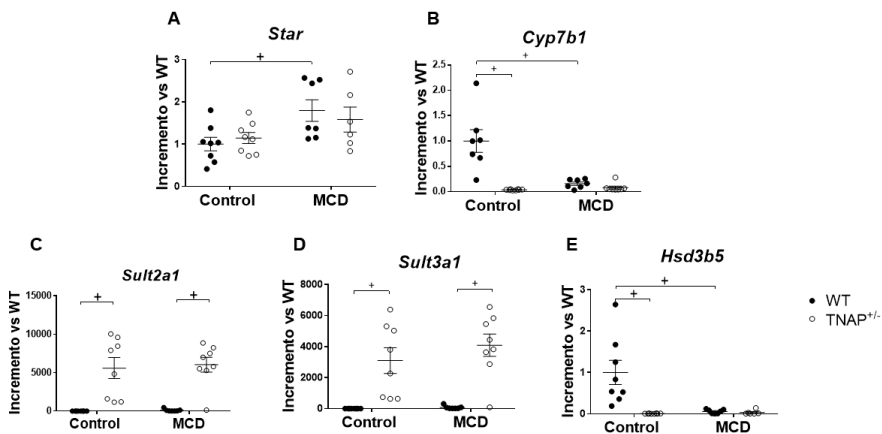
Después, se estudiaron ciertas enzimas de la beta-oxidación de los ácidos grasos. La expresión de *Acs2* disminuyó sustancialmente en el hígado de ratones alimentados con la dieta MCD, pero también en ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control de forma similar (Figura 17A). Por otro lado, se dio un incremento del gen *Acot5* solamente en ratones heterocigotos alimentados con la dieta control (Figura 17B).



**Figura 17. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos en hígado.** Expresión de *Acs2* (A) y *Acot5* (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

Dada la relación entre la TNAP y la homeostasis de los ácidos biliares (292), se pasó a medir la expresión de genes implicados en estas vías. STAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica) regula el primer paso en la vía de síntesis de ácidos biliares, generando oxisteroles, mientras que CYP7B1 participa en el siguiente paso, que finalmente conduce en su mayor parte a la generación de ácido desoxicólico (293). Por otra parte, las sulfotransferasas participan en la conjugación de los ácidos biliares. Los ratones alimentados con la dieta MCD, independientemente del genotipo, expresaron mayores niveles de *Star* (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 18A). Se observó una total supresión de la expresión *Cyp7b1* en ratones TNAP alimentados con la dieta control, llegando a los niveles obtenidos con la dieta MCD en ratones WT y heterocigotos (Figura 18B). Curiosamente, los resultados mostraron

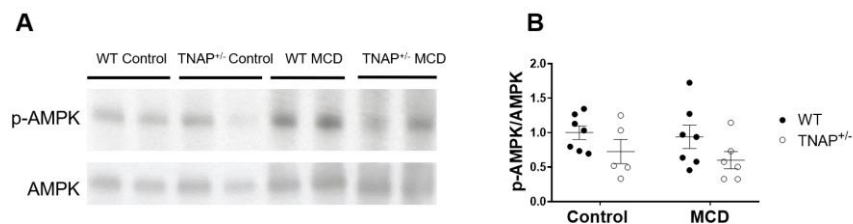
una sulfatación aumentada de los ácidos biliares en los ratones haplodeficientes, basada en una mayor expresión de las sulfotransferasas *Sult2a1* y *Sult3a1* independientemente de la dieta (Figura 18C/D). Además, se midió la expresión hepática de hidroxidelta-5-esteroide deshidrogenasa (*Hsd3b5*), gen involucrado en el metabolismo de los esteroides, encontrando una disminución fuerte con la dieta MCD además de en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control (Figura 18E).



**Figura 18. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares en hígado.** Expresión de *Star* (A), *Cyp7b1* (B), *Sult2a1* (C), *Sult3a1* (D) y *Hsd3b5* (E). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

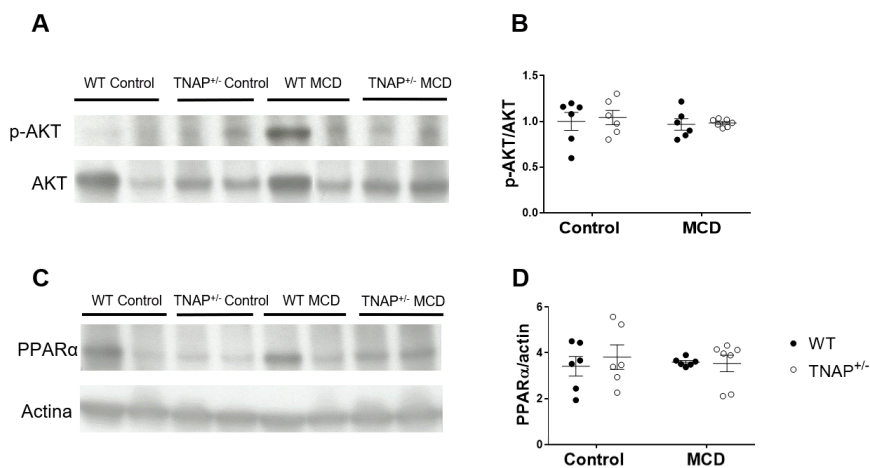
A la vista de los resultados obtenidos, se procedió a analizar diferentes vías relacionadas con la esteatosis hepática. En primer lugar, se determinó la fosforilación AMPK mediante *Western Blot* en tejido hepático de ratones WT y TNAP alimentados con dieta control y dieta MCD. La haplodeficiencia de TNAP supuso una menor ratio P-AMPK/AMPK independientemente de la dieta administrada (ANOVA p=0,04, TNAP<sup>+/-</sup> vs Control) (Figura 19A/B).

## RESULTADOS



**Figura 19. Expresión proteica de p-AMPK y AMPK en tejido hepático.** Expresión proteica de p-AMPK y AMPK (A) y ratio (B) medida mediante *Western Blot* en tejido hepático de ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

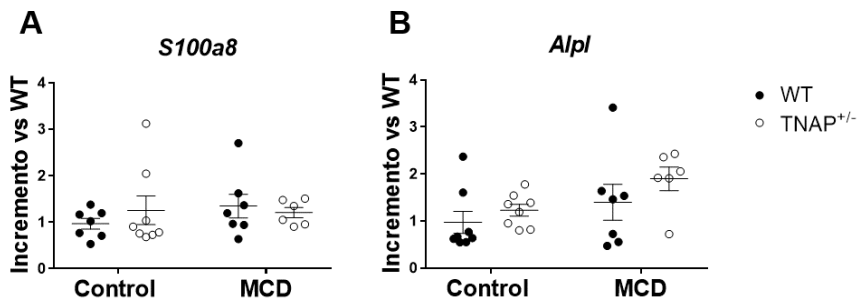
Después, dada su implicación en la esteatosis, se determinaron los niveles de fosforilación de AKT y la concentración de PPAR $\alpha$  mediante *Western Blot* en tejido hepático. A diferencia de AMPK, no se mostraron diferencias en los niveles de fosforilación de p-AKT (Figura 20A/B) ni en los niveles de PPAR $\alpha$  (Figura 20C/D).



**Figura 20. Expresión proteica de p-AKT/AKT y PPAR $\alpha$  en tejido hepático.** Expresión proteica de p-AKT y AKT (A), cuantificación de la ratio p-AKT/AKT (B), expresión proteica de PPAR $\alpha$  (C) y su cuantificación (D) mediante *Western Blot* en tejido hepático de ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

#### 4.1.5. Estudio del epitelio intestinal en esteatosis

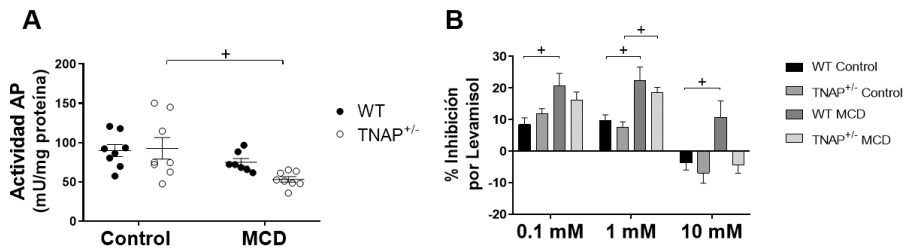
Finalmente, ya que la dieta grasa está asociada a disbiosis y puede estar relacionada con el aumento la permeabilidad intestinal, se quiso ver la implicación de la TNAP en este punto analizando el tejido colónico de los ratones. Los valores de expresión de *S100a8*, marcador de inflamación del colon, no mostraron cambios relacionados con el genotipo ni con la dieta (Figura 21A). La dieta MCD no provocó cambios en la expresión de TNAP (*Alpl*) (Figura 21B).



**Figura 21. Expresión de *S100a8* y *Alpl* en tejido colónico.** Expresión de *S100a8* (A) y *Alpl* (B) mediante RT-qPCR en tejido colónico en ratones WT y TNAP<sup>+/-</sup>. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

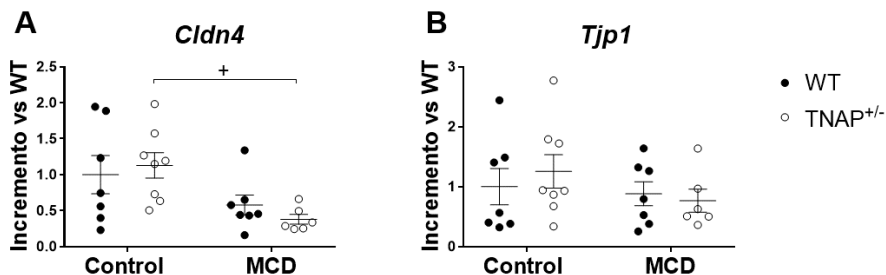
A continuación, se evaluó la actividad fosfatasa alcalina en el tejido colónico. Globalmente, la actividad AP fue menor en ratones alimentados con dieta MCD (ANOVA  $p < 0,05$ , MCD vs Control) (Figura 22A). Además, tal y como se observó en hígado, se registraron cambios en la isoforma en el colon en ratones WT alimentados con la dieta MCD respecto a la dieta control (Figura 22B) mediante estudios de sensibilidad a levamisol.

## RESULTADOS



**Figura 22. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico.** Actividad fosfatasa alcalina (mU/mg proteína) (A) y sensibilidad de la actividad fosfatasa alcalina a distintas concentraciones de levamisol (B), expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP. Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

Tal y como se ha explicado anteriormente, la dieta grasa puede suponer un cambio en la expresión de proteínas de uniones estrechas en el epitelio intestinal. En este caso, se observó una bajada en la expresión de claudina 4 (*Cldn4*) en los ratones alimentados con la dieta MCD, siendo solo significativo para los ratones haplodeficientes para TNAP (Figura 23A). En cuanto a ZO-1, codificada por *Tjp1*, no se dieron diferencias (Figura 23B).



**Figura 23. Expresión de genes relacionados con uniones estrechas en tejido colónico.** Expresión de claudina 4 (*Cldn4*) (A) y ZO-1 (*Tjp1*) (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP<sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.



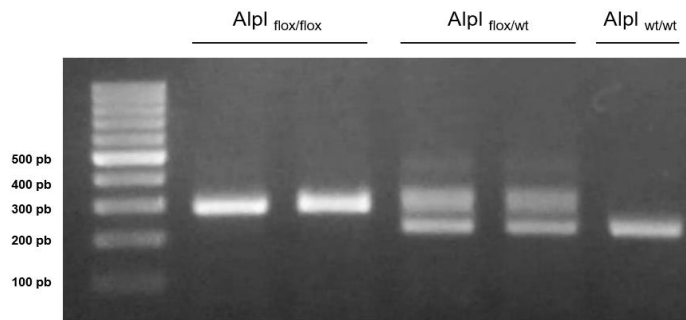
## 4.2. Caracterización de los ratones deficientes en TNAP en el epitelio intestinal

Con el objetivo de estudiar la relación entre la TNAP y la función de barrera intestinal, se generaron ratones con delección inducible del gen *Alpl* en el epitelio intestinal. El uso de un modelo inducible se debe a que se desconoce si *Alpl* juega un papel en el desarrollo del epitelio intestinal además de que puede que en el desarrollo del animal se dieran compensaciones que enmascarasen el efecto de la delección.

### 4.2.1. Generación de ratones con delección condicional inducible de *Alpl* en el epitelio intestinal

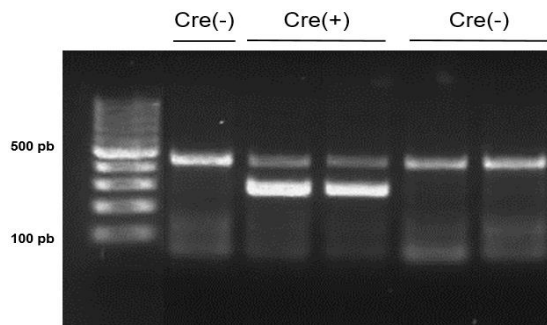
Mediante el cruce de ratones Vill-Cre ERT2 y  $Alpl_{flox/flox}$  se obtuvieron ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  ( $Alpl_{flox/flox}; VillCre$ ), que se genotiparon mediante la amplificación por PCR. Para comprobar el genotipo  $Alpl_{flox/flox}$  se utilizaron cebadores para el gen *Alpl* de tal forma que el fragmento *flox* insertado resulte en un producto de PCR de mayor tamaño. Se observó la diferencia de genotipo entre los ratones gracias al tamaño diferencial del producto resultante, ya que cuando el fragmento *flox* está insertado en el gen se obtiene una banda de 263 pb y cuando no lo está de 229 pb. En la Figura 24 están representados los tres genotipos, el homocigoto  $Alpl_{flox/flox}$  con una única banda a 263 pb, el genotipo heterocigoto  $Alpl_{flox/wt}$  con un alelo de cada tamaño y el genotipo  $Alpl_{wt/wt}$  con dos bandas de 229 pb.

## RESULTADOS



**Figura 24. Genotipo de los ratones  $Alpl_{flox/flox}$ ,  $Alpl_{flox/wt}$  y  $Alpl_{wt/wt}$ .** Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR del genotipaje de ratones para la obtención de ratones  $Alpl_{flox/flox}$ .

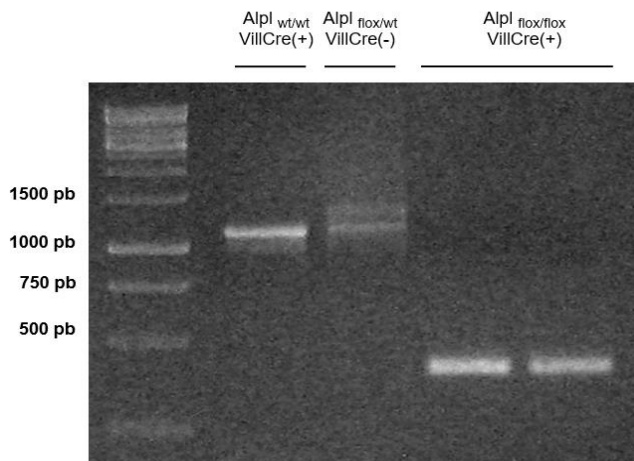
De la misma manera, para determinar el genotipo VillCre se llevó a cabo una PCR combinada con 2 cebadores para las secuencias del gen de la recombinasa Cre y de un gen control ( $\beta$ -actina). La banda superior de 400 bp corresponde a la beta-actina, el control interno (Figura 25). La banda de 300 pb, corresponde al gen Cre. Como se observa en todos los casos se ha amplificado el control interno correctamente, cerciorándonos así de una correcta reacción (Figura 25).



**Figura 25. Genotipo de los ratones Vill-Cre** Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR del genotipaje de ratones para la obtención de ratones Vill-Cre(+) y Vill-Cre(-). La banda superior corresponde a la  $\beta$ -actina y la inferior a la recombinasa Cre.

#### 4.2.2. Comprobación de la recombinación del gen *Alpl* en el epitelio intestinal

Para la comprobación del genotipo inducido, se administró tamoxifeno durante 5 días consecutivos, provocando la activación de la enzima CRE y su desplazamiento hacia el núcleo. Es ahí donde ejerce su acción de recombinasa sobre los sitios específicos *lox* dando como resultado la delección del ADN del gen diana, en nuestro caso el gen *Alpl*. Mediante una PCR del gen *Alpl* en las células epiteliales del intestino, se pudo comprobar la recombinación llevada a cabo por la enzima CRE. El producto de PCR de los ratones WT contiene 1134 pb, mientras que en el caso de los delecionados el fragmento es de 415 pb (Figura 26).



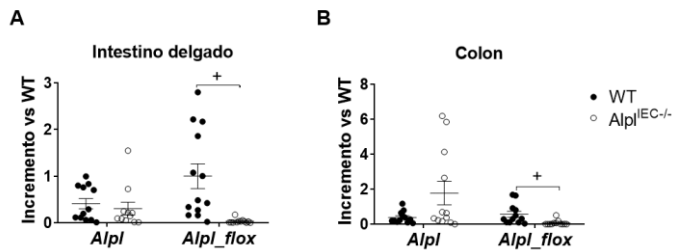
**Figura 26. Genotipo de los ratones *Alpl-VilCre*** Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR de la comprobación de recombinación del gen *Alpl* por la recombinasa CRE.

## RESULTADOS

### 4.2.3. Caracterización de la delección de *Alpl* en intestino y fenotipo general de los ratones

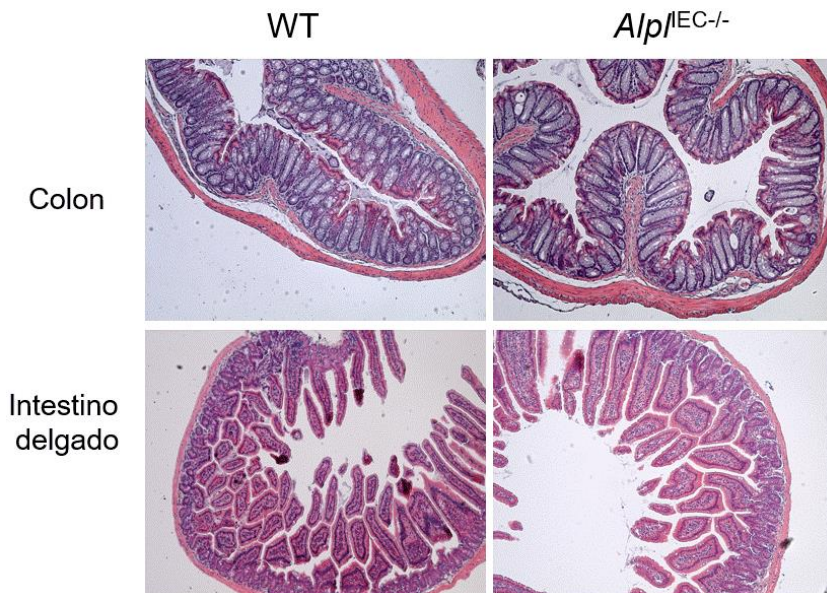
Se procedió a caracterizar el fenotipo de los ratones tras 7 días del inicio de la inducción de la delección del gen *Alpl*. Dado que actualmente no existen en el mercado anticuerpos apropiados que distingan las isoformas de fosfatasa alcalina, no se ha podido analizar la expresión proteica de *Alpl* en el epitelio intestinal, así como en otros órganos. No obstante, se pasó a determinar la expresión a nivel RNA mensajero del gen *Alpl*.

Con el objetivo de ver el efecto de la ausencia de *Alpl* sobre las propias células del epitelio intestinal, se aislaron IECs de intestino delgado y colon de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> a 7 días postdelección mediante un gradiente de Percoll. Inicialmente se utilizaron unos cebadores que amplifican el gen que codifica TNAP (cebadores *Alpl*), e hibridan aguas arriba de la sección flox/flox que será reconocida por la recombinasa CRE. Utilizando estos cebadores no observamos como era de esperar diferencias en la expresión del gen *Alpl* en los animales *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> ya que, aunque la TNAP se vuelve inactiva por la recombinación, aún se expresa el extremo inicial del gen (Figura 27A/B). Además, diseñamos unos cebadores específicos de la secuencia delecionada para confirmar el *knockout* y evaluar la expresión del gen (cebadores *Alpl\_flox*). Como se muestra en la Figura 27A/B, se pudo confirmar el *knockout* del gen en IEC de intestino delgado y colon utilizando estos cebadores.



**Figura 27. Expresión génica de *Alpl* y *Alpl\_flox* en IEC en los ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>.** Expresión génica medida mediante RT-qPCR en IECs de intestino delgado (A) y colon (B) a los 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. Grupos: WT (n=13) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=12). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

El fenotipo resultante de la delección de *Alpl* en el intestino fue aparentemente normal. Concretamente, el estudio histológico realizado en el intestino de los ratones no reveló diferencias entre genotipos (Figura 28).

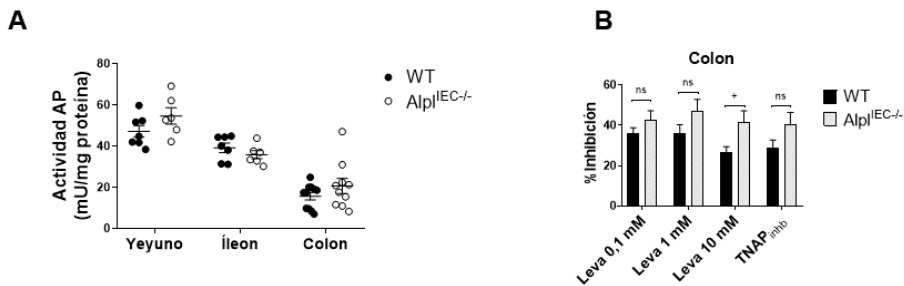


**Figura 28. Histología de intestino delgado y colon.** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción H&E de yeyuno y colon de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> a los 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno.

## RESULTADOS

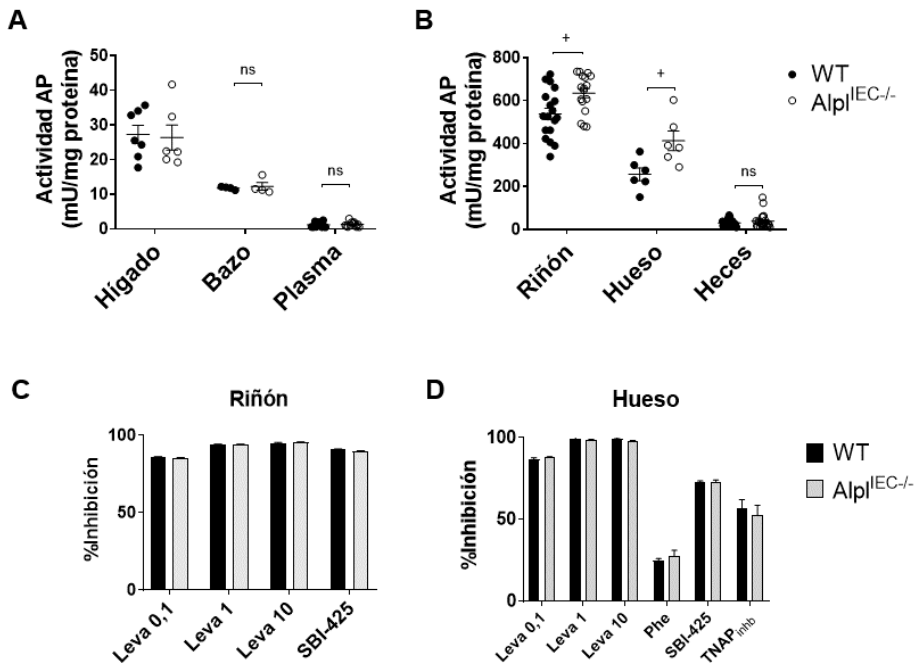
### 4.2.4. Actividad y expresión fosfatasa alcalina

A continuación, pasamos a determinar la actividad fosfatasa alcalina y expresión de las distintas isoenzimas en los ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  a 7 días postdelección. La actividad AP no se vio alterada en ratones *knockout* en yeyuno, íleon o colon (Figura 29A). Cuando se estudió la sensibilidad *in vitro* a inhibidores específicos levamisol y  $TNAP_{inh}$ , se observó una mayor sensibilidad a los mismos en el colon de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  (Figura 29B).



**Figura 29. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en yeyuno, íleon y colon.** (A) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en yeyuno, íleon y colon. (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol y  $TNAP_{inh}$  (40 $\mu$ M). Grupos: WT (n=7-11) y  $Alpl^{IEC-/-}$  (n=6-10). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +: p<0,05.

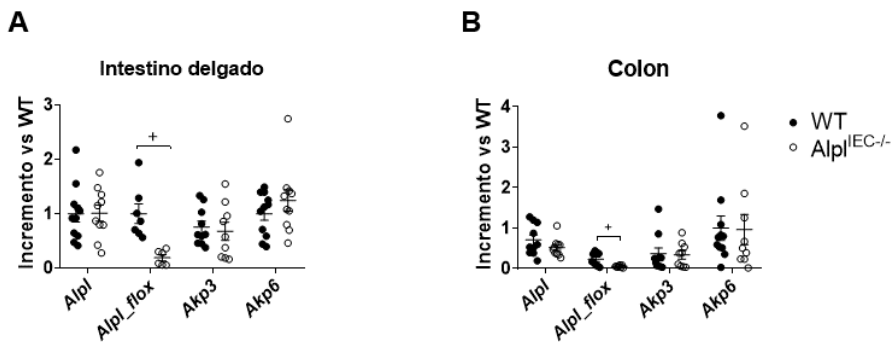
Después, se estudiaron los posibles efectos extraintestinales dados a causa de la delección del gen. Pasamos a medir la actividad fosfatasa alcalina en hígado, bazo, plasma, riñón, hueso y heces, encontrando una mayor actividad en hueso y riñón de los ratones *knockout* (Figura 30A/B). A pesar del incremento dado en estos tejidos, no se observaron cambios de sensibilidad a inhibidores (Figura 30C/D).



**Figura 30. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejidos o materia extraintestinales.** (A) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en hígado, bazo y plasma. (B) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en riñón, hueso y heces. Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol y TNAPinh (40 $\mu$ M) en riñón (C) y hueso (D). Grupos: WT (n=7-25) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=6-25). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +: p<0,05.

Se analizó la expresión de las distintas isoenzimas de AP (*Akp3*, *Akp6*, *Alpl*) mediante RT-qPCR en el intestino de los ratones. Tal y como hemos descrito anteriormente, los ratones *knockout* expresan el gen *Alpl* determinado con los cebadores que hibridan aguas arriba de la zona de recombinación (Figura 31A/B). Sin embargo, se utilizaron los cebadores *Alpl\_flox* para demostrar la existencia del *knockout* en el intestino de los ratones. La ausencia del gen *Alpl* no provocó cambios en la expresión de las isoenzimas intestinales en tejido completo en intestino delgado o colon (Figura 31A/B).

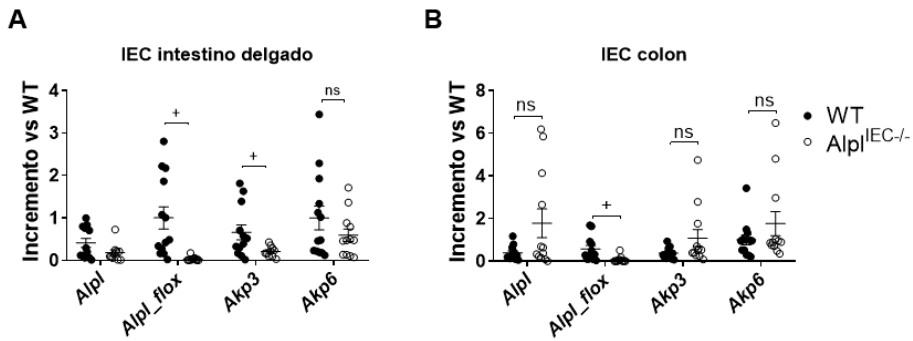
## RESULTADOS



**Figura 31. Estudio de la expresión génica de *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3*, y *Akp6* en tejido completo en intestino delgado y colon.** Expresión génica por RT-qPCR en intestino delgado completo (A), y tejido colónico completo (B). Grupos: WT (n=7-11) y  $Alpl^{IEC-/-}$  (n=6-10). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

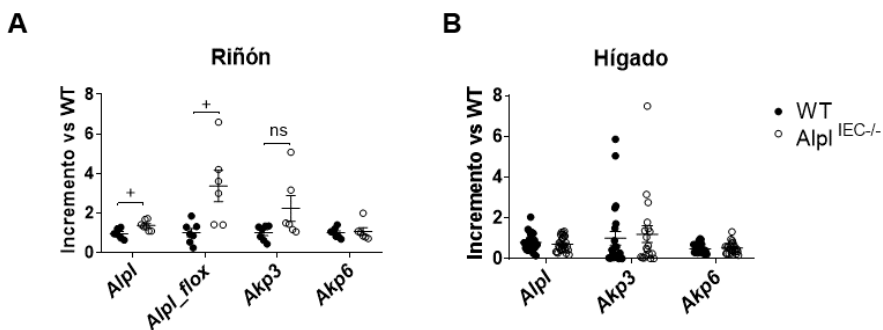
Acto seguido, se midieron estos genes en las IEC provenientes del intestino delgado y del colon (Figura 32A/B). En las IEC del intestino delgado se observa un descenso significativo de las isoenzimas intestinales (Figura 32A). Por el contrario, las medidas realizadas por RT-qPCR en IECs colónicas revelaron el incremento aparente de *Alpl*, posiblemente a causa de modificaciones en la expresión de *Alpl* provocadas por la ausencia de la enzima TNAP en los ratones *knockout*, y un incremento aparente de las AP intestinales *Akp3* y *Akp6*, lo que podría traducirse en un mecanismo de compensación por parte de estas isoenzimas (Figura 32B).





**Figura 32. Estudio de la expresión génica de *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3* y *Akp6* en enterocitos de intestino delgado y colon.** Expresión génica por RT-qPCR en IECs provenientes de intestino delgado (A) y colon (B). Grupos: WT (n=12) y  $Alpl^{IEC-/-}$  (n=12). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

Sorprendentemente, la ausencia de *Alpl* en las IEC modificaron la expresión de ciertas isoenzimas de AP en tejidos extraintestinales. Concretamente, los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  presentaron una mayor expresión de *Alpl* y *Akp3* en riñón (Figura 33A). No se observaron diferencias en tejido hepático (Figura 33B).

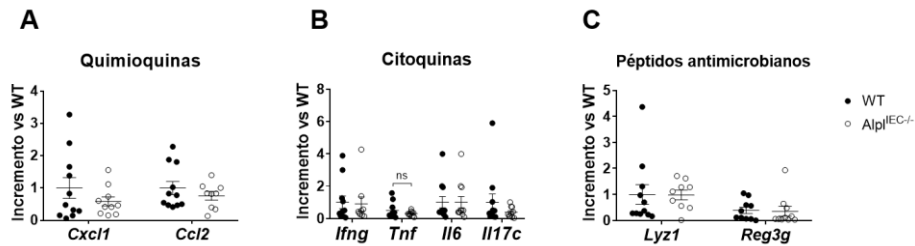


**Figura 33. Estudio de la expresión génica de *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3* y *Akp6* en riñón e hígado.** Expresión génica por RT-qPCR en riñón (A) e hígado (B). Grupos: WT (n=6-7) y  $Alpl^{IEC-/-}$  (n=6-7). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

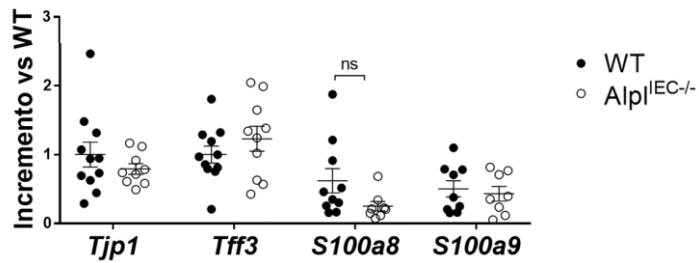
### 4.2.5. Estudio de la expresión de genes en colon

Debido a la importancia de *Alpl* en colon, se pasó a estudiar la expresión génica de distintos marcadores en este tejido (Figura 34). No se observaron diferencias significativas en la expresión de quimioquinas (*Cxcl1*, *Ccl2*) (Figura 34A), citoquinas (*Ifng*, *Tnf*, *Il6*, *Il17c*) (Figura 34B) o péptidos antimicrobianos (*Lyz1*, *Reg3g*) (Figura 34C) entre genotipos.



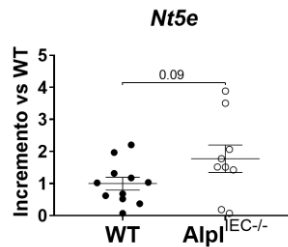
**Figura 34. Estudio de la expresión génica de quimioquinas, citoquinas y péptidos antimicrobianos en tejido colónico.** Expresión génica por RT-qPCR de *Cxcl1*, *Ccl2* (A), *Ifng*, *Tnf*, *Il6*, *Il17c* (B), *Lyz1*, *Reg3g* (C). Grupos: WT (n=11) y *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* (n=10). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

Para evaluar el estado del colon se pasó a estudiar la expresión de uniones estrechas como *Tjp1* (que codifica ZO-1), la expresión de *Tff3* (gen relacionado con la protección de la mucosa intestinal) y marcadores inflamatorios (*S100a8*, *S100a9*) (Figura 35). La ausencia de *Alpl* en IECs no dio como resultado diferencias significativas en ninguno de los genes mencionados.



**Figura 35. Estudio de la expresión génica de *Tjp1*, *Tff3*, *S100a8* y *S100a9* en tejido colónico.** Expresión génica por RT-qPCR. Grupos: WT (n=11) y Alpl<sup>IEC-/-</sup> (n=10). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

Sin embargo, los ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> mostraron un ligero incremento no significativo en la expresión del gen *Nt5e*, una nucleotidasa relacionada con el sistema purinérgico (Figura 36).



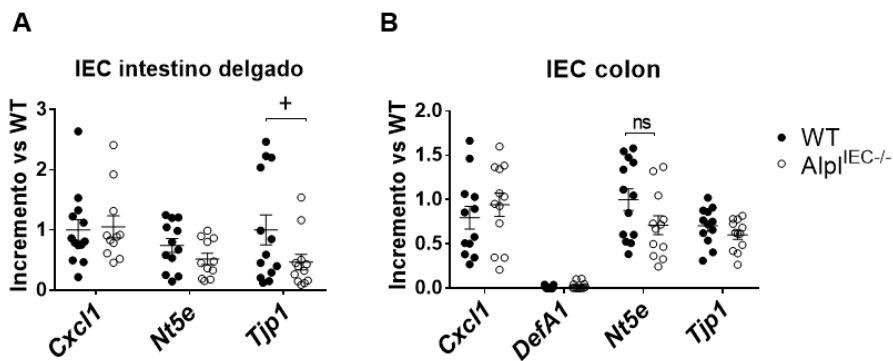
**Figura 36. Estudio de la expresión génica de *Nt5e* en tejido colónico.** Expresión génica por RT-qPCR. Grupos: WT (n=11) y Alpl<sup>IEC-/-</sup> (n=10). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

#### 4.2.6. Estudio de la expresión de genes en células del epitelio intestinal

Con el objetivo de estudiar más profundamente las consecuencias de la ausencia del gen *Alpl* en el epitelio intestinal, se analizó la expresión de genes en los enterocitos de intestino delgado y colon extraídos mediante Percoll. La expresión de *Cxcl1* no sufrió ninguna modificación

## RESULTADOS

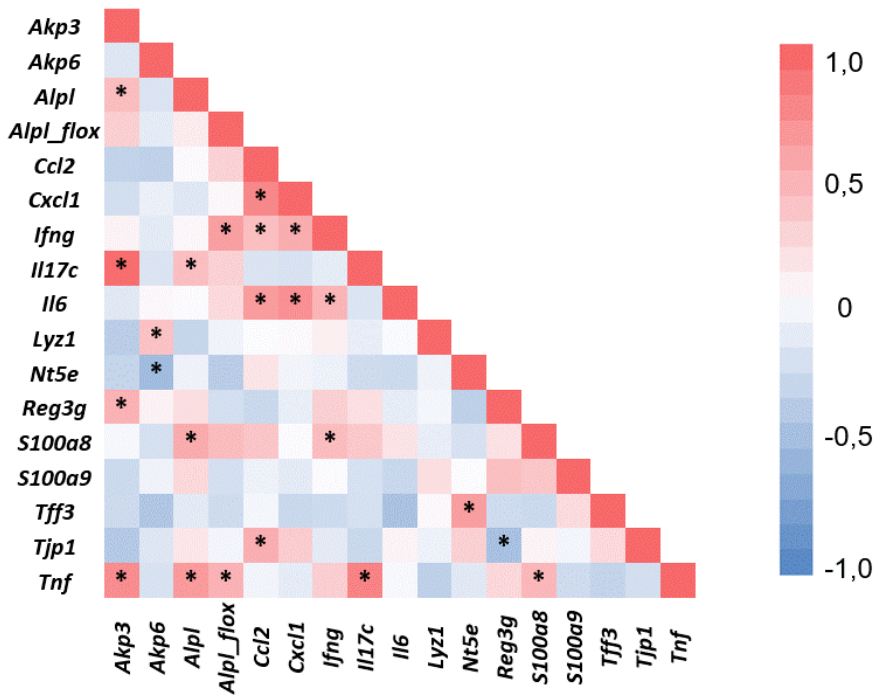
en ausencia de *Alpl* en enterocitos de intestino delgado ni colon, ni tampoco la expresión de *Defa1* en enterocitos de colon (Figura 37A/B). En cuanto al gen *Nt5e*, se aprecia una ligera tendencia a la baja, aunque no significativa, en los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en IEC provenientes de intestino delgado y colon (Figura 37A/B). Sorprendentemente, se observó una bajada en la expresión de *Tjp1* en enterocitos de intestino delgado, gen que codifica una proteína implicada en las uniones estrechas (ZO-1) (Figura 37A). Por el contrario, no se vieron diferencias en *Tjp1* en IEC en colon (Figura 37B).



**Figura 37. Estudio de la expresión génica de *Cxcl1*, *Nt5e*, *Tjp1* y *Defa1* en IECs provenientes de intestino delgado y colon.** Expresión génica por RT-qPCR de los genes *Cxcl1*, *Nt5e* y *Tjp1* en IEC de intestino delgado (A) y *Cxcl1*, *DefA1*, *Nt5e* y *Zo1* en IEC de colon (B). Grupos: WT (n=13) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=12). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +: p<0,05.

### 4.2.7. Estudio de correlación de la expresión génica en colon e IEC

Se realizaron estudios de correlación con el propósito de examinar las posibles asociaciones entre la expresión de distintos genes en el tejido colónico de los ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en condiciones basales (Figura 38). Es notable la correlación positiva que se observa en el colon entre los genes *Alpl*, *Alpl\_flox* (amplicón específico para la delección inducible), *Il17c*, *Akp3* y *Tnf*. Asimismo, se evidencia la existencia de otro clúster con correlación positiva, compuesto por *Il6-Cxcl1-Ifn $\gamma$* .

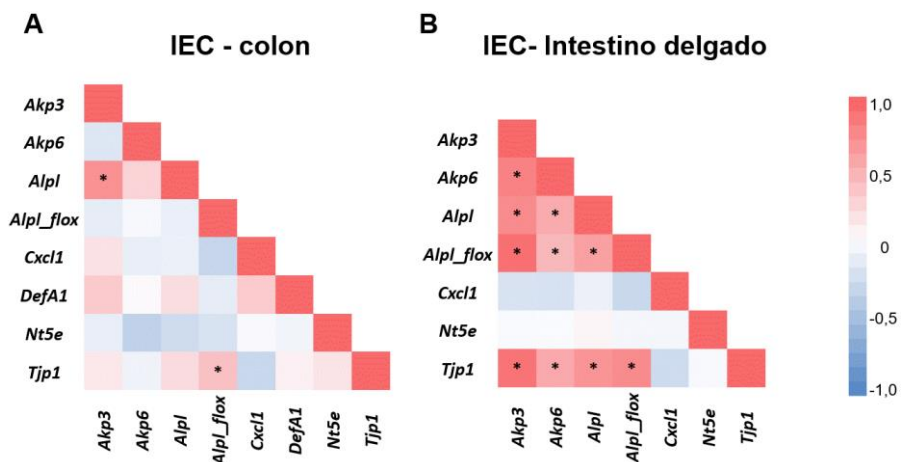


**Figura 38. Matriz de correlación de la expresión génica en tejido colónico completo en ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ .** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco.

Se llevó a cabo un estudio de correlación de la expresión génica en las células epiteliales intestinales obtenidas del colon e intestino delgado de ratones de ambos genotipos (Figura 39A/B). Se muestra una fuerte correlación entre la expresión de *Alpl* y *Akp3* ( $r = +0,758$ ) en las IEC colónicas (Figura 39A). Existe una correlación más modesta pero significativa entre *Alpl\_flox* y *Tjp1* ( $r = +0,477$ ), que corresponde a la tendencia a la disminución de ambos genes en las células provenientes de ratones *knockout* (Figura 39A). En contraste, en las IEC primarias

## RESULTADOS

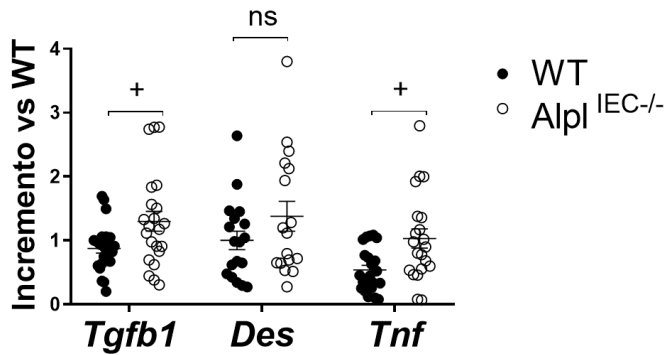
de intestino delgado se observó una correlación muy robusta entre los niveles de *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3*, *Akp6* y *Tjp1* (Figura 39B). Esto corresponde a la tendencia a la disminución de todos estos genes en las IEC de intestino delgado provenientes de ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>.



**Figura 39. Matriz de correlación de la expresión génica en IECs provenientes de colon e intestino delgado de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco.

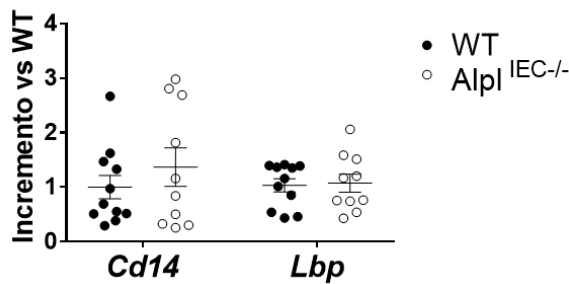
### 4.2.8. Estudio de la expresión de genes en tejido hepático

Debido a la estrecha relación que existe entre el intestino y el hígado, se midió la expresión de genes en el hígado de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>. La ausencia de *Alpl* en las IECs provocó una mayor expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática, como *Tgfb1* y *Des*, aunque en esta última no hubo diferencias significativas ( $p=0,2$ ) (Figura 40). Además, la ausencia de *Alpl* en IECs provocó cierta inflamación en el hígado de estos ratones, tal y como muestra el incremento de *Tnf* en el hígado de los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (Figura 40).



**Figura 40. Estudio de la expresión génica de *Tgfb1*, *Des* y *Tnf* en tejido hepático.** Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=13) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=12). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

El daño hepático puede deberse al incremento de la permeabilidad bacteriana. Por ello, se estudiaron genes relacionados con las vías de activación de LPS, como *Cd14* y *Lbp*. No se observaron diferencias significativas entre genotipos (Figura 41).

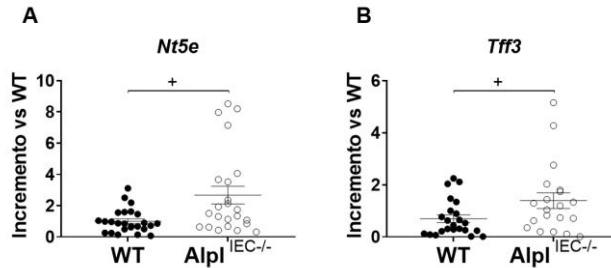


**Figura 41. Estudio de la expresión génica de *Cd14* y *Lbp* en tejido hepático.** Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=13) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=12). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

Además de estas modificaciones a nivel hepático, los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mostraron un aumento en la expresión de *Nt5e* y *Tff3*, genes que, como

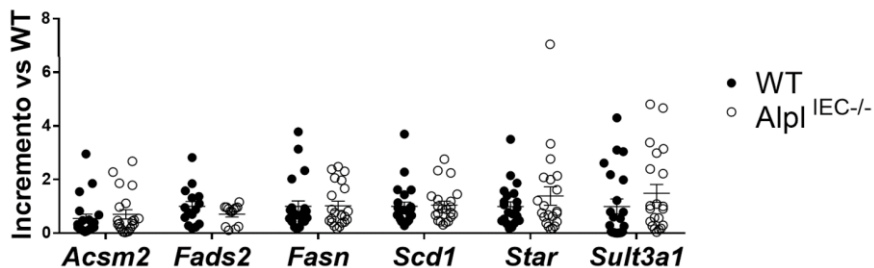
## RESULTADOS

hemos indicado anteriormente, se han relacionado con la modulación del metabolismo lipídico (Figura 42).



**Figura 42. Estudio de la expresión génica de *Nt5e* y *Tff3* en tejido hepático.** Expresión génica de *Nt5e* (A) y *Tff3* (B) mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=25) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=23). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

Se estudiaron también genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (*Fads2*, *Fasn*, *Scd1*), la beta-oxidación (*Acsm2*) y la síntesis de los ácidos biliares (*Star*, *Sult3a1*). No se vieron cambios a nivel hepático en ausencia del gen *Alpl* en IEC (Figura 43).

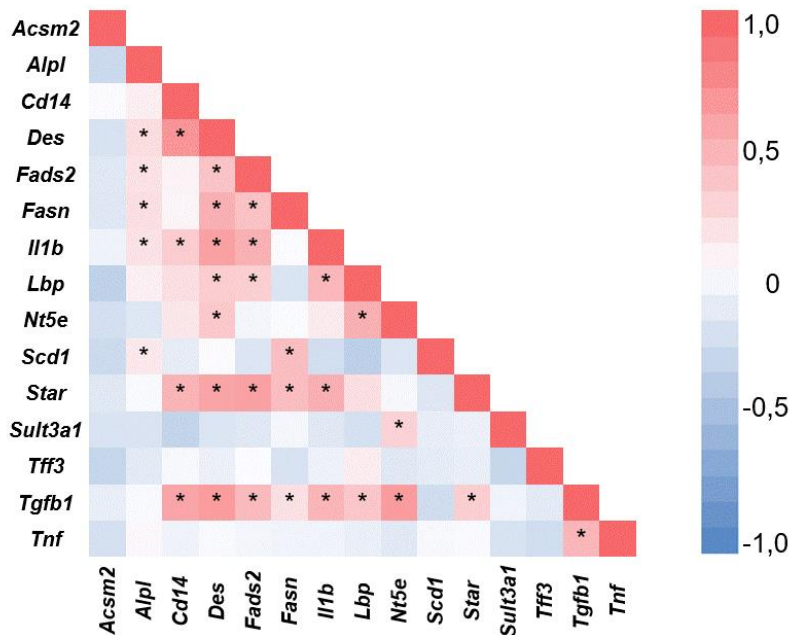


**Figura 43. Estudio de la expresión génica de *Acsm2*, *Fads2*, *Fasn*, *Scd1*, *Star* y *Sult3a1* en tejido hepático.** Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=25) y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (n=23). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

El análisis de correlación a nivel hepático mostró una correlación positiva robusta entre los niveles de *Alpl*, *Fasn* (sintasa de ácidos



grasos) y *Scd1* (estearoil-CoA desaturasa 1) (Figura 44). Por otra parte, se identificó una correlación positiva entre *Cd14*, *Des*, *Tgfb1*, *Il1b*, lo que puede interpretarse en términos de mayor o menor respuesta inflamatorio/fibrótica (Figura 44).



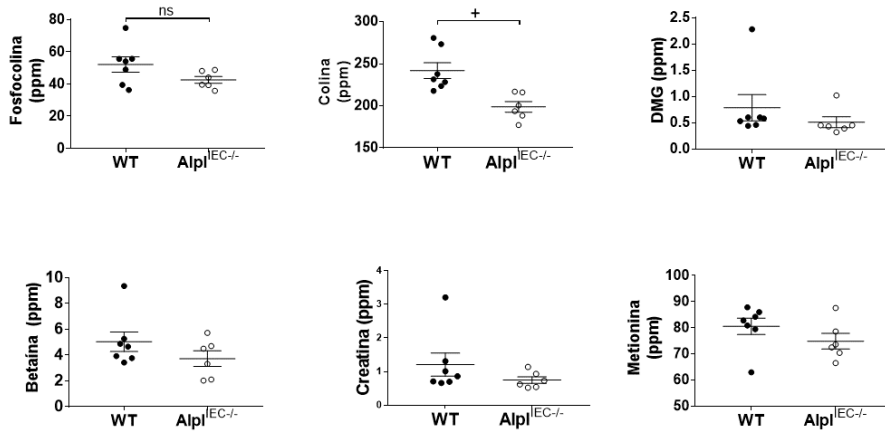
**Figura 44. Matriz de correlación de la expresión génica en hígado de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco.

#### 4.2.9. Metabolismo de la colina

Como se ha explicado en la introducción, la TNAP es capaz de desfosforilar múltiples sustratos. Por esto, se determinaron mediante HPLC-MS los niveles de fosfocolina, colina, dimetilglicina, betaína, creatina y metionina. Observamos una disminución de niveles de colina en el hígado de los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (Figura 45). Se ha descrito que la

## RESULTADOS

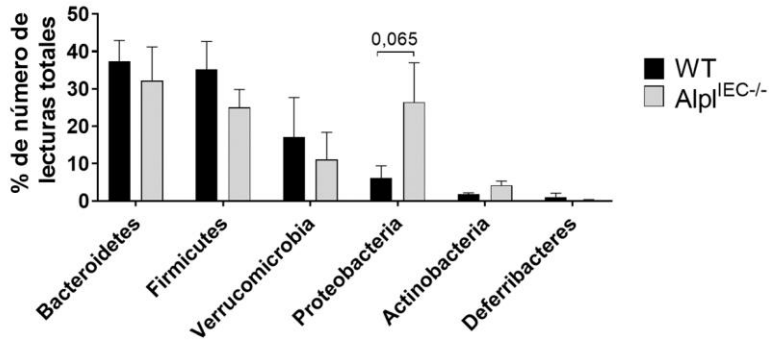
TNAP participa en la desfosforilación de fosfocolina, paso necesario para la captación de colina por parte de los enterocitos con el objetivo de transportarlo hasta el hígado a través de la sangre. Una vez allí, la colina sirve para formar VLDL en los hepatocitos y liberar colesterol y triglicéridos a sangre, impidiendo la acumulación de grasa hepática y la posible aparición de esteatosis.



**Figura 45. Niveles hepáticos de fosfocolina, colina, dimetilglicina (DMG), betaina, creatina y metionina.** Grupos: WT (n=7) y Alpl<sup>IEC-/-</sup> (n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +: p<0,05.

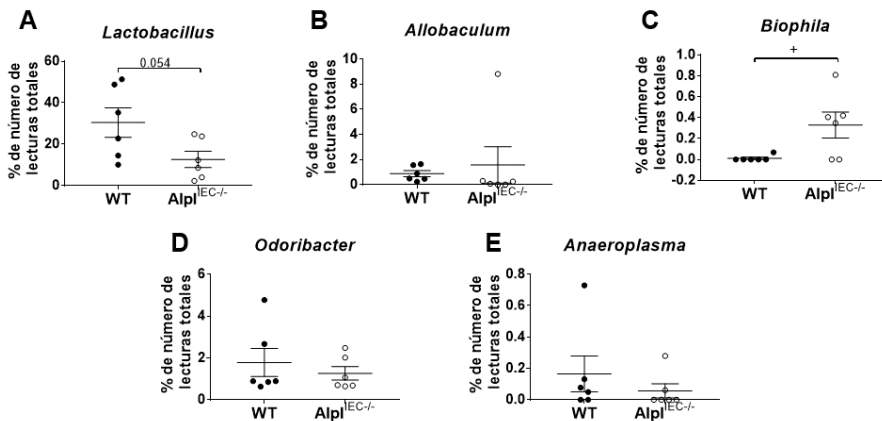
### 4.2.10. Microbiota fecal

Por último, para comprobar si la ausencia de *Alpl* provoca algún cambio en la microbiota se estudió el DNA fecal de ratones WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup>. Primero, se estudió la composición a nivel de filo. Las poblaciones más abundantes en las heces de los ratones fueron *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, seguidos de *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Figura 46). No se mostraron diferencias significativas entre los dos genotipos, aunque se observó cierta tendencia a una mayor población de *Proteobacteria* en los ratones *knockout*.



**Figura 46.** Desglose del filo de las comunidades bacterianas más abundantes en las muestras de heces de los ratones WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup>. Grupos: WT (n=6) y Alpl<sup>IEC-/-</sup> (n=6). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

Además, los ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> tenían una menor presencia de bacterias del género *Lactobacillus* (aunque no fue significativo estadísticamente) (Figura 47A) y una mayor presencia de bacterias del género *Biophila* (Figura 47C).



**Figura 47.** Comunidades bacterianas a nivel género más abundantes en las muestras de heces de los ratones WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup>. Grupos: WT (n=6) y Alpl<sup>IEC-/-</sup> (n=6). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

### **4.3. Estudio del papel de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en la colitis inducida por DSS**

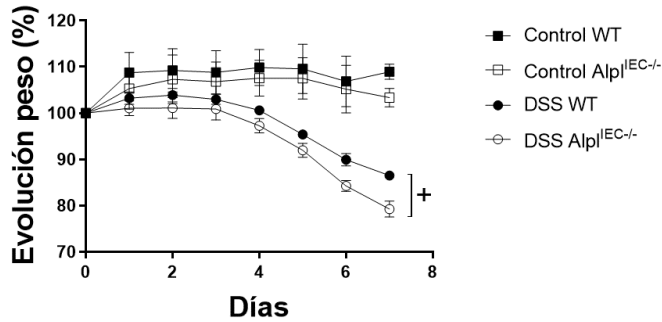
Una vez caracterizado el fenotipo basal de los ratones sin *Alpl* en enterocitos, quisimos determinar su función en estas células en inflamación intestinal. En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación demostró el incremento de la isoenzima TNAP en IEC en colitis experimental, además del cambio en la glicosilación de la enzima (31). Por consiguiente, nuestro objetivo fue esclarecer la función de la TNAP en las IEC en inflamación utilizando para ello los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  y el modelo de colitis experimental de DSS.

Se llevaron a cabo dos protocolos experimentales que se diferencian en el tiempo de exposición al DSS. Primero se llevó a cabo un experimento en el que los ratones recibieron DSS durante 7 días, que nos hizo plantear un segundo protocolo experimental para constatar cambios en una fase más temprana. Por lo tanto, en este segundo protocolo experimental los ratones fueron sacrificados a día 4 y a día 7.

#### **4.3.1. Estudio macroscópico y microscópico en la colitis inducida por DSS durante 7 días**

Tras la administración de tamoxifeno, los animales  $Alpl^{IEC-/-}$  y sus respectivos WT fueron sometidos a colitis experimental inducida por DSS al 2,5% (p:v). El diseño experimental fue 2x2, utilizando agua como control. Los ratones se monitorizaron durante los 7 días de experimento, realizando un seguimiento exhaustivo del peso y determinando la presencia de sangre en heces y la consistencia de estas. El experimento se prolongó hasta los 7 días, cuando la enfermedad está totalmente instaurada.

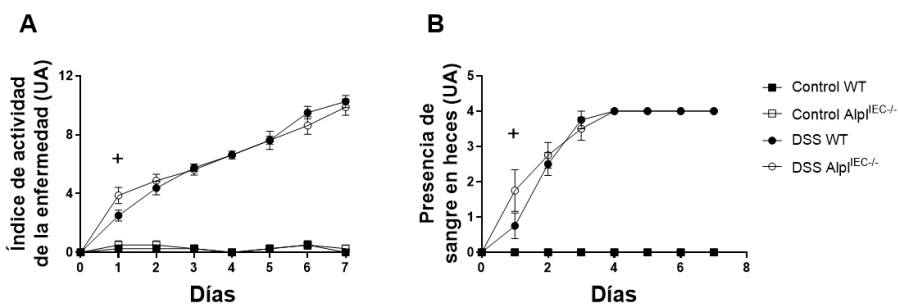
Como se puede ver en la Figura 48, los ratones que recibieron DSS mostraron una pérdida de peso sustancial a partir del día 4 que fue progresiva hasta el día del sacrificio. Dicha pérdida de peso fue más mayor significativamente en el caso de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  a día 7 de experimento en comparación con los ratones WT.



**Figura 48. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS durante 7 días.** Evolución de pesos de los animales WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  durante la colitis experimental inducida por DSS. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso adquirido o perdido, tomando como referencia el peso inicial de cada animal. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

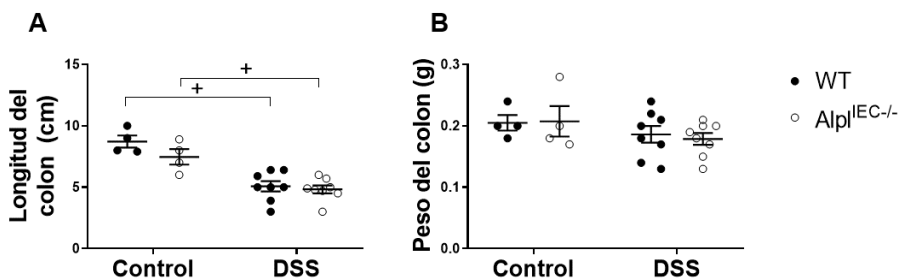
El índice de actividad de la enfermedad (o DAI, *Disease Activity Index*) es un parámetro que muestra la gravedad de la enfermedad y recoge el porcentaje de pérdida de peso, la presencia de sangre en heces y la consistencia de estas. El DAI aumentó poco después de la exposición al DSS (Figura 49A), siendo este mayor en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  a causa de mayor presencia de sangre en heces, aunque más tarde se igualó a los WT (Figura 49B).

## RESULTADOS



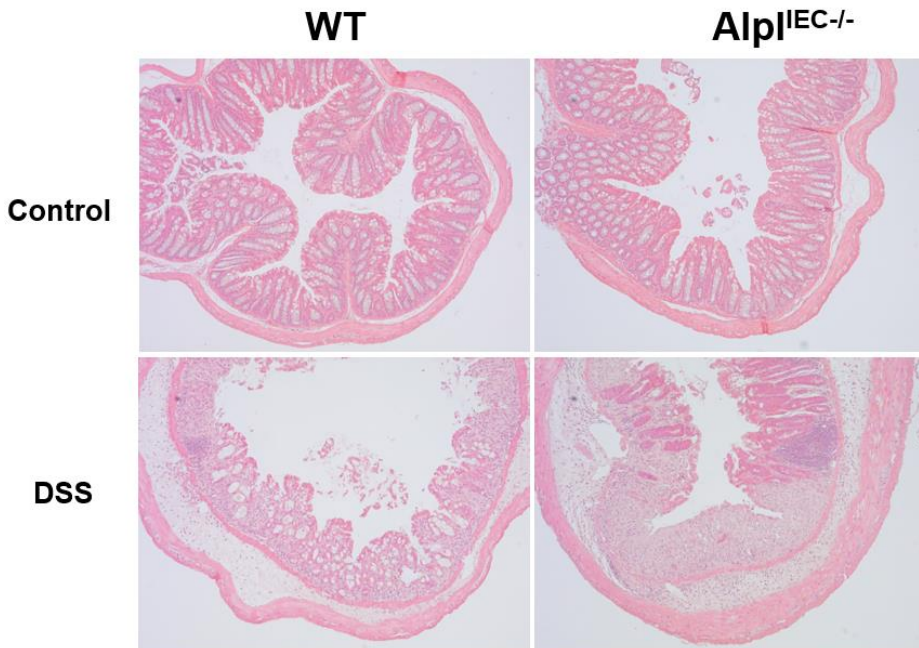
**Figura 49. Evolución del índice de actividad de la enfermedad en la colitis inducida por DSS durante 7 días.** Evolución del DAI (A) y presencia de sangre en heces (B) en los animales WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup> durante la colitis experimental inducida por DSS durante 7 días. Grupos: control (WT n=4 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=4) y DSS (WT n=8 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

El examen macroscópico reveló un colon más acortado en ratones que recibieron DSS, sin diferencias entre genotipos (Figura 50A). Cabe destacar que no se observaron cambios en el peso del colon en los ratones colíticos (Figura 50B).



**Figura 50. Longitud (A) y peso (B) del colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Grupos: control (WT n=4 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=4) y DSS (WT n=8 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

Para evaluar el colon a nivel microscópico, se realizaron cortes de parafina y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina, lo que nos permitió estudiar la morfología e infiltración de células del sistema inmunitario, entre otros parámetros. Como puede verse en la Figura 51, los ratones controles muestran una morfología sana, sin infiltración en la mucosa o submucosa. Por el contrario, el DSS provocó la pérdida de estructuras de las criptas, la pérdida de células caliciformes, infiltración de células inmunitarias en la submucosa y mucosa, el engrosamiento de la capa muscular e hiperplasia (Figura 51).

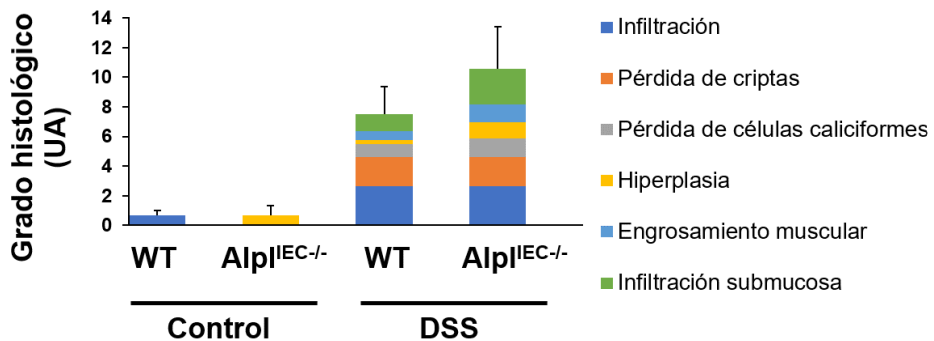


**Figura 51. Cortes histológicos de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina y eosina de colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  en la colitis inducida por DSS a día 7.

Profundizando más en el estudio histológico, se evaluaron a simple ciego los cortes de todos los animales en base a lo mencionado en el

## RESULTADOS

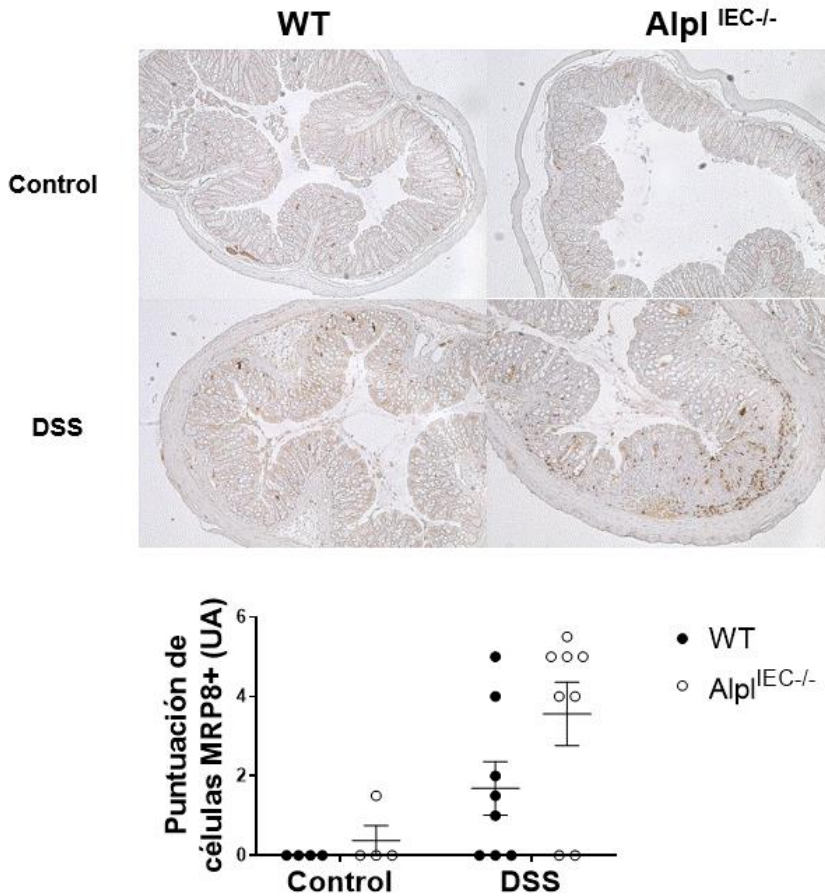
apartado de material y métodos. Como muestra la Figura 52, los ratones que recibieron DSS presentan mayor grado histológico, sin diferencias entre genotipos. Se debe destacar que la ausencia de *Alpl* en IEC conllevó una mayor infiltración celular en la submucosa colónica.



**Figura 52. Grado histológico de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Evaluación de los diferentes parámetros realizada a simple ciego. Grupos: control (WT n=4 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=4) y DSS (WT n=8 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

Para poder determinar si las células infiltradas eran neutrófilos, se realizaron estudios de inmunohistoquímica para la detección de células MRP8+. El número de células MRP8+ fue mayor en los ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> tras la inducción de la colitis (Figura 53), aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos colíticos.





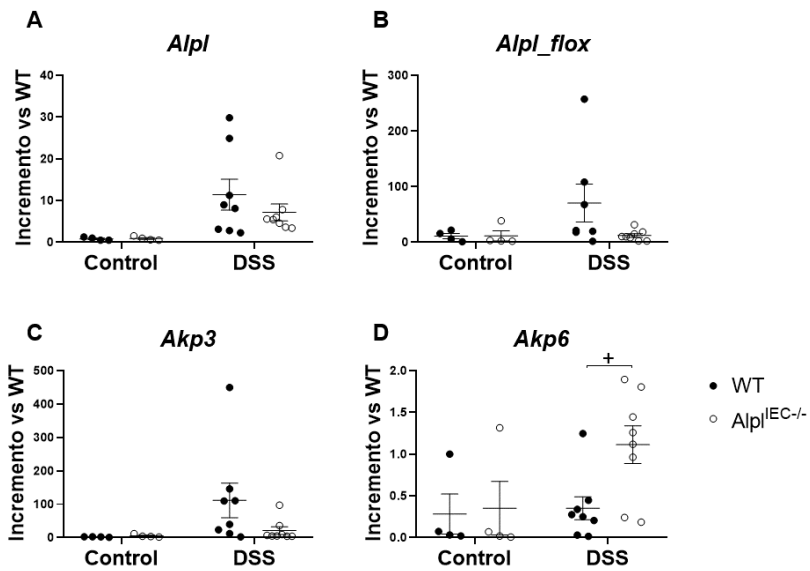
**Figura 53. Presencia de células MRP8+ en cortes histológicos de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Imágenes representativas de IHC de MRP8 y puntuación de células MRP8+ de colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  en la colitis inducida por DSS a día 7. Evaluación realizada a simple ciego.

#### 4.3.2. Estudio de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon en la colitis inducida por DSS durante 7 días

En primer lugar, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ . En la Figura 54A, observamos el aumento en la expresión de *Alpl* en ratones con colitis sin diferencias entre genotipos. Además, tal y como se ha explicado en el anterior apartado, se utilizaron los cebadores

## RESULTADOS

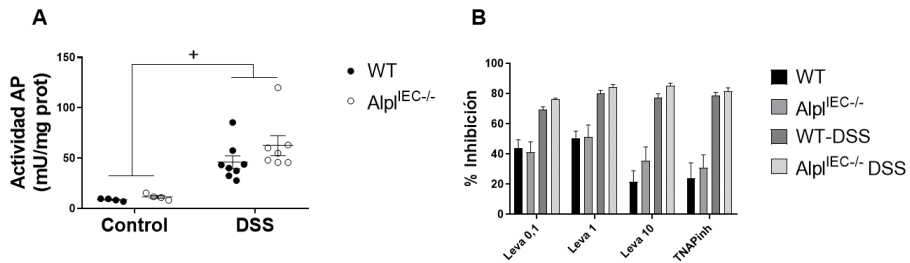
*Alpl\_flox* para determinar el silenciamiento del gen en los enterocitos, observándose la delección del gen en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  (Figura 54B). Los ratones WT colíticos mostraron una mayor tendencia en la expresión génica de la isoforma duodenal (*Akp3*), cosa que no se observa en los ratones que carecen de *Alpl* en enterocitos (Figura 54C). Por el contrario, se observó un incremento significativo en la expresión de *Akp6* en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  con DSS (Figura 54D).



**Figura 54. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas de AP en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Expresión génica de *Alpl* (A), *Alpl\_flox* (B), *Akp3* (C) y *Akp6* (D) por RT-qPCR en colon. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

La actividad fosfatasa alcalina se vio sustancialmente aumentada por el DSS independientemente del genotipo (Figura 55A), mostrando la existencia de un estado inflamatorio colónico. Tal y como se ha recogido anteriormente, el DSS provocó un cambio de isoforma tras la administración de DSS, de tipo hepática (resistente a la inhibición por

levamisol) a tipo ósea-renal (sensible a la inhibición por levamisol) (Figura 55B). Además de levamisol, se utilizó un inhibidor específico de TNAP (TNAP<sub>inh</sub>), con el que se vio el mismo efecto.

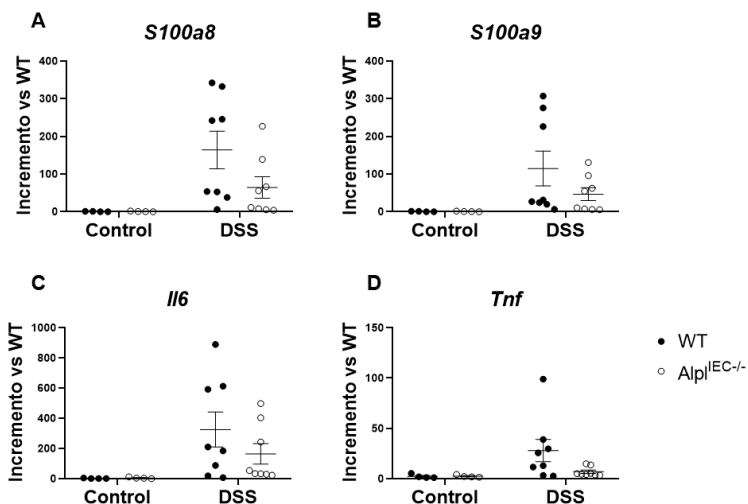


**Figura 55. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** (A) Actividad AP mU/mg proteína; (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol (Leva) y TNAP<sub>inh</sub> (40μM). Grupos: control (WT n=4 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=4) y DSS (WT n=8 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

#### 4.3.3. Estudio de parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS durante 7 días

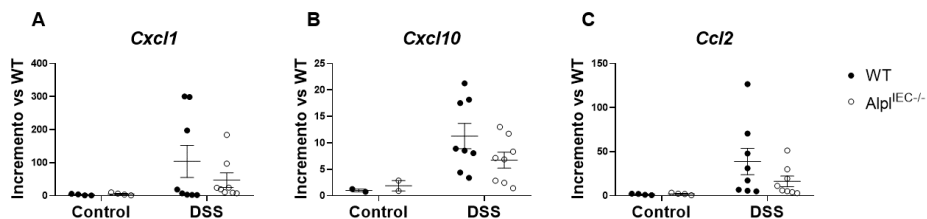
Además de la actividad AP, se evaluaron múltiples parámetros de inflamación para poder caracterizar la colitis en el tejido colónico de los ratones. Mediante RT-qPCR se estudió la expresión génica de marcadores de inflamación como *S100a8*, *S100a9*, *I16* y *Tnf*. La expresión de estos genes estuvo aumentada a causa de la colitis, siendo este aumento menor en los ratones sin Alpl<sup>IEC-/-</sup>, aunque no fue significativo (Figura 56A-D).

## RESULTADOS



**Figura 56. Evaluación del estado inflamatorio del colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Resultados mediante RT-qPCR de los genes *S100a8* (A), *S100a9* (B), *Il6* (C) y *Tnf* (D). Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

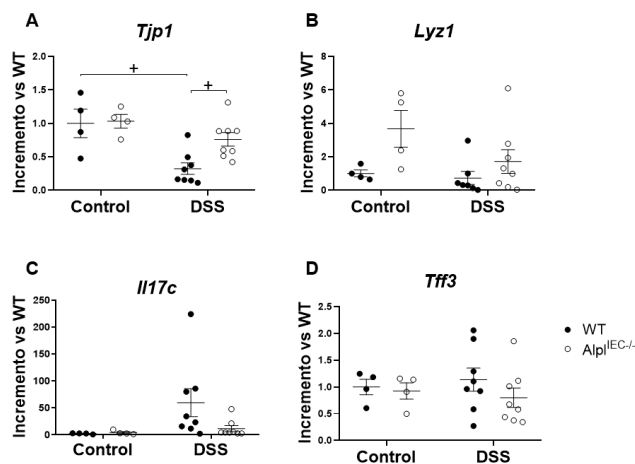
Se midieron también la expresión de ciertas quimioquinas como *Cxcl1*, *Cxcl10* y *Ccl2*, que siguieron la misma tendencia que los marcadores medidos anteriormente, es decir, el DSS provoca una mayor expresión de estos, pero es más atenuada en el caso de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  (Figura 57A-C).



**Figura 57. Expresión génica de quimioquinas en el colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días.** Resultados mediante RT-qPCR de los genes *Cxcl1* (A), *Cxcl10* (B) y *Ccl2* (C). Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

#### 4.3.4. Estudio de parámetros de integridad de la función de barrera intestinal en la colitis inducida por DSS durante 7 días

Se analizó la expresión de marcadores de la integridad de la función barrera intestinal como *Tjp1*, que codifica para la proteína de unión estrecha ZO-1, *I17c*, que regula la inmunidad innata reclutando péptidos antimicrobianos y citoquinas proinflamatorias, marcadores de poblaciones celulares como células de Paneth con *Lyz1*, y *Tff3*, expresada por las células caliciformes contribuyendo a la inmunidad innata del intestino. El DSS provocó una bajada en la expresión de *Tjp1* en el caso de los ratones WT (Figura 58A). En cuanto a marcadores celulares, los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  presentan una mayor tendencia a la expresión de *Lyz1* independientemente del tratamiento (ANOVA  $p=0,01$   $Alpl^{IEC-/-}$  vs WT) (Figura 58B). Además, la colitis provocó un incremento no significativo estadísticamente en la expresión de *I17c* solamente en los ratones WT (Figura 58C). Finalmente, el DSS no provocó cambios en los niveles de expresión de *Tff3* en ninguno de los dos genotipos (Figura 58D).

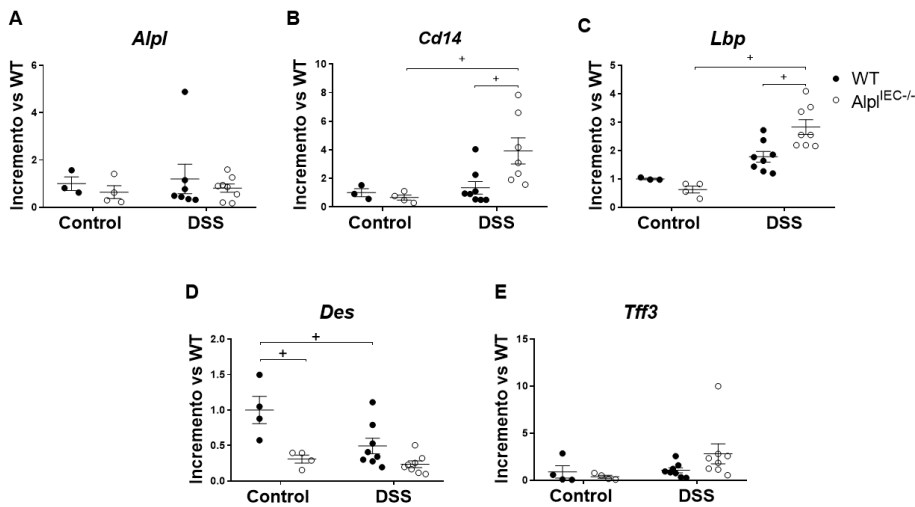


**Figura 58. Expresión génica de *Tjp1* (A), *Lyz1* (B), *I17c* (C) y *Tff3* (D) en el colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .**

## RESULTADOS

### 4.3.5. Estudio del impacto de la inflamación a nivel sistémico en la colitis inducida por DSS durante 7 días

El DSS provoca un estado de inflamación en el colon de los ratones, debilitando además la barrera intestinal lo que permitirá el paso a antígenos bacterianos al sistema circulatorio, teniendo consecuencias a nivel sistémico. A nivel hepático, la ausencia de *Alpl* en enterocitos no tuvo efectos en la expresión de *Alpl* en el tejido hepático, ni tampoco la administración del DSS (Figura 59A). Sin embargo, la colitis provocó el incremento de genes relacionados con la detoxificación de LPS (*Cd14* y *Lbp*) como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal, siendo significativo solamente para los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  (Figura 59B/C). Además, se apreció una disminución del gen *Des* a causa de la administración de DSS, relacionado con fibrosis. Por último, no se observan cambios en la expresión de *Tff3* hepáticos (Figura 59E).



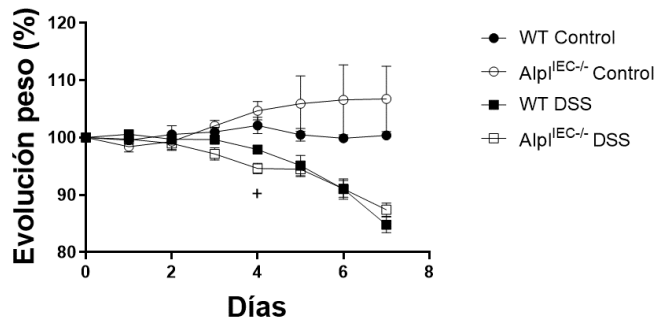
En resumen, y hasta este momento, se concluyó que mediante el modelo experimental de colitis inducida por DSS los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* presentan un fenotipo mixto, con mayor infiltración y daño histológico pero menor expresión de marcadores inflamatorios. Además, se observaron cambios a nivel hepático en ratones deficientes en TNAP en el epitelio intestinal. Para poder esclarecer el desarrollo temporal de la inflamación en este fenotipo, se decidió realizar un segundo protocolo experimental en el que los animales se sacrificaron a día 4 y día 7 de la colitis experimental inducida por DSS.

#### **4.3.6. Estudio macroscópico y microscópico en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días**

Se administró tamoxifeno a ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* y sus respectivos WT para posteriormente someterlos a colitis experimental por DSS al 2,5% (p:v) y utilizando agua como control. Los animales fueron sacrificados a día 4 y día 7. Estudiar el estado de la inflamación intestinal a día 4 es muy relevante para poder determinar la respuesta del colon en etapas tempranas de la enfermedad. Al igual que en el apartado anterior, se realizó el seguimiento del peso, determinación de sangre en heces y su consistencia.

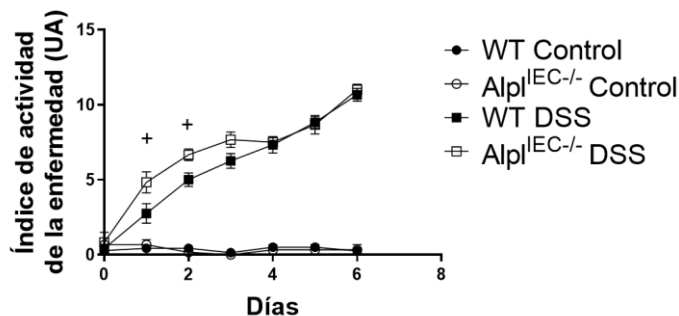
La Figura 60 muestra la pérdida de peso que sufren los ratones administrados con DSS hasta el día 4. En este caso, la ausencia de *Alpl* en enterocitos provocó una pérdida de peso más acusada. A pesar de que la pérdida de peso fue progresiva hasta el final del experimento, a partir del día 5 no se muestran diferencias significativas entre genotipos.

## RESULTADOS



**Figura 60. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS durante 7 días (protocolo experimental a dos tiempos).** Evolución de pesos de los animales WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup> durante la colitis experimental por DSS. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso, tomando como referencia el peso inicial de cada animal. Grupos: control (WT n=7 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

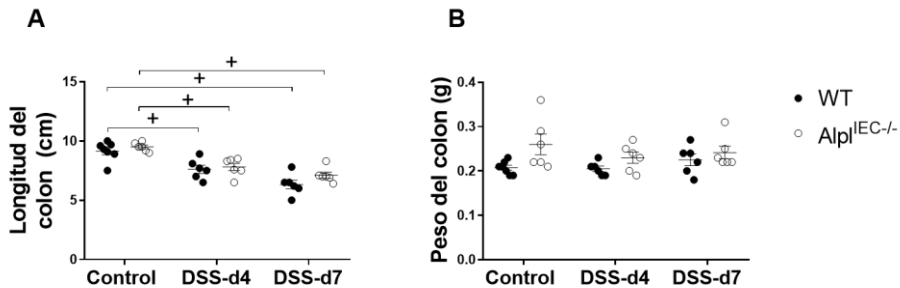
Pasamos a medir el índice de actividad de la enfermedad, que recoge la pérdida de peso, presencia de sangre en heces y consistencia de estas. Tal y como se dio anteriormente, los ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> mostraron un mayor índice de actividad de la enfermedad en etapas tempranas, sin embargo, esto se iguala a los WT a día 4 (Figura 61).



**Figura 61. Evolución del índice de actividad de la enfermedad en la colitis inducida por DSS durante 7 días (protocolo experimental a dos tiempos).** Evolución del DAI en los animales WT y Alpl<sup>IEC-/-</sup> durante la colitis experimental por DSS durante 7 días. Grupos: control (WT n=7 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .



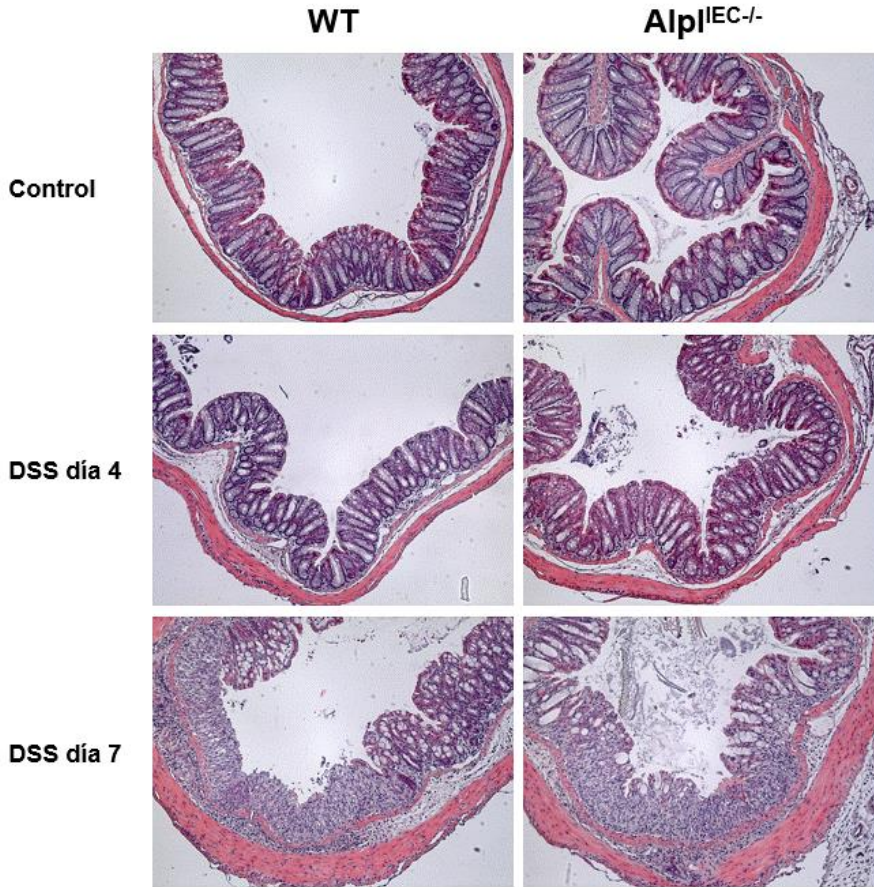
En este experimento, al igual que en el anterior, también se observó el acortamiento del colon típico de este modelo experimental de colitis inducida por DSS, tanto a 4 como a 7 días (Figura 62A). No se observaron cambios en el peso del tejido colónico (Figura 62B).



**Figura 62. Longitud (A) y peso (B) del colon en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** Grupos: control (WT n=7 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

El estudio histológico mediante hematoxilina y eosina mostró una infiltración masiva de células del epitelio intestinal a día 7 en ambos genotipos (Figura 63). A día 4 no se observaron grandes cambios a nivel histológico en comparación con los controles (Figura 63).

## RESULTADOS

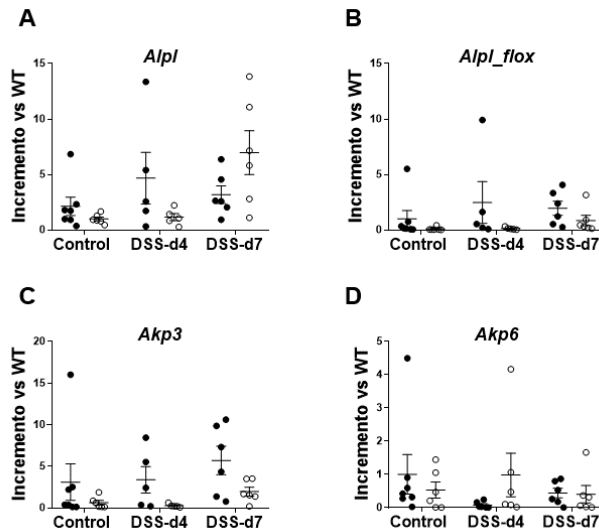


**Figura 63. Cortes histológicos de colon en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina y eosina de colon de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.

### 4.3.7. Estudio de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días

Se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de las isoenzimas de fosfatasa alcalina en el colon de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> a día 4 y día 7. En la Figura 64A, observamos el aumento en la expresión de *Alpl* en ratones con colitis a día 7 sin diferencias entre genotipos, mientras que se aprecia el silenciamiento del gen tal y como muestra la Figura 64B. El DSS provocó un incremento en la expresión de *Akp3* en los ratones

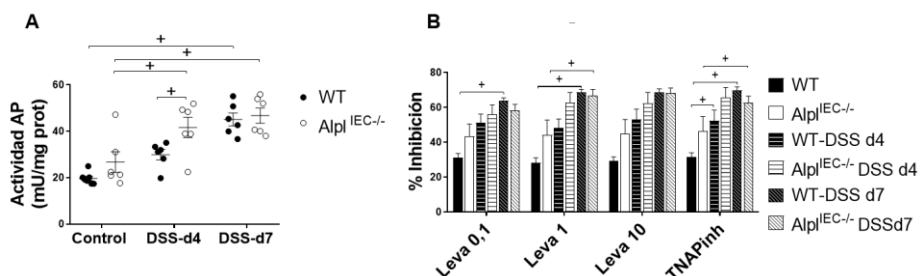
WT tanto a día 4 como a día 7, efecto que no se observa en los ratones que carecen de *Alpl* en enterocitos (Figura 64C). Por el contrario, se observó una tendencia a aumentar la expresión de *Akp6* en los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> con DSS solamente a día 4, aunque no significativa estadísticamente (Figura 64D).



**Figura 64. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas de AP en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 4 y 7 días.** Expresión génica de *Alpl* (A), *Alpl\_flox* (B), *Akp3* (C) y *Akp6* (D) por RT-qPCR en colon. Grupos: control (WT n=7 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05.

La actividad fosfatasa alcalina colónica se vio incrementada en los grupos DSS a 7 días tal y como se vio anteriormente (Figura 65A). Este incremento se observa también a 4 días, pero solamente es significativo estadísticamente en el caso de los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> (Figura 65A). El uso de inhibidores específicos reveló también un cambio en el patrón de glicosilación a causa de la inflamación, indicando un posible cambio de isoforma de TNAP de hepática a tipo ósea-renal, desde etapas tempranas de la inflamación colónica (Figura 65B).

## RESULTADOS

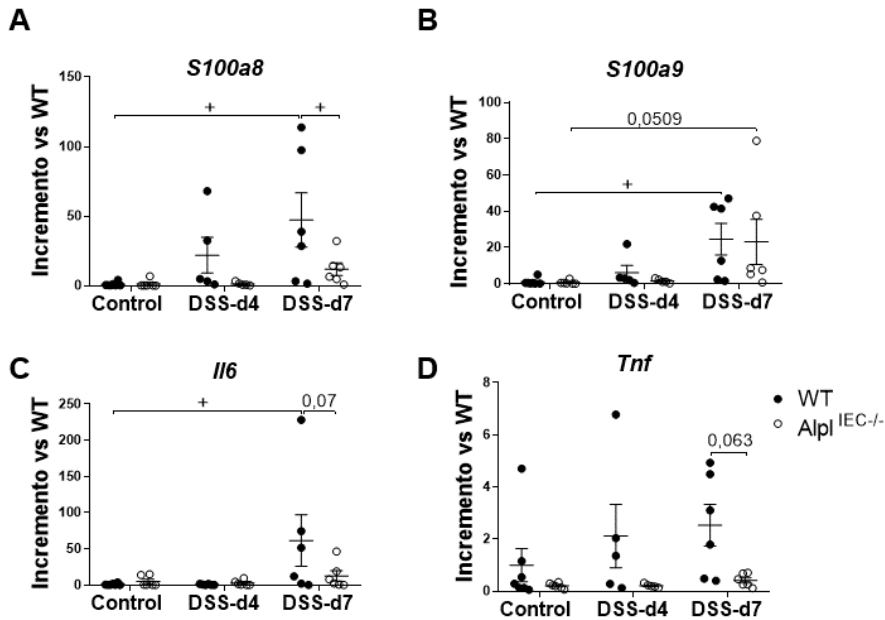


**Figura 65. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** (A) Actividad AP mU/mg proteína. (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol (Leva) y TNAPinh (40 $\mu$ M). Grupos: control (WT n=7 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y Alpl<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +: p<0,05.

### 4.3.8. Estudio de parámetros inflamatorios en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días

Nuevamente, se determinaron parámetros inflamatorios mediante RT-qPCR. Al tratarse de un periodo de seguimiento corto, muchos de los parámetros de inflamación no estaban modificados respecto a los controles sanos a día 4. No obstante, tal y como se dio en el anterior experimento, la ausencia de *Alpl* intestinal resultó en un menor estado inflamatorio a nivel intestinal. Concretamente, a los días 4 y 7, se observa un incremento de *S100a8* en ratones WT, efecto que se aprecia desde el día 4, pero que no se da en ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> colíticos (Figura 66A). La expresión de *S100a9* a día 4 se vio incrementada 4,6 veces en los ratones WT respecto a sus controles, mientras que en el caso de los ratones Alpl<sup>IEC-/-</sup> el incremento fue menor (1,9 veces) (Figura 66B). Cabe destacar que en ninguno de los dos casos fue significativo. A día 7 sí observamos un claro incremento en la expresión de *S100a9* respecto a sus controles en ambos genotipos (Figura 66B). Además, la administración de DSS supone una mayor expresión de *Il6*, pero solamente en ratones WT. La inducción de la expresión de esta citoquina es menor en el caso de los animales Alpl<sup>IEC-/-</sup>, aunque no es

significativo estadísticamente (Figura 66C). La expresión de otro gen relacionado con la inflamación, *Tnf*, muestra un patrón similar independientemente del día de tratamiento, aunque es remarkable que los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> muestran menores niveles de esta citoquina, aunque sin alcanzar diferencias significativas (Figura 66D).

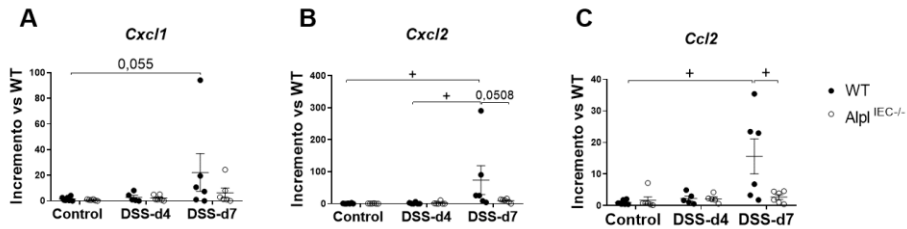


**Figura 66. Evaluación del estado inflamatorio del colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** Resultados mediante RT-qPCR de los genes *S100a8* (A), *S100a9* (B), *Il6* (C) y *Tnf* (D). Grupos: control (WT n=7 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

Determinamos la presencia de quimioquinas en el colon de animales WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> tanto a día 4 como a día 7. A día 4 no se induce la expresión de las quimioquinas *Cxcl1*, *Cxcl2* o *Ccl2* (Figura 67A-C). En cambio, la expresión de estas se vio incrementada a día 7 solamente en ratones WT, aunque en el caso de *Cxcl1* no fue significativo

## RESULTADOS

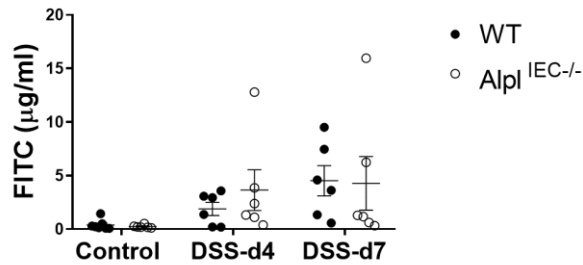
estadísticamente. Se puede observar que, una vez más, a día 7, los ratones WT colíticos muestran mayores niveles de estas quimioquinas en comparación con los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ , aunque dicho efecto solo fue significativo en el caso de *Ccl2* (Figura 67C).



**Figura 67. Expresión génica de quimioquinas en el colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** Resultados mediante RT-qPCR de los genes *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B) y *Ccl2* (C). Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

### 4.3.9. Estudio de parámetros de función de barrera intestinal en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días

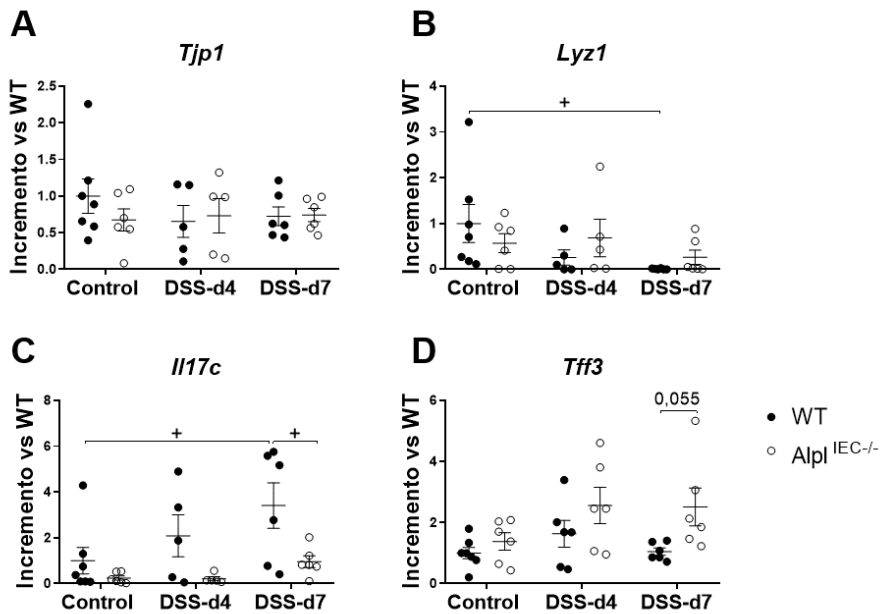
Estudiamos la permeabilidad intestinal mediante la administración oral de FITC dextrano 4 kD 4 horas antes del sacrificio de los ratones, y posteriormente se determinó la presencia de esta molécula en el plasma de los animales por fluorimetría. La administración de DSS provocó un mayor paso de FITC dextrano a sangre, sin diferencias entre genotipos (Figura 68).



**Figura 68. Determinación de FITC dextrano 4 kD en plasma en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7.** Resultados mediante fluorimetría. Grupos: control (WT n=7 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

Posteriormente, se estudió la expresión de genes que garantizan el correcto mantenimiento de la integridad intestinal. La ausencia de *Alpl* en enterocitos ni la colitis provocaron cambios en la expresión de *Tjp1* (Figura 69A). En cuanto a *Lyz1*, marcador de células de Paneth, se ve inhibida en los ratones WT tras la administración de DSS (Figura 69B). Este fenómeno no se dio en ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> colíticos (Figura 69B). En cuanto a la expresión de *Il17c*, la cual juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa, se ve incrementada en los ratones WT con DSS pudiendo indicar la existencia de un método de protección intestinal (Figura 69C). No obstante, la ausencia de *Alpl* no induce el incremento de esa citoquina a 4 ni a 7 días (Figura 69C). Por último, se aprecia una cierta tendencia al aumento de los niveles de expresión de *Tff3* en ratones que carecen de *Alpl* en enterocitos tanto en estado basal como en presencia de DSS (Figura 69D).

## RESULTADOS



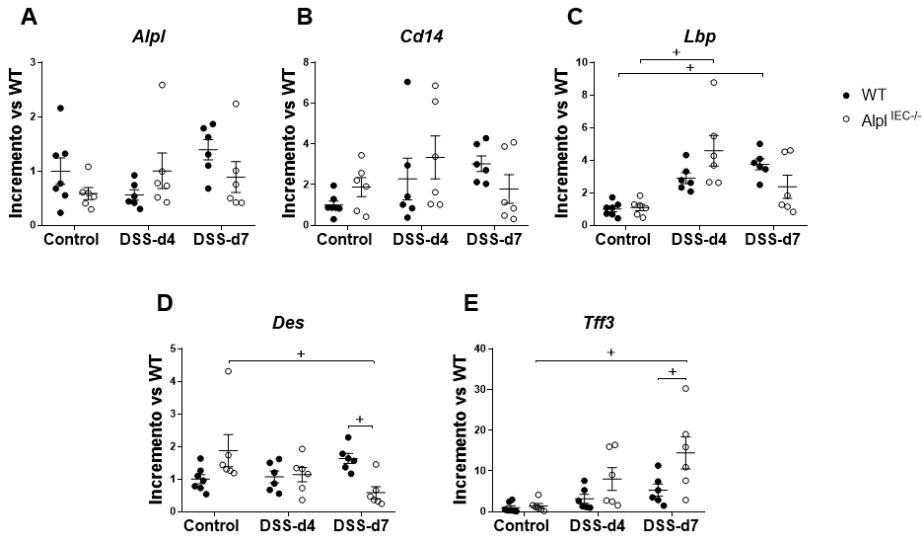
**Figura 69.** Expresión génica de *Tjp1* (A), *Lyz1* (B), *Il17c* (C) y *Tff3* (D) en el colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=7 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6), DSS día 4 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> n=6). Los resultados fueron expresados como media ± EEM.

### 4.3.10. Estudio del impacto de la inflamación a nivel sistémico en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días

Se midió el efecto de la ausencia de *Alpl* intestinal en el hígado en la colitis inducida por DSS a 4 y 7 días. La colitis no provocó cambios significativos en la expresión de *Alpl* en el tejido hepático (Figura 70A). Sin embargo, se observaron cambios en los genes relacionados con la detoxificación de LPS (*Cd14* y *Lbp*) (Figura 70B/C). En concreto, a día 4 se observa un incremento en la expresión de ambos genes, aunque solo significativo para *Lbp* en ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>. Los ratones WT mostraron mayor expresión de *Lbp* a día 7, efecto que se vio atenuado en ratones *knockout* (Figura 70C). Evaluando el efecto fibrótico de la ausencia de TNAP en un ambiente inflamatorio, se observó un menor



nivel génico de *Des* a día 7 de DSS en los animales  $Alpl^{IEC-/-}$  (Figura 70D), a diferencia de *Tff3*, que aumenta su expresión en los ratones *knockout* en condiciones de inflamación, siendo significativo significativamente a 7 días (Figura 70E).

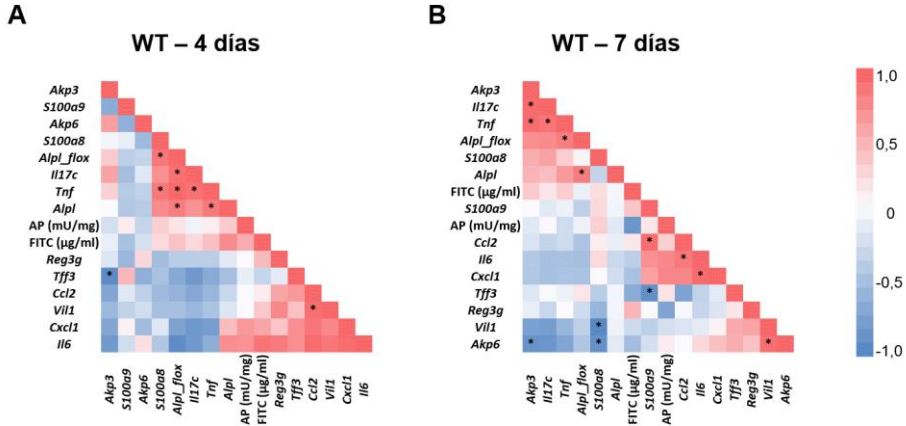


**Figura 70. Expresión génica de *Alpl* (A), *Cd14* (B), *Lbp* (C), *Des* (D) y *Tff3* (E) en el hígado en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .**

#### 4.3.11. Estudios de correlación en la colitis inducida por DSS durante 4 y 7 días

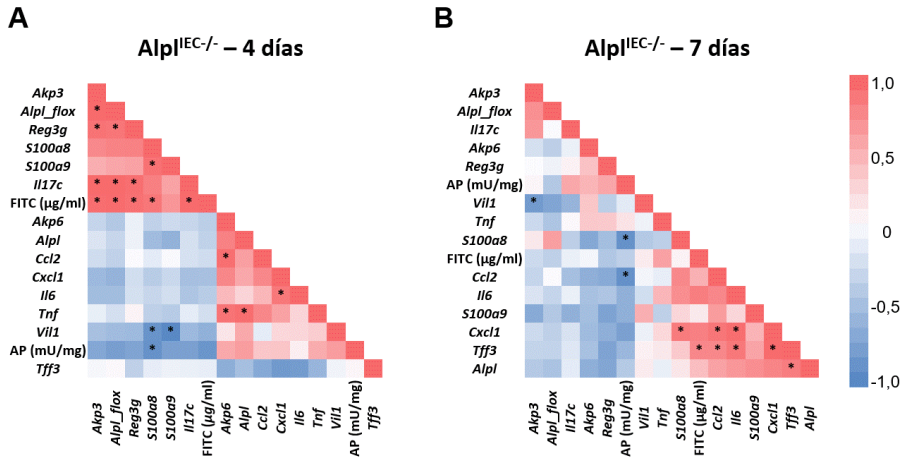
En los ratones WT colícticos se aprecia a 4 días una asociación muy clara y estadísticamente significativa entre *Alpl* y *Alpl\_flox* y *S100a8*, *Il17c* y *Tnf* (Figura 71A), lo que indicaría la inducción de *Alpl* una respuesta inflamatoria temprana. En los ratones WT con DSS a 7 días se pierde la correlación de *Alpl* y *Alpl\_flox* con *S100a8*, y se mantienen las observadas a día 4 (Figura 71B). Tanto a 4 como a 7 días existe una asociación *Cxcl1-Ccl2-Il6*.

## RESULTADOS



**Figura 71. Matriz de correlación de la expresión génica en colon de ratones WT en la colitis inducida por DSS.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran con un asterisco.

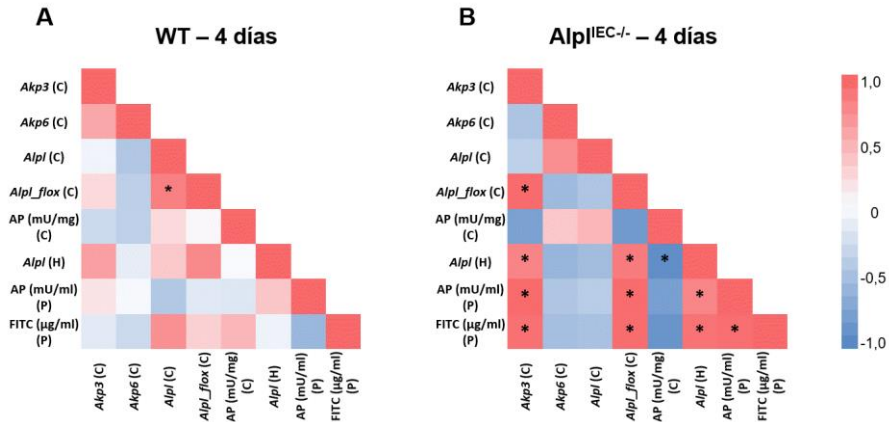
Como se ha comentado anteriormente, los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> presentan una menor expresión de marcadores inflamatorios de inducción temprana, es decir, *S100a8*, *Tnf*, *Il17c*, a 4 días. Por este motivo existe una correlación generalizada, por una parte, de *Akp6*, *Alpl*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Il6* y *Tnf*, y por otra de *Akp3*, *Alpl\_flox*, *Reg3g*, *S100a8*, *S100a9* e *Il17c* (Figura 72A). No existe relación, por otra parte, entre *Akp3* y *Akp6*. Es interesante examinar las correlaciones de *Alpl* en estos ratones a 7 días, ya que en este grupo se observa la inducción de *Alpl*, que en principio es de origen extraepitelial. Existe en este caso una correlación positiva con *Cxcl1*, *Ccl2*, *Il6* y *S100a9* (como en los ratones WT, lo que es coherente con un origen extraepitelial), y negativa con *Reg3g*, *Akp6*, y *Akp3* (Figura 72B).



**Figura 72. Matriz de correlación de la expresión génica en colon de ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en la colitis inducida por DSS.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran con un asterisco.

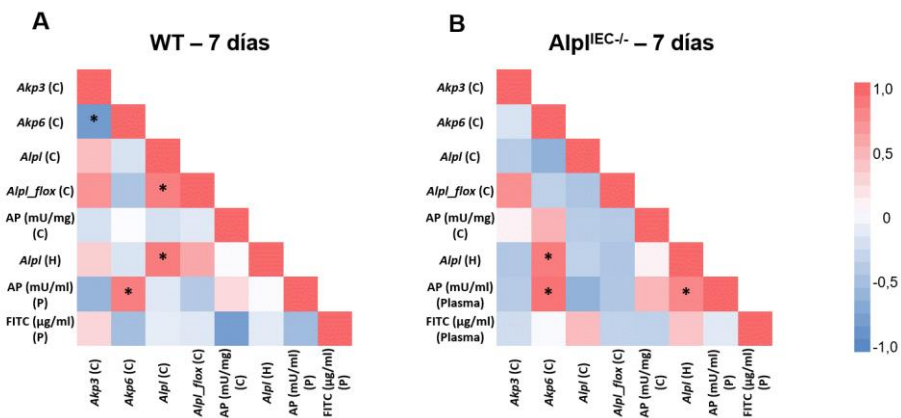
En este contexto, es interesante estudiar la expresión de las isoenzimas intestinales y la actividad AP, tanto plasmática como colónica. A 4 días, la actividad AP plasmática en los ratones WT está asociada modestamente con la expresión hepática de *Alpl* (Figura 73A). En contraste, en los ratones *knockout* se observó una correlación positiva más clara entre la actividad AP plasmática y la expresión de *Alpl* en el hígado, así como con la *Akp3* colónica (Figura 73B)

## RESULTADOS



**Figura 73. Matriz de correlación parámetros colónicos (C), hepáticos (H) y plasmáticos (P) de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  a 4 días en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran con un asterisco.**

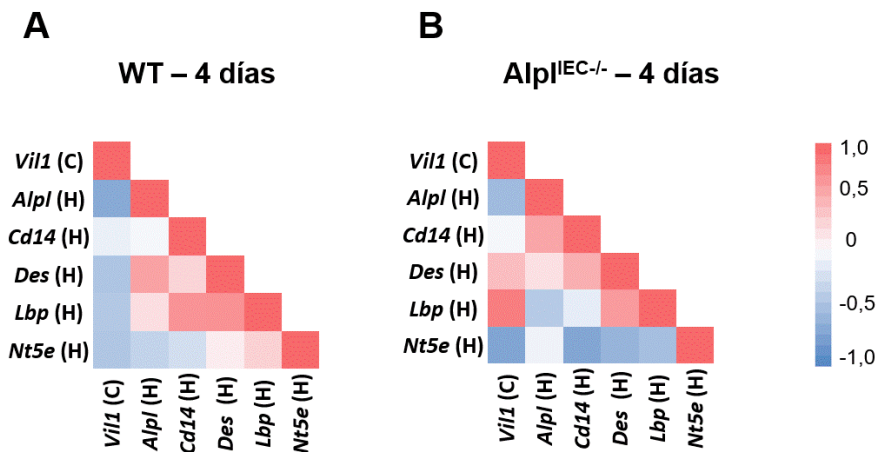
A los 7 días, se observa una correlación positiva entre la actividad de AP en el plasma y *Akp6* en ambos genotipos (Figura 74A/B). Sin embargo, en los ratones *knockout*, persiste la correlación con la expresión de *Alpl* en el hígado (Figura 74B).



**Figura 74. Matriz de correlación parámetros colónicos (C), hepáticos (H) y plasmáticos (P) de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  a 7 días en la colitis inducida**

**por DSS.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran con un asterisco.

En las etapas iniciales de la colitis (4 días) se puede apreciar un deterioro hepático como resultado de las lesiones epiteliales observadas. La expresión de villina (*Vil1*) en el colon presenta una correlación negativa a 4 días en ratones WT con los genes hepáticos *Nt5e*, *Alpl* y *Des* (Figura 75A). Los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> presentan también este tipo de correlación, pero no en el caso de *Des*, que exhibe la tendencia contraria, y *Lbp*, que tiene una fuerte correlación positiva con la villina (Figura 75B).

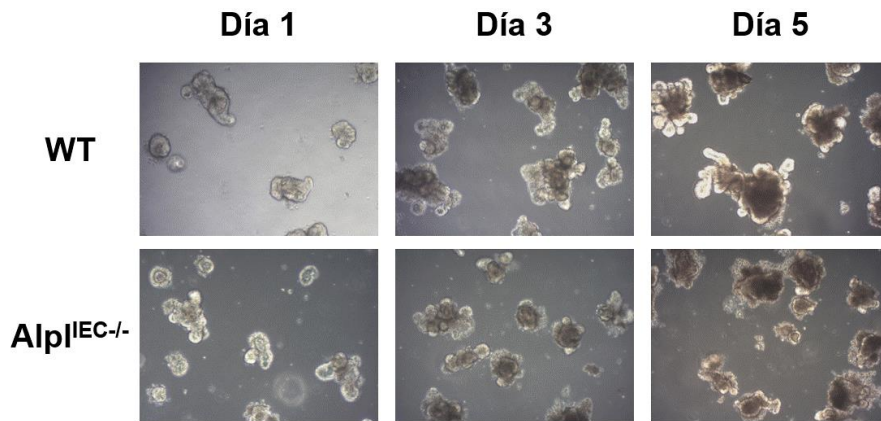


**Figura 75. Matriz de correlación de la expresión génica en colon (C) e hígado (H) de ratones WT y *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en la colitis inducida por DSS.** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran con un asterisco.

## RESULTADOS

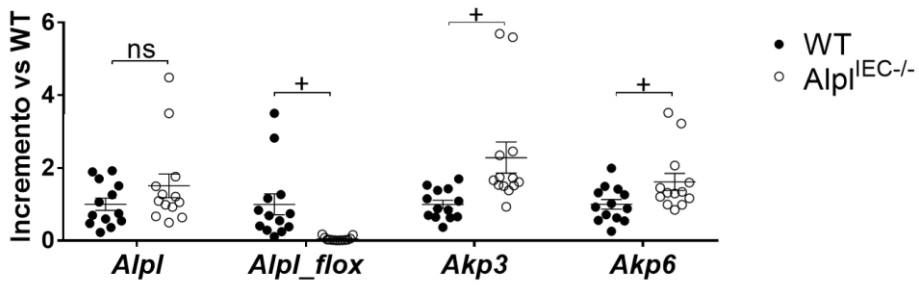
### 4.4. $Alpl^{IEC-/-}$ *in vitro*: organoides

El uso de organoides intestinales proporcionan información del estado del intestino en ausencia de células del sistema inmunitario. Se obtuvieron organoides de yeyuno de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ . Primeramente, se indujo la delección del gen  $Alpl$  en los organoides añadiendo tamoxifeno  $1\mu\text{M}$  *in vitro* (Figura 76).



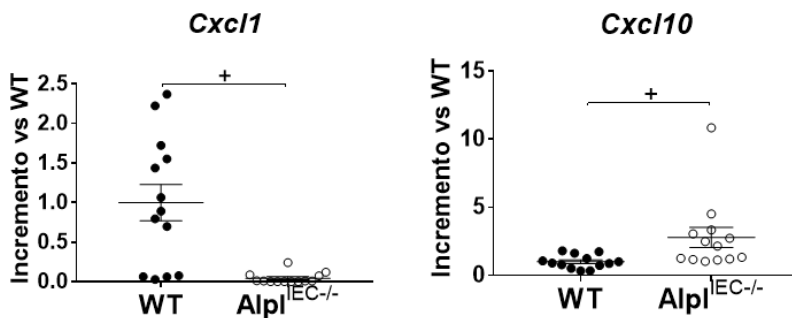
**Figura 76. Organoides de yeyuno de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ .** Fotografías representativas de organoides de yeyuno de ratones a día 1, 3 y 5 tras el silenciamiento con tamoxifeno  $1\mu\text{M}$ .

La adición de tamoxifeno supuso el silenciamiento del gen  $Alpl$  tal y como lo vemos con la utilización de los cebadores  $Alpl\_flox$  (Figura 77). La ausencia del gen provocó el incremento en la expresión de las isoenzimas intestinales  $Akp3$  y  $Akp6$  (Figura 77).



**Figura 77. Estudio de la expresión génica de *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3* y *Akp6* en organoides de yeyuno.** Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

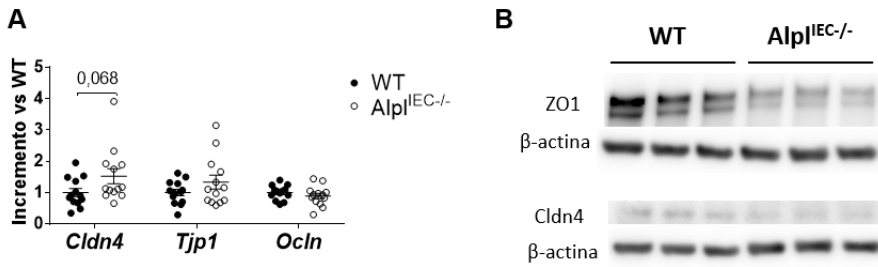
La ausencia de *Alpl* dio lugar a un descenso drástico en la expresión de la quimioquina *Cxcl1*, y el incremento de *Cxcl10* (Figura 78).



**Figura 78. Estudio de la expresión génica de *Cxcl1* y *Cxcl10* en organoides de yeyuno.** Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ .

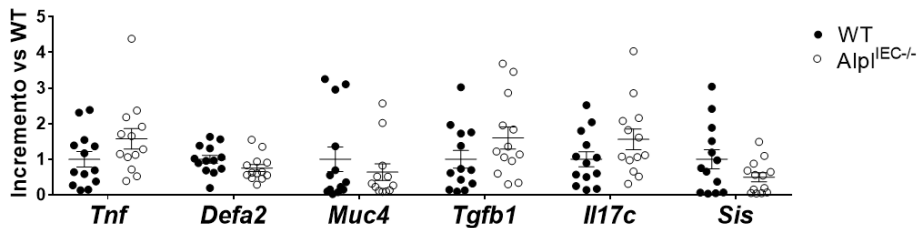
En el caso de los genes que codifican proteínas de uniones estrechas, como claudina-4 (*Cldn4*), ZO-1 (*Tjp1*) u ocludina (*Ocln*), su expresión se mantuvo en organoides *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> en valores similares a los organoides de ratones WT (Figura 79A). No obstante, los organoides yeyunales *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> mostraron menores niveles de las proteínas implicadas en uniones estrechas ZO-1 y claudina 4 (Figura 79B).

## RESULTADOS



**Figura 79. Estudio de la expresión génica y proteica de proteínas implicadas en las uniones estrechas en organoides de yeyuno.** (A) Expresión génica por RT-qPCR de los genes *Cldn4*, *Tjp1* y *Ocln*. (B) Expresión proteica mediante *Western Blot* de ZO-1 y claudina-4 (*Cldn4*) (B). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. Se muestra el valor de p para las diferencias de expresión en *Cldn4*.

Además, se analizaron genes asociados con la integridad intestinal o su defensa (Figura 80). Existe un incremento aparente, aunque no significativo en la expresión de *Tnf*, *Tgfb1* e *Il17c* en los organoides deficientes en *Alpl* (Figura 80).



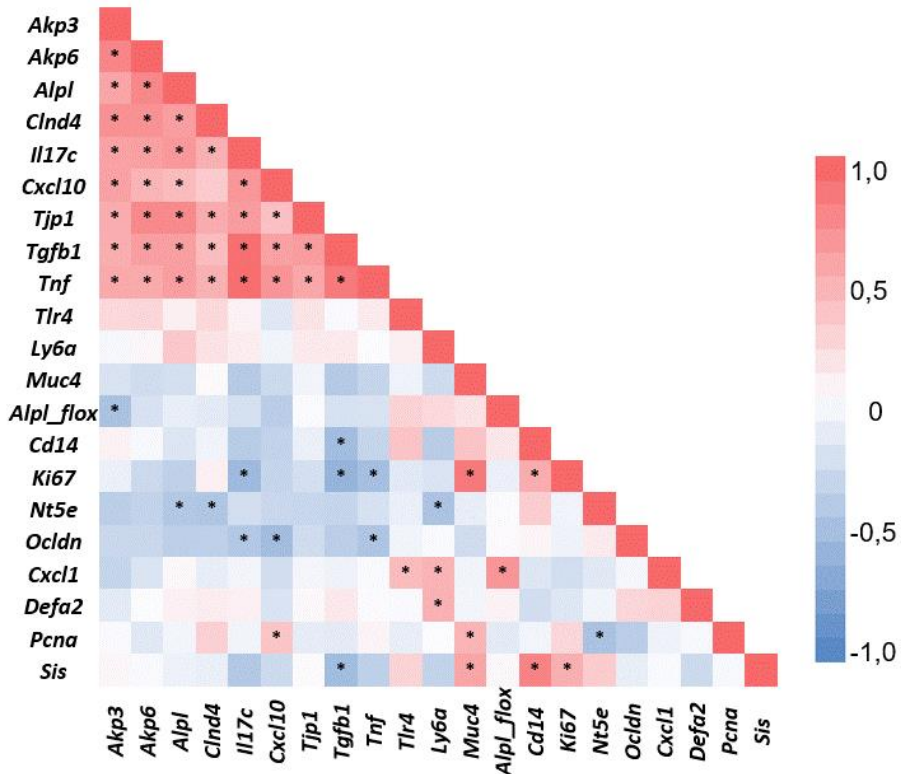
**Figura 80. Estudio de la expresión génica de *Tnf*, *Defa2*, *Muc4*, *Tgfb1*, *Il17c* y *Sis* en organoides de yeyuno.** Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM.

Es interesante, en este sentido, estudiar las correlaciones de expresión génica en los organoides yeyunales, dado que la delección tiene un impacto directo en este modelo *in vitro* (Figura 81). En este caso, las células epiteliales *knockout* continuaron demostrando una correlación elevada entre *Alpl*, *Tnf* e *Il17c*, aunque algo menos intensa que la



observada en colon. Aquí sin embargo no se mantiene la correlación entre *Alpl* y *Alpl\_flox*, de forma que los niveles de este último se reducen considerablemente, reflejando el efecto de la recombinasa Cre y la inactivación de la expresión de TNAP, mientras que los niveles de *Alpl* se mantienen, incluso con cierta tendencia a aumentar. Estos últimos niveles están fuertemente correlacionados con los de *Akp3* y *Akp6*, que a su vez están incrementados en los organoides delecionados. Esto sugiere que los genes correspondientes a las fosfatasa alcalinas se inducen globalmente en ausencia de la actividad de TNAP en los organoides yeyunales. Estos 3 genes están asimismo correlacionados positivamente con *Cxcl10*, *Tjp1*, *Cldn4*, *Tgfb1* y, como se ha indicado, *Il17c* y *Tnf*. De ellos, *Cxcl10* está inducido en organoides KO, mientras que *Cldn4*, *Tnf*, *Tgfb1* e *Il17c* presentan una tendencia acusada, pero no significativa, en el mismo sentido. La única correlación directa con la expresión de *Alpl\_flox* fue la de la quimioquina *Cxcl1*, que apenas se expresó en los organoides yeyunales de los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>*.

## RESULTADOS



**Figura 81. Matriz de correlación de la expresión génica en organoides yeyunales de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ .** Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran subrayadas y en negrita.

## **5. DISCUSIÓN**



La TNAP ha sido estudiada en profundidad por su papel en la homeostasis ósea a través de la hidrólisis del inhibidor de la mineralización PPI (2), pero también se han observado patologías no relacionadas en pacientes con mutaciones en el gen *ALPL*. Dado que esta enzima tiene múltiples dianas y participa en numerosos procesos biológicos, como el metabolismo hepático (4), la termogénesis (5) o el mantenimiento de las células del sistema inmunológico (6,7), no se puede descartar la existencia de alteraciones extraesqueléticas en pacientes con mutaciones en el gen *ALPL*.

Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto el incremento de la expresión de *Alpl* en colon en modelos de inflamación intestinal. De hecho, se presenció el incremento de expresión de TNAP no solo a causa de la típica infiltración leucocitaria dada en esta enfermedad, sino por el incremento de expresión de TNAP en las propias células del epitelio intestinal (9,14,31). A raíz de estos resultados, el grupo de investigación se ha centrado en esclarecer el papel de TNAP en la inflamación y el sistema inmunológico. En este sentido, se estudió la función de la TNAP en linfocitos T, células en las cuales la TNAP es fundamental para su completa activación y proliferación (6). En este trabajo se recogieron datos que relacionan las modificaciones en la activación de células T con la regulación de la TNAP mediante cambios en la glicosilación de la enzima (6). Poco después, se estudió el papel fisiológico de la TNAP en un modelo de pancreatitis aguda, en el cual los neutrófilos son la primera línea de defensa. En este trabajo vimos que los ratones haplodeficientes para TNAP (*TNAP<sup>+/-</sup>*) exhiben una mayor sensibilidad a la pancreatitis aguda inducida por ceruleína a causa de una mayor respuesta inflamatoria de neutrófilos y células acinares (129).

## DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha querido explorar el papel de la TNAP en dos contextos fisiológicos. En primer lugar, en la esteatosis hepática, dada la implicación de esta enzima en diversos procesos metabólicos y su capacidad para desfosforilar múltiples moléculas proinflamatorias (14–17). Con este objetivo, se han utilizado ratones haplodeficientes (TNAP<sup>+/-</sup>), ya que los ratones *knockout* homocigotos no son viables y mueren poco después del nacimiento (88). En segundo lugar, se ha querido estudiar su función en las células del epitelio intestinal en estado basal y en inflamación mediante el modelo experimental de DSS. Con este fin, se han utilizado ratones con delección inducible del gen *Afp1* en el epitelio intestinal (Afp1<sup>IEC-/-</sup>).

El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es la enfermedad hepática más frecuente en países occidentales, con una prevalencia global de aproximadamente el 25% en la población adulta, especialmente en personas con obesidad y diabetes (20–22). Se define por la presencia de esteatosis, acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos (215). La mayoría de los pacientes presentan la enfermedad de forma asintomática, pero algunos individuos pueden presentar una forma más agresiva de esta enfermedad, la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), con inflamación, fibrosis y daño hepático., que puede progresar a cirrosis o cáncer hepático (216). El hígado graso no alcohólico está asociado a la aparición de resistencia a la insulina, desórdenes metabólicos, e incluso alteraciones en la función de barrera intestinal (217), con aumento de los niveles de antígenos bacterianos circulantes. La participación de la IAP en este contexto está bien descrita; estudios llevados a cabo en ratones *knockout* para *Akp6* y posteriormente suplementados con IAP oral muestran la implicación de la enzima en la absorción de lípidos (193). La isoenzima duodenal (*Akp3*) también ha sido relacionada con la absorción de lípidos (117). Puesto que la TNAP

y las isoenzimas intestinales comparten moléculas diana, **nuestro grupo de investigación ha querido determinar el papel de la TNAP en la esteatosis hepática experimental.**

Con este fin, se ha utilizado una dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Se trata de una dieta lipogénica rica en grasas (10%) y en sacarosa (40%) que carece de metionina y colina, esenciales para la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Esto perjudica la liberación hepática de VLDL desde hígado a sangre, lo que provocaría la característica acumulación de lípidos en el hígado. Además, debido a esta alimentación, los ratones sufren alteraciones en los niveles de diversas adipoquinas y citoquinas, que contribuirán al daño hepático. Tal y como se observa en este modelo animal, nuestros resultados también reflejan una pérdida de peso progresiva en los ratones cuando son alimentados con la dieta MCD (294). De hecho, se dio fin al experimento pasados 17 días debido a cuestiones éticas. Se observó también el esperado incremento de alanina aminotransferasa y descenso de los niveles de glucosa en ayunas en ambos genotipos, sin observar resistencia a insulina, coincidiendo con lo ya descrito en otros estudios (294,295).

Mediante estudios histológicos y cuantificación de grasa hepática se confirmó la esteatosis en los ratones alimentados con la dieta MCD, con un grado similar en ambos genotipos. Sin embargo, mientras que los ratones WT alimentados con la dieta control mostraban un fenotipo normal, los ratones haplodeficientes exhibían microesteatosis. Más concretamente, los ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control presentaban microdepósitos de grasa en el hígado. Debido a que la dieta control utilizada incluye un contenido en grasa superior a la normal (10%, p:p) y a que previamente no se habían observado anomalías hepáticas en ratones TNAP<sup>+/-</sup>, decidimos medir el contenido de grasa

## DISCUSIÓN

hepática en ratones alimentados con una dieta estándar (con un contenido en grasa del 4%, p:p). Los resultados obtenidos confirmaron que los ratones TNAP<sup>+/-</sup> no desarrollan esteatosis hepática en condiciones estándar, poniendo de manifiesto el papel de TNAP en la esteatosis mediada por una dieta alta en grasa.

Como se ha indicado, la esteatosis altera los niveles de adipocinas y citoquinas plasmáticas (296). Mediante la técnica de multiplex únicamente se constató la elevación de los niveles de GLP-1 plasmáticos en ratones WT MCD respecto a sus controles, presumiblemente por el corto período de seguimiento. En cambio, se detectaron mayores niveles de IL-6 (aunque no significativos), péptido pancreático, resistina y glucagón en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con dieta control respecto al grupo WT. Es decir, la haplodeficiencia de *A/p1* tuvo un impacto mayor a este nivel que la propia dieta MCD. Cabe destacar que los ratones TNAP<sup>+/-</sup>, tanto alimentados con la dieta control como con la dieta MCD, presentan un mayor nivel de resistina en el plasma. Hasta la fecha se ha sugerido la asociación de la resistina con varias condiciones patológicas, como la resistencia a la insulina (297) o la inflamación intestinal (298–300). Concretamente, se demostró la implicación de RELM  $\beta$ , una proteína homóloga a la resistina, en el desarrollo de NASH, planteándose incluso como diana terapéutica (301). El incremento de los niveles de IL-6 plasmático, junto con el incremento en el nivel de resistina, que en ratones es secretada principalmente por células del tejido adiposo, sugieren que la ausencia de la TNAP puede participar en el desarrollo del fenotipo de esteatosis.

El siguiente paso fue estudiar el posible daño hepático a causa de la esteatosis. Por ello, se midieron genes relacionados con fibrosis e inflamación. Los ratones TNAP<sup>+/-</sup> mostraron una mayor expresión aparente de *Des* y *Tgfb1* independientemente de la dieta (siendo



significativo únicamente en el caso de los ratones alimentados con la dieta control). Esta inducción aparente supone que existe una relación entre la enzima TNAP y el principio del desarrollo de una posible fibrosis. Seguidamente, se evaluó otro aspecto del daño hepático, la inflamación. Los ratones haplodeficientes presentaron mayores niveles de *Il1b* y una tendencia al alza de *Tnf* (aunque no significativa), lo que sugeriría la existencia de un daño leve en el hígado de los ratones TNAP<sup>+/-</sup>. Tampoco se vieron alteraciones en otros genes relacionados con inflamación o fibrosis, como *Spp1*, *Panx1* o *Gpx1*. La actividad fosfatasa alcalina reveló un incremento marcado en ratones alimentados con la dieta MCD, sin diferencias entre genotipos. Sorprendentemente, en ratones WT la dieta MCD produjo un cambio en el patrón de glicosilación de TNAP hepática a TNAP tipo ósea-renal, fenómeno que no se dio en ratones TNAP<sup>+/-</sup>. Cabe señalar que la falta de un alelo en los ratones haplodeficientes no supuso la pérdida en la actividad fosfatasa alcalina en el hígado de estos ratones. Este fenómeno, ya visto anteriormente (6), puede deberse al uso de p-nitrofenilfosfato como sustrato en la medida de la actividad AP, ya que es posible que esta actividad varíe con otros sustratos a causa de cambios en la glicosilación de la enzima.

Un aspecto destacable es la modulación de los genes relacionados con el metabolismo hepático. La dieta MCD produjo una bajada drástica en la expresión de *Pck1*, que codifica la PEPCK citoplasmática, enzima clave en la gluconeogénesis. Esta bajada se dio también en ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control. Esto concuerda con la inhibición del ciclo del ácido cítrico y la acumulación de ácidos grasos tanto en ratones alimentados con dieta MCD como en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> que recibieron la dieta control (302). Se dio también un mayor incremento de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (*Pdk4*) en estos últimos, lo que concuerda con una inhibición de la

## DISCUSIÓN

gluconeogénesis y con observaciones realizadas en pacientes humanos con NASH, así como en estudios realizados en ratones alimentados con dieta MCD (290). A diferencia otros estudios que muestran una expresión reducida de genes implicados en la síntesis e insaturación de ácidos grasos en ratones alimentados con dieta MCD (303), nuestros resultados no muestran alteraciones en los genes *Acaca*, *Fasn*, *Srebf1*, *Scd1*, *Fads1* o *Fads2* ni a causa del genotipo ni de la dieta administrada. Sin embargo, observamos una gran reducción en la expresión del gen *Tff3* en ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control, y en ambos genotipos en los ratones alimentados con la dieta MCD. Estudios recientes han demostrado que la deficiencia de este gen altera el metabolismo lipídico en el hígado y provoca la formación de pequeñas vesículas lipídicas en este tejido, tal y como mostraron los ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con dieta control y los ratones alimentados con dieta MCD (291).

La  $\beta$ -oxidación es uno de los procesos metabólicos que más alterado se ve en el modelo de la dieta MCD. La expresión de *Acsm2*, que codifica la acil-coenzima A sintetasa, se vio fuertemente inhibida en ratones alimentados con la dieta MCD y en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> control. Por otro lado, se observó un incremento en el gen *Acot5* solamente en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> alimentados con la dieta control. Todo esto concuerda con una menor síntesis de acil-CoA en ratones alimentados con la dieta MCD y los ratones TNAP<sup>+/-</sup>, lo que da como resultado la acumulación de lípidos.

La esteatosis se asocia con la inducción de la síntesis de ácidos biliares. La síntesis de ácidos biliares y los niveles séricos de estos se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad en NAFLD (304). Aunque está poco caracterizada, la TNAP hepática participa en la secreción de la bilis gracias a que se la enzima se presenta en

hepatocitos y colangiocitos en la interfase con los conductos y canalículos biliares (47), además de que se observa la inducción de la TNAP en la colestasis. Se dio un incremento en la expresión de *Star* (gen limitante en la síntesis de los ácidos biliares) en los ratones alimentados con la dieta MCD, siendo solamente significativo en el caso de los ratones WT. Sin embargo, se observa una drástica inhibición de la expresión de *Cyp7b1* en ratones TNAP<sup>+/-</sup> control y en ambos grupos alimentados con la dieta MCD, inhibición que se observa en la esteatosis (305) y que como consecuencia da lugar a la acumulación de intermediarios de oxisterol, que tienen importantes efectos inflamatorios y reguladores. Más concretamente, se ha constatado un aumento notable en los marcadores de daño hepático en ausencia congénita de CYP7B1, relacionado con la posterior aparición de cirrosis, resultado de la acumulación de oxiesteroles (306,307) y la consiguiente citotoxicidad (308). El patrón de expresión de hidroxidelta-5-esteroide deshidrogenasa (*Hsd3b5*), gen involucrado en el metabolismo de los esteroides, fue el mismo. Por lo tanto, se observa la misma tendencia a la acumulación de intermediarios de ácidos biliares en ratones TNAP<sup>+/-</sup> control y en ratones MCD. Curiosamente, se indujo la expresión de las sulfotransferasas *Sult2a1* y *Sult3a1* en ratones haplodeficientes en TNAP independientemente de la dieta. La sulfatación es un mecanismo esencial en el proceso de detoxificación y posterior eliminación de los ácidos biliares, que, al incrementar significativamente la solubilidad de estas moléculas, implica una disminución sustancial de su absorción intestinal, promoviendo en consecuencia su excreción a través de la vía urinaria (309). Estos datos indican una mayor eliminación de ácidos biliares en los ratones TNAP<sup>+/-</sup> independientemente de la dieta.

Otro aspecto a valorar es la activación de la proteína AMPK, que ha cobrado relevancia en la enfermedad NAFLD por su capacidad de

## DISCUSIÓN

modular el metabolismo lipídico y glucídico, concretamente estimulando la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos e inhibiendo la lipogénesis en el hígado (310,311). Por lo tanto, se ha relacionado la activación de AMPK con la mejora de la fibrosis e inflamación. Nuestros resultados muestran un ligero descenso en el nivel de p-AMPK/AMPK en ratones haplodeficientes independientemente de la dieta administrada, lo que concuerda con el fenotipo fibrótico (*Des* y *Tgfb1*) observado en estos ratones. Sin embargo, la menor activación de AMPK no provoca alteraciones en la síntesis de ácidos grasos. Se midieron también los niveles de activación de AKT y los niveles de PPAR $\alpha$ , ambos asociados con el desarrollo de la esteatosis, aunque no se dieron diferencias entre los cuatro grupos experimentales. Sería necesario un estudio de los niveles de estas proteínas en ratones alimentados con una dieta estándar (4% de grasa p/p) para poder ver la diferencia entre una dieta estándar y la dieta control utilizada (contenido en grasa 10%, p/p).

Tanto la pérdida de la integridad de la barrera intestinal como la disbiosis contribuyen a la NAFLD. Para ver la asociación entre la TNAP y la esteatosis, se realizaron determinaciones en el epitelio intestinal. En general, no se detectó inflamación en el colon (*S1008*), ni se dieron cambios en la expresión de *Alpl* en este tejido. Al igual que en el hígado, se registraron cambios de isoforma en el colon de ratones WT alimentados con dieta MCD respecto a sus controles, pasando de la isoforma hepática a la ósea-renal. La medida mediante qPCR de uniones estrechas reveló una menor expresión de claudina-4 en ratones alimentados con la dieta MCD, siendo significativo para los ratones haplodeficientes para TNAP. En general, no se observa una gran alteración de la barrera intestinal, tal vez por la corta duración del experimento.

Recopilando los resultados obtenidos, los ratones TNAP<sup>+/-</sup> desarrollaron esteatosis y mostraron alteraciones metabólicas comparables a los ratones alimentados con dieta MCD. Este fenómeno puede deberse a la implicación de la TNAP en la absorción de la colina, ya que la desfosforilación de la fosfocolina es necesaria para su asimilación. En consecuencia, es posible que los niveles de colina sean menores en los ratones haplodeficientes, de tal forma que se reduzca la producción y liberación de VLDL, formándose esos microdepósitos de grasa en el hígado. Otra explicación puede ser que se deba a una deficiencia del transporte de lípidos transcelulares, como sucede en los ratones *knockout* para IAP en el intestino (117). Sin embargo, se necesitarán estudios futuros para determinar la acción de TNAP en este contexto.

Nuestro segundo objetivo fue **estudiar el papel de la TNAP en el epitelio intestinal gracias al modelo inducible *knockout* para *Alpl* en enterocitos** ( $Alpl^{IEC-/-}$ ). La delección no afecta a la totalidad del gen, por lo que al utilizar los cebadores convencionales para *Alpl* sigue obteniéndose una señal, debido a que estos amplifican un fragmento que corresponde al exón 2 del gen, una sección que está aguas arriba de la sección flox/flox. Por ello, se utilizan unos cebadores específicos para la sección delecionada (cebadores *Alpl\_flox*), con lo que confirmamos la delección del gen en el epitelio del intestino delgado y el colon. Los ratones mostraron un fenotipo aparentemente normal, y no se registraron cambios en la actividad AP en ningún fragmento intestinal. Sin embargo, la ausencia de *Alpl* intestinal provocó un cambio de isoforma de TNAP hepática a ósea-renal en el colon de los ratones. Evaluando los posibles efectos extraintestinales en los ratones *knockout*, estos mostraron una mayor actividad AP en hueso y riñón, dos de los tejidos de mayor expresión de la enzima TNAP. Es posible que este efecto se deba a una compensación por parte de estos tejidos. En cuanto a las isoenzimas de AP en el intestino, se observaron

## DISCUSIÓN

cambios en los enterocitos procedentes de intestino delgado y colon, aunque no en el tejido total. En concreto, se constató una disminución de la expresión de las isoenzimas intestinales *Akp3* y *Akp6* (esta última sin llegar a la significación estadística) en las células epiteliales intestinales del intestino delgado. En contraste, en el colon se produjo la tendencia opuesta.

En consonancia con el fenotipo aparentemente normal, no se detectaron cambios en la expresión de citoquinas, quimioquinas, péptidos antimicrobianos o genes de uniones estrechas. En un intento de identificar sutiles consecuencias funcionales de los cambios observados en las APs, se realizó un estudio de correlación. En el mismo se identificaron varios clústeres con correlación positiva, por un lado, el formado por *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3*, *Il17c* y *Tnf*, y por otro, el compuesto por *Il6*, *Cxcl1* e *Ifnγ*. Ha de tenerse en cuenta que, como se ha indicado, los ratones KO no presentaron un descenso de *Il17c* o *Akp3* en el colon. La IL17c es una citoquina perteneciente al grupo de la IL17A e IL17F que es producida fundamentalmente por el epitelio intestinal, donde actúa como un factor regulador autocrino, promoviendo la secreción de péptidos antibacterianos y respuestas que pueden tener un efecto proinflamatorio o antiinflamatorio, dependiendo del contexto (312). *Akp3* codifica, como se ha indicado, la AP duodenal, mientras que el *Tnf* tiene una expresión residual en células epiteliales y su función no se conoce en detalle. Estos datos sugieren que existe una correulación o mecanismos comunes de regulación. Hay que tener en cuenta que en este tejido *Alpl* y *Alpl\_flox* se correlacionan entre sí, es decir, la delección inducida tiende a disminuir los niveles de mRNA del gen, pero no necesariamente en el mismo tipo celular. Aunque los niveles de *Alpl* no se modificaron significativamente en el KO, es posible que la expresión de *Alpl* esté reducida en células no epiteliales en estos ratones. De hecho, los niveles de mRNA de *Alpl* y *Alpl\_flox* no

guardaron relación en células epiteliales primarias colónicas. En este tipo celular se mostraron correlaciones robustas entre *Alpl* y *Akp3*, y *Alpl\_flox* y *Tjp1*. En IEC primarias de intestino delgado se puso de manifiesto una correlación positiva y consistente entre *Alpl*, *Alpl\_flox*, *Akp3*, *Akp6* y *Tjp1*, la cual está reforzada debido a la disminución de estos genes en las IEC de los ratones *knockout*.

A nivel hepático, la mayor expresión de *Tgfb1*, *Des* (ns) y *Tnf* sugiere un posible inicio de fibrosis e inflamación hepática en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ . Sin embargo, estos ratones no muestran incremento en genes relacionados con las vías de activación de LPS (incluyendo *Alpl*), ni cambios significativos en los genes asociados a las vías metabólicas. Es interesante constatar que los niveles hepáticos de mRNA de *Tgfb1* y *Des* estaban correlacionados entre sí, y con *Cd14* y, en un segundo plano, con *Star*, *Il1b* y *Lbp*, aunque no con *Tnf*. Por tanto, los cambios de expresión génica observados en el hígado de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  son consistentes con una respuesta inflamatoria/fibrótica incipiente. Este perfil estaba correlacionado con la *Alpl* hepática, pero solo débilmente. Si se consideran únicamente los ratones WT, la correlación se refuerza. A su vez, los niveles de *Alpl* se correlacionan en los ratones con y sin delección epitelial con los niveles de *Scd1*, *Fasn* y *Fads2*.

Los ratones *knockout* exhibieron un incremento notable en la expresión de la ectonucleotidasa *Nt5e*, que es una enzima reguladora clave en la vía de señalización de las purinas, vía en la que también participa la enzima TNAP (313). Efectivamente, se ha documentado que la enzima codificada por *Nt5e*, también conocida como CD73, cataliza la hidrólisis de AMP a adenosina, una molécula con conocidos efectos fibrogénicos en el entorno extracelular. La inhibición de esta enzima se plantea como una posible estrategia para la prevención de la fibrosis hepática (314). Esto podría indicar que la fibrosis observada en los ratones podría estar

## DISCUSIÓN

favorecida por el incremento en los niveles de adenosina a causa de una mayor expresión de *Nt5e* en el tejido hepático en los ratones *knockout*.

Los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  revelaron niveles menores de fosfocolina (sin alcanzar la significancia estadística) y colina en hígado. Como se ha indicado previamente, la defosforilación de la fosfocolina representa un proceso crítico y esencial para su absorción por parte de los enterocitos y su posterior transporte al hígado a través del sistema circulatorio. Como se ha comentado, el déficit de colina puede limitar la biosíntesis de VLDL y contribuir al desarrollo de esteatosis (315). Por tanto, nuestros datos sugieren que la TNAP epitelial intestinal tiene un papel destacado a este nivel. Su ausencia implica un menor aporte de colina al hígado, promoviendo un fenotipo proinflamatorio y profibrótico. Del mismo modo, la dificultad de la absorción de la colina podría ser una de las causas de la microesteatosis observada en los ratones  $TNAP^{+/-}$  alimentados con la dieta control. Actualmente estamos realizando un experimento a largo plazo con el objetivo de caracterizar el impacto de la delección epitelial de *Alpl* en el hígado.

La microbiota intestinal es determinante para una mantener una correcta función de la barrera intestinal. Algunos estudios han demostrado previamente una menor población y menor diversidad en la microbiota intestinal en ratones *IAP-knockout*, efecto que se vio revertido con la suplementación oral con IAP en ratones WT expuestos a antibióticos (125). Nuestros resultados en ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  pusieron de manifiesto un menor número de bacterias del género *Lactobacillus*, efecto observado también en ratones *knockout* para IAP (125). Además, se observó un incremento en el número de bacterias del género *Biophila*. Por tanto, la *Alpl* intestinal modifica estas poblaciones



microbianas, lo que puede ser relevante en el fenotipo resultante, si bien las modificaciones son modestas.

Vista la importancia de la TNAP de las IECs tanto en el tejido intestinal como en tejido extraintestinal, nuestro siguiente objetivo fue **determinar el papel de la TNAP en el epitelio intestinal en inflamación mediante el modelo de colitis experimental inducida por DSS utilizando el modelo inducible *knockout* para *Alpl* en enterocitos ( $Alpl^{IEC-/-}$ )**. Entre varios modelos de colitis experimental, el inducido por DSS es uno de los más utilizados debido a su simplicidad y muchas similitudes con la colitis ulcerosa humana (272). El DSS provoca un daño en la monocapa del epitelio intestinal, que cursa con una menor expresión de las proteínas de unión estrecha (270), lo que conduce a la entrada de bacterias luminales y antígenos asociados en la mucosa hasta las capas subyacentes, entre ellas la lámina propia. Allí las células del sistema inmunitario tratarán de contener las bacterias en la luz intestinal a la vez que provocarán el reclutamiento de granulocitos (principalmente neutrófilos) e iniciarán una respuesta inmunitaria adaptativa, que será conducida por células T CD4+ polarizadas mayoritariamente a subtipos Th1 y Th17 (316). La administración de DSS provocó diferencias fenotípicas en cuanto a la pérdida de peso a partir del día 4. Esta pérdida fue progresiva para ambos genotipos hasta el fin del experimento, siendo mayor en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  en comparación con los WT. A su vez, el índice de actividad de la enfermedad (DAI) fue mayor en las etapas iniciales en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  con DSS, achacable a una mayor pérdida de peso inicial y a la presencia temprana de sangre en heces en estos ratones. A nivel histológico, el aspecto del colon reveló una invasión de leucocitos en la submucosa en ambos genotipos, más acentuada en los ratones con la delección del gen *Alpl*. Los estudios de inmunohistoquímica corroboraron un aumento en el recuento de células MRP8+ en los ratones con la

## DISCUSIÓN

delección del gen, aunque no alcanzaron significancia estadística. A la vista de estos resultados, a nivel general, los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  mostraron una mayor susceptibilidad al DSS.

Sorprendentemente, el estudio bioquímico a nivel colónico nos reveló que estos ratones presentaban un menor grado de inflamación. Por ejemplo, la ausencia de *Alpl* en enterocitos provocó una menor expresión de *S100a8* y *S100a9*, que codifican S100A8/A9 (calprotectina), utilizada como biomarcador en pacientes con EII (317). Asimismo, los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  colíticos exhibieron una menor expresión de *Tnf* e *Il6* en el colon, dos genes clave relacionados con la inflamación y disfunción de barrera intestinal y que están sobre-expresados en pacientes con EII (318–320). Los niveles de quimioquinas (*Cxcl1*, *Cxcl2* y *Ccl2*) de los ratones colíticos seguían el mismo patrón que las citoquinas, apoyando un menor estado inflamatorio a nivel colónico en los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ . Estas moléculas participan en la activación y reclutamiento de células del sistema inmunitario y tienen un papel importante en la EII. Se han descrito niveles elevados de CXCL1 (que atrae a los neutrófilos) en pacientes con EII, y se ha correlacionado con el grado de la enfermedad (321). Por su parte, las quimioquinas CC, como CCL2, reclutan a monocitos, macrófagos, células T y células dendríticas. Se ha relacionado su expresión con la severidad de la colitis, y los ratones deficientes en CCL2 muestran una reducción significativa en la gravedad de la colitis experimental (322). Al igual que los parámetros anteriores, se dio la misma tendencia en la expresión de *Il17c*, con una mayor expresión en los ratones WT con DSS en comparación con los *knockout*. La IL-17C es producida por las células epiteliales después de la exposición a estímulos inflamatorios, para promover respuestas inflamatorias de tipo Th17. Evaluando la barrera intestinal, la administración del DSS provocó la bajada en la expresión de *Tjp1* en ratones WT, indicando un debilitamiento en las uniones

estrechas, fenómeno que no se aprecia en ratones *knockout*. Curiosamente, se han detectado niveles más elevados de *Lyz1* en ausencia de *Alpl* independientemente del tratamiento. Estudios realizados recientemente han demostrado que la abundancia de la lisozima del lumen controla la composición de la microbiota, regulando las respuestas inflamatorias de la mucosa tanto en estado basal como en colitis (323).

Por tanto, hasta este punto, el fenotipo mixto que presentan los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ , con menor grado de inflamación, pero mayor susceptibilidad al DSS, confirma la relevancia de la TNAP en la inflamación intestinal. Una posibilidad es que estado de activación de las células infiltradas esté atenuado en el colon de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$ . Por ello, llevamos a cabo un experimento de colitis experimental inducida por DSS en ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  con el objetivo de extraer las células de la lámina propia, y así poder identificar mediante citometría de flujo las subpoblaciones celulares presentes en este ambiente de inflamación. Por el momento estamos realizando un análisis exhaustivo de estos subtipos celulares, por lo que por el momento no tenemos resultados definitivos para esclarecer este aspecto del fenotipo.

Teniendo en cuenta los resultados previos, es importante evaluar la expresión de las isoenzimas AP. Se observaron niveles considerables de *Alpl* en colon, atribuibles en buena medida a la llegada de células del sistema inmunitario y otros tipos celulares presentes en el intestino inflamado. La administración de DSS provocó asimismo un aumento importante en la expresión de *Akp3*, que no llegó a producirse en el caso de los ratones *knockout*. Por el contrario, la expresión de *Akp6* experimentó un aumento significativo en el colon de los ratones  $Alpl^{IEC-/-}$  en respuesta al DSS, pero no en los ratones WT. Este incremento en la señal de *Akp6* podría ser el responsable del aumento en la actividad

## DISCUSIÓN

AP colónico y de los efectos protectores a nivel intestinal, posiblemente como un mecanismo de compensación debido a la ausencia de *Alpl* en las células del epitelio intestinal. El hecho de que no se reduzca la sensibilidad a la inhibición in vitro de la actividad AP colónica con levamisol/TNAPinh no está en consonancia con un papel relevante de *Akp6*, ya que la IAP es más resistente a la inhibición. Aunque el perfil de sensibilidad a inhibidores de la AP de neutrófilos y otros leucocitos que infiltran la mucosa inflamada puede condicionar este resultado, con base en estos resultados es improbable (aunque no imposible) que la IAP esté implicada en el efecto protector de la delección epitelial de *Alpl*.

Con el fin de determinar el desarrollo temporal de la inflamación en este genotipo, se decidió realizar un segundo protocolo experimental en el que los animales se sacrificaron a día 4 y día 7 de la colitis experimental inducida por DSS al 2,5 % (p:v). El día 4 corresponde aproximadamente al inicio de la respuesta inflamatoria en este modelo. Efectivamente, a nivel histológico los ratones no muestran pérdida de estructura ni una infiltración patente en esta fase, mientras que sí se observó una masiva infiltración leucocitaria a día 7, sin diferencia entre genotipos en este caso. Se detectó de nuevo una mayor pérdida de peso y un incremento del DAI en el día 4 de experimento en los ratones *knockout*, pero no en la cohorte de 7 d, debido presumiblemente a la variabilidad experimental. No obstante, en un nuevo experimento realizado recientemente para la obtención de células de la lámina propia, los ratones *knockout* con colitis experimental por DSS muestran nuevamente una mayor pérdida de peso que los WT, lo que confirma esta tendencia.

Del mismo modo, muchos de los parámetros de inflamación no estaban modificados respecto a los controles sanos a día 4, pero sí a día 7. En la fase temprana se constató el mismo efecto de la ausencia de *Alpl* en

enterocitos, es decir, una expresión reducida de marcadores inflamatorios (de los elevados tempranamente): *S100a8*, *Il6* ( $p=0,07$ ), *Tnf* ( $p=0,06$ ), *Cxcl1* (sin llegar a la significancia estadística), *Cxcl2* ( $p=0,051$ ) y *Ccl2*. A nivel función de barrera intestinal, la medida del FITC dextrano nos permitió evaluar la permeabilidad intestinal *in vivo*. Como era de esperar, la administración de DSS aumentó la permeabilidad intestinal, pero no encontramos diferencias entre genotipos. Evaluamos también marcadores de función de barrera intestinal, como *Tjp1*, *Lyz1*, *Il17c* y *Tff3*. En esta ocasión el DSS no alteró la expresión génica de *Tjp1*. Sin embargo, sí se observó el mismo incremento observando anteriormente del gen *Lyz1* y el descenso de la expresión de *Il17c* en los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* colíticos. Finalmente, y a diferencia del primer experimento realizado, los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* muestran un mayor nivel en la expresión de *Tff3* colónico, que se ha visto relacionado con la protección y reparación del epitelio (324).

Por consiguiente, los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* presentan una protección frente a la colitis experimental por DSS que se manifiesta desde las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria. De hecho, en un experimento preliminar de colitis inducida por TNBS en ratones WT y *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* se observó asimismo una menor inducción de marcadores inflamatorios colónicos en los ratones *knockout* (*S100a8*, *Cxcl1*, *Il6*, *Tnf*, datos no mostrados).

¿Qué ocurre entonces con las isoformas AP en los diferentes tiempos en la colitis? Los niveles de mRNA de *Alpl* se incrementaron ligeramente a 4 días y permanecieron elevados en el día 7 en los ratones WT, en tanto que se produjo un incremento considerable en la expresión de *Alpl* a los 7 días en el genotipo *knockout*. Las isoenzimas intestinales (*Akp3* y *Akp6*) no experimentaron variaciones significativas asociadas a la colitis, y solo se apreció una cierta tendencia al

## DISCUSIÓN

incremento en el caso de *Akp3*. Los datos correspondientes a *Akp6* son un tanto equívocos, ya que a los 4 días de los ratones presentan valores elevados, pero el resto son equiparables a los del grupo WT, así como a los ratones KO control y con DSS a 7 días. Por tanto, a la vista de estos resultados, no parece ser que *Akp6* sea el mecanismo fundamental por el que se produce la protección en los ratones *knockout*. Es interesante constatar que uno de los parámetros modificados ya a día 4 fue la actividad AP en el colon, que se acompañó con el incremento de sensibilidad. Se trata de la respuesta estudiada y caracterizada por nuestro grupo de investigación (6,9,31), pero mientras que en los animales WT el incremento es menor que a 7 días, y por tanto constituye una respuesta intermedia, en los animales *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* la actividad y sensibilidad a la inhibición corresponden ya a los valores medidos a 7 días. En principio cabría interpretar este incremento como indicativo de una mayor respuesta inflamatoria, pero, realmente, desconocemos si puede estar implicado en el efecto protector. Centrándonos exclusivamente en la sensibilidad a inhibidores, encontramos diferencias en estado basal, tal y como se ha comentado anteriormente, que podría indicar un cambio de isoforma de TNAP hepática (resistente a la inhibición) a TNAP ósea-renal (sensible a la inhibición). En cambio, a 4 días la inhibición tiende a aumentar, aunque no con carácter significativo, sobre todo en los ratones *knockout*. Es conveniente recordar que el levamisol inhibe la isoforma TNAP ósea-renal, mientras que la TNAP hepática y la IAP son resistentes al inhibidor. Por ello, nuevamente los datos disponibles no apuntan a una inducción de la expresión de *Akp6* como mecanismo protector en los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>*. Dado que no hay cambios en los niveles colónicos de mRNA de *Alpl* en estos ratones, las alteraciones enzimáticas observadas son probablemente de naturaleza postranscripcional, y en células no epiteliales.

Con objeto de dilucidar la relación entre la *Alpl* epitelial y el fenotipo observado en la colitis realizamos un análisis de correlación. En el colon de los ratones WT con colitis se aprecia una correlación positiva de gran robustez entre la expresión de los genes *Alpl*, *Alpl\_flox*, *S100a8*, *Il17c* y *Tnf*, así como entre *Alpl*, *Il6*, *Cxcl1*, *Ccl2*, *Villina* y *Reg3g*. Es relevante destacar que el gen *Alpl* se encuentra presente en ambos clústeres. Asimismo, existe una correlación positiva entre *Alpl*, *Cxcl1*, *Il6*, la actividad AP colónica, la presencia de FITC dextrano en plasma, así como con la esplenomegalia. Por tanto, durante la fase inicial de la respuesta inflamatoria se detecta la inducción de *Alpl*, ya constatada en múltiples ocasiones en otros experimentos por nuestro grupo, así como por otros investigadores (9,31). Esta inducción de *Alpl* se asocia a los marcadores de inflamación y a la alteración del estado fisiológico. En cambio, a día 7, se pierden muchas de las correlaciones existentes entre los genes inflamatorios en los ratones WT. Por ejemplo, la correlación entre *Alpl* y *Alpl\_flox* con *S100a8*, y se observa una correlación positiva, aunque no significativa estadísticamente, con *Akp3*, que se corresponde a la ligera inducción de este gen a 7 días en los ratones WT. Es notable que se observe nuevamente la interrelación entre *Tnf*, *Il17c*, *Alpl* y *Alpl\_flox* que, a su vez, se correlacionan positivamente con el peso del colon. Subsiste una intensa correlación positiva entre los genes de inducción tardía (*Cxcl1*, *Ccl2*, *Il6* y *S100a9*).

Como se ha indicado, los ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup> exhibieron una expresión atenuada de marcadores inflamatorios de inducción temprana a 4 días, es decir, *S100a8*, *Tnf* e *Il17c*. *S100a8* e *Il17c* presentan correlación positiva con *Alpl\_flox*, así como con *Akp3*. Resulta de particular interés investigar las correlaciones de la expresión de *Alpl* en los ratones *knockout* a 7 días, ya que se observa una inducción de este gen en estos ratones a los 7 días, que en principio es de origen extraepitelial. En este contexto, existe una correlación positiva de *Alpl* con los genes

## DISCUSIÓN

*Cxcl1*, *Ccl2*, *Il6* y *S100a9*, lo cual concuerda con su origen extraepitelial. Es interesante apuntar que no existe correlación entre las isoenzimas *Akp3* y *Akp6* en la expresión de los ratones *knockout*. Ni, como se ha comentado, con la propia actividad AP en el colon.

Resulta de gran interés la persistente asociación observada entre *Alpl*, *Il17c* y *Tnf* a lo largo de la investigación. La citoquina IL-17C es producida por células epiteliales intestinales en respuesta a estímulos inflamatorios. Los receptores de esta citoquina se expresan tanto en células epiteliales, lo que sugiere una función autocrina (325), como en células Th17 (326), de forma que favorece la comunicación entre el epitelio y este subtipo de células T comúnmente presentes en la lámina propia. En un entorno de inflamación, estas células producen diversas citoquinas, entre las cuales destaca el TNF. Estudios recientes han demostrado que TNF desempeña un papel dominante como estímulo principal en la transcripción de IL-17C (327), lo que establece una correlación coherente en este contexto.

Teniendo en cuenta el impacto de la haplodeficiencia y de la delección epitelial de *Alpl* en el hígado, es relevante caracterizar el fenotipo a este nivel en la colitis experimental. Un efecto que se aprecia en ambos experimentos es el aumento de *Tff3* en el hígado de ratones *knockout*, el cual se acentúa en un entorno inflamatorio. Asimismo, se pueden apreciar modificaciones en la expresión de *Des*, lo cual refleja que la TNAP intestinal influye en cierta medida en el tejido hepático, también en estado de inflamación colónica. No obstante, el fenotipo hepático resulta ser más complejo cuando se examinan otros parámetros. En el primer experimento, observamos mayor expresión de genes relacionados con la señalización de LPS en hígado (*Lbp* y *Cd14*) en los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* colíticos a 7 días. En el segundo experimento se observa una inducción de estos genes desde el día 4, pero sin



apreciarse diferencias significativas entre genotipos. Dicha inducción se mantiene hasta los 7 días. En las etapas iniciales de la colitis existe una correlación negativa entre la expresión de villina colónica y los genes hepáticos *Nt5e*, *Alpl* y *Des* en los ratones WT, lo que sugiere una relación causa – efecto: en esta fase temprana de la colitis la expresión de villina tiende a reducirse, en consonancia con las lesiones epiteliales incipientes, por lo que estos genes hepáticos parecerían inducirse en respuesta a un aumento de permeabilidad, que efectivamente se produce ya en esta fase, como refleja el incremento de FITC-dextrano 4 kD plasmático. Por el contrario, los animales *knockout* muestran una tendencia a la inversa de *Vill-Des*, y una fuerte correlación positiva entre *Vill* y *Lbp*. Este último dato sugiere que el descenso de villina reduce la *Lbp* hepática en ratones KO. Esto podría deberse paradójicamente al aumento de la actividad AP en el colon de estos ratones, que presumiblemente reduciría la translocación de LPS a circulación portal.

La actividad AP plasmática está asociada a los 4 días con la expresión de *Alpl* en el hígado en los animales WT, mientras que en los ratones *Alpl<sup>IEC-/-</sup>* se observa una correlación más robusta con *Akp3*, además de con la expresión de *Alpl* hepática. A los 7 días, la actividad plasmática correlaciona positivamente con *Akp6* en ambos genotipos, aunque en los *knockout* la correlación con la expresión de *Alpl* en hígado sigue permaneciendo. Aunque estos datos podrían sugerir diferencias en el origen de la enzima plasmática, es preciso recordar que la sensibilidad a los inhibidores apenas se modificó, lo que en principio está en contra de tal posibilidad. Sin embargo, la sensibilidad de la isoforma hepática y de ambas isoformas intestinales presenta una sensibilidad similar a la inhibición por levamisol o el TNAP inh.

Al objeto de **poder verificar el papel de la TNAP intestinal en el epitelio** en ausencia de otras células, se han utilizado **cultivos**

## DISCUSIÓN

**primarios de yeyuno** de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ . Actualmente los organoides intestinales son el modelo ideal para estudiar los cambios a nivel epitelial en ausencia del contexto fisiológico. A partir de las criptas yeyunales de ratones, donde se encuentran las células madre del epitelio, se generan cultivos tridimensionales polarizados que contienen el lumen en la zona interior. En esta tesis doctoral hemos trabajado fundamentalmente con organoides yeyunales de ratón. Hasta el momento tenemos resultados preliminares en organoides de colon (no mostrados). Asimismo, recientemente hemos recibido organoides humanos, con los que se pretende trabajar para estudiar más en profundidad el papel de la TNAP.

Los organoides yeyunales *knockout* presentan un descenso muy acusado de *Alpl\_flox*, tal y como se ha dado en los modelos *in vivo*. El silenciamiento de *Alpl* produjo cambios en el fenotipo de los organoides. Por un lado, constatamos un claro incremento de las isoenzimas intestinales (*Akp3* y *Akp6*), a diferencia de lo que sucede *in vivo*. Lamentablemente, no disponemos de resultados de actividad AP de estos organoides por limitación de la muestra, pero este fenómeno puede deberse a una respuesta compensatoria por parte de las isoenzimas a nivel epitelio intestinal. Las diferencias en la respuesta a la delección de *Alpl* en enterocitos aislados e *in vivo* pueden deberse a la interacción con distintos tipos celulares, microbiota o diferentes metabolitos del medio. Además, cabe inferir que *in vivo* otros tipos celulares pueden compensar la falta de la TNAP.

De las citoquinas analizadas en los organoides yeyunales no hubo grandes diferencias de forma general, exceptuando dos citoquinas con cambios muy marcados (*Cxcl1* y *Cxcl10*). CXCL1 es la principal quimioquina que atrae a los neutrófilos, que forman la primera línea de defensa contra infecciones, siendo por ello importante en la etapa

aguda de la inflamación intestinal (328). A nivel basal encontramos una fuerte inhibición en su expresión en los organoides yeyunales obtenidos de ratones *Alpl*<sup>IEC-/-</sup>. Por el contrario, a nivel basal encontramos una inducción en la expresión de *Cxcl10* en organoides yeyunales obtenidos a partir de ratones *knockout*. Esta quimioquina atrae a preferentemente a las células T activadas, particularmente a las Th1 (329) y se le ha atribuido un papel importante en el proceso inflamatorio de la EII. Por otro lado, la deficiencia en *Alpl* no afectó a los niveles de *Tjp1* y *Ocln* a nivel génico. No obstante, los organoides deficientes en *Alpl* revelaron un menor nivel de las proteínas ZO-1 y claudina-4. Esto deja en evidencia la importancia de la TNAP en la expresión de las uniones estrechas, las cuales son fundamentales en la correcta función de barrera intestinal.

Es interesante la existencia de la correlación entre los genes *Alpl*, *Tnf* e *Il17c* también en organoides yeyunales. Sin embargo, no se mantiene la correlación entre *Alpl* y *Alpl\_flox*, de tal forma que los organoides *knockout* muestran niveles muy reducidos de *Alpl\_flox*, mientras que los niveles de expresión de *Alpl* tienen cierta tendencia a aumentar. Esto podría ser el resultado de una retroalimentación positiva causada por la deficiencia de la enzima. Se observa además una correlación positiva altamente significativa entre los niveles de *Alpl* y los niveles de *Akp3* y *Akp6*. Todo esto sugiere que los genes correspondientes a las fosfatasas alcalinas se inducen globalmente en ausencia de la actividad TNAP en los organoides de yeyuno. Estos tres genes también exhiben correlaciones positivas con *Cxcl10*, *Tjp1*, *Cldn4*, *Tgfb1* y, como se ha mencionado anteriormente, *Il17c* y *Tnf*. Entre ellos, *Cxcl10* muestra una inducción en los organoides *knockout*, mientras que *Cldn4*, *Tnf*, *Tgfb1* e *Il17c* muestran una tendencia marcada en la misma dirección, aunque no alcanza significancia estadística. Por tanto, cabe interpretar que la deficiencia en la actividad TNAP propicia un fenotipo epitelial particular,

## DISCUSIÓN

que puede estar mediado en buena medida por la inducción de *Akp3* y *Akp6*. Será necesario un análisis metabolómico o una deleción doble/triple para confirmar este extremo. Es interesante constatar que varios de los genes mencionados mantienen su correlación en organoides y en el colon *in vivo*, aunque en otros casos esta correlación se pierde, como en el caso de la *Akp6*. La expresión de *Cxcl1* fue la única correlación positiva directa con los niveles de *Alpl<sub>flox</sub>* en los organoides yeyunales. Esta quimioquina apenas se expresa en organoides *knockout*, lo que sugiere que la actividad TNAP tiene un papel estrechamente relacionado con el mecanismo de inducción de la citoquina en cuestión. Esta observación no se confirma en el colon, lo que probablemente indica que esta actividad es sustituible por enzima proveniente de otros tipos celulares en el tejido.

## **6. CONCLUSIONES**



Las conclusiones son:

1. La haplodeficiencia del gen *Alpl* (ratones TNAP+/-) asociada con una dieta rica en grasa (10% p/p) induce una respuesta esteatogénica similar a la observada en animales WT alimentados con una dieta grasa deficiente en colina y metionina, con un aumento de ciertos parámetros inflamatorios y de fibrosis, y modulación de ciertos genes relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares. Por tanto, la TNAP está implicada en la respuesta adaptativa a la grasa.
2. La delección de *Alpl* en el epitelio intestinal afectó a células de intestino delgado y grueso, sin producir cambios discernibles morfológicos o moleculares en ambos segmentos, ni alteraciones sustanciales en la microbiota. La delección indujo cambios en la expresión de ciertos genes, como *Akp3*, *Akp6*, *Tjp1*, *Cxcl1* o *Cxcl10*, en células epiteliales primarias y en organoides yeyunales, si bien la naturaleza de tales cambios no fue consistente en estas poblaciones celulares, presumiblemente debido a las diferencias en el contexto biológico, como la presencia o ausencia de microbiota y células no epiteliales.
3. La delección epitelial intestinal de *Alpl* altera la actividad AP extraintestinal en condiciones basales, aumentándola en hueso y riñón, sin cambios en la sensibilidad a inhibidores específicos, por lo que el patrón de glicosilación no parece verse modificado en estos tejidos.
4. La delección epitelial intestinal de *Alpl* aumenta la expresión de genes relacionados con la fibrosis hepática e inflamación, y modula la expresión de genes relacionados con el metabolismo

## CONCLUSIONES

lipídico en el hígado. Estos cambios se asocian a un déficit de colina en el hígado. Por tanto, la deficiencia de actividad TNAP en el epitelio intestinal se traduce en un menor aporte de este importante metabolito al hígado, probablemente contribuyendo al establecimiento de un fenotipo proinflamatorio y profibrótico, y presumiblemente a alteraciones en el metabolismo de lípidos. Serán necesarios experimentos a largo plazo para confirmar este extremo.

5. La delección epitelial de *Afp1* da lugar a un fenotipo complejo en la colitis experimental inducida por DSS, que combina un mayor deterioro en términos macroscópicos y de infiltración neutrofilica y una expresión atenuada de marcadores inflamatorios en el colon, que parece reflejar un menor estado de activación del infiltrado mucosal. La protección se ejerce ya a los 4 días, y no está relacionada con la modulación de la expresión de otras isoformas de fosfatasa alcalina, pero sí con el incremento temprano de actividad de la enzima en el colon.
6. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral confirman que la TNAP epitelial intestinal es biológicamente relevante tanto en los tejidos intestinales como en los extraintestinales. Por lo tanto, la TNAP sigue destacando como un elemento fundamental en la función de barrera intestinal.



## **7. CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

1. TNAP haploinsufficiency associated with a high-fat diet (10% w:w) induces a steatogenic response similar to that observed in WT animals fed a choline and methionine-deficient diet, with an increase in certain inflammatory and fibrotic parameters and modulation of specific genes related to bile acid metabolism. Therefore, TNAP is implicated in the adaptive response to fat.
2. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* was achieved in both small intestine and colon, without producing discernible morphological or molecular changes in either segment, nor substantial alterations in the microbiota. The deletion of *Alpl* induced changes in the expression of certain genes, such as *Akp3*, *Akp6*, *Tjp1*, *Cxcl1*, or *Cxcl10*, in primary epithelial cells (IECs) and jejunal organoids, although the nature of these changes was not consistent across these cell populations, presumably due to differences in the biological context, such as the presence or absence of colonic microbiota and non-epithelial cells.
3. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* alters extraintestinal AP activity under basal conditions, resulting in increased AP activity in bone and kidney, with no changes in sensitivity to specific inhibitors. This suggests that the glycosylation pattern does not appear to be modified in these tissues.
4. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* increases the expression of genes related to liver fibrosis and inflammation and modulates the expression of genes associated with lipid metabolism in the liver. These changes are associated with a choline deficit in hepatocytes. Therefore, the deficiency of TNAP activity in the intestinal epithelium results in a reduced supply of this important metabolite to the liver, likely contributing to the establishment of

## CONCLUSIONS

a proinflammatory and profibrotic phenotype, and presumably to alterations in lipid metabolism. Long-term experiments will be necessary to confirm this hypothesis.

5. Intestinal epithelial deletion of *Alpl* results in a complex phenotype in DSS-induced experimental colitis, characterized by both increased macroscopic deterioration and neutrophilic infiltration, along with attenuated expression of inflammatory markers in the colon. This appears to reflect a reduced state of activation within the mucosal infiltrate. The protection is evident as early as 4 days and is not related to the modulation of the expression of other alkaline phosphatase isoforms but rather to the early increase in enzyme activity in the colon.
6. The results obtained in this doctoral thesis confirm that intestinal epithelial TNAP is biologically relevant both to the intestinal and extraintestinal tissues. TNAP thus continues to emerge as a pivotal player in intestinal barrier function.

## **8. ANEXO**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

## 8.1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADP. Adenosín difosfato  
 Akp2. Fosfatasa alcalina no específica de tejido  
 Akp3. Fosfatasa alcalina intestinal duodenal  
 Akp5. Fosfatasa alcalina embrionaria  
 Akp6. Fosfatasa alcalina intestinal global  
 ALPI. Fosfatasa alcalina intestinal  
 Alpl. Fosfatasa alcalina no específica de tejido  
 ALPL. Fosfatasa alcalina no específica de tejido  
 ALPPL2. Fosfatasa alcalina germinal  
 AMP. Adenosín monofosfato  
 ANKH. Proteína de anquilosis transmembrana de paso múltiple  
 AP. Fosfatasa alcalina  
 APC. Células presentadoras de antígenos  
 ATP. Adenosín trifosfato  
 BMP-2. Bone Morphogenetic Protein-2  
 CBDL. Ligadura del conducto biliar común  
 CGP. Células germinales primordiales  
 CLP. Punción de ligación cecal  
 CpG. Citosina fosfo Guanina  
 CU. Colitis ulcerosa  
 DAI. Índice de daño de la enfermedad; Disease Activity Index  
 DAMPs. Patrones moleculares asociados a daños  
 dIAP. Fosfatasa alcalina intestinal duodenal  
 DMG. Dimetilglicina  
 DNA. Ácido desoxirribonucleico  
 DSS. Sulfato de dextrano sódico  
 DTT. Ditiotreitól  
 EAP. Fosfatasa alcalina embrionaria  
 EC. Enfermedad de Crohn  
 EDTA. Ácido etilenodiaminatetraacético  
 EEM. Error estándar  
 EII. Enfermedad inflamatoria intestinal  
 ENPP1. Ectonucleotidase pyrophosphate phosphodiesterase 1  
 FABP4. Fatty acid-binding protein 4  
 FBS. Suero bovino fetal  
 GABA. Ácido gamma aminobutírico  
 GCAP. Fosfatasa alcalina de células germinales  
 G-CSF. Factor estimulador de colonias de granulocitos  
 gIAP. Fosfatasa alcalina intestinal global  
 GIP. Polipéptido inhibidor gástrico, Polipéptido inhibidor gástrico  
 GLP-1. Péptido similar al glucagón tipo 1  
 GPC-d9. Glicerofosfolina-d9  
 GPI. Glicosilfosfatidilinositol  
 HOMA-IR. Índice de la resistencia a insulina

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HPP. Hipofosfatasa  
HTAB. Bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
IAP. fosfatasa alcalina intestinal  
IECs. Células del epitelio intestinal  
IL-. Interleuquina-  
IL-1 $\beta$ . Interleucina 1 beta  
ILC. Células linfoides innatas  
KLF5. Factor 5 Kruppel-like  
LPS. Lipopolisacárido  
MCD. Dieta deficiente en metionina y colina  
NAFLD. Enfermedad de hígado graso no alcohólico  
NASH. Esteatohepatitis no alcohólica  
NOD2. Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2  
OPN. Osteopontina  
PAMPs. Pathogen-associated molecular patterns o patrones moleculares asociados a patógenos  
PANX1. Panexina 1  
PBS. Tampón fosfato salino  
PCho. Fosfocolina  
PEA. Fosfoetanolamina  
PHOSPHO1. phosphoethanolamine/ phosphocholine phosphatase 1  
Pi. Fosfato inorgánico  
PLAP. Fosfatasa alcalina placentaria  
PLP. Piridoxal-5'-fosfato  
PP. Péptido pancreático, Péptido pancreático  
PPAR $\gamma$ . Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas  
PPi. Pirofosfato inorgánico  
PrPc. Proteína priónica celular  
PYY. Péptido YY  
qRT-PCR. PCR cuantitativa a tiempo real  
REG. Regenerating islet-derived protein  
siRNA. Small interfering RNA  
Th. Células T helper  
TJ. Uniones estrechas; Tight junctions  
TLR. Receptor tipo Toll  
TNAPinh. Inhibidor específico de la TNAP  
TNBS. Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico  
TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral alfa  
UDP. Uridina difosfato  
UI. Unidades internacionales  
VLDL. lipoproteína de muy baja densidad; Very Low Density Lipoproteins  
VM. Vesículas de la matriz  
y col. y colaboradores  
ZO. Zonula occludens



## 8.2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de PLAP. Representación del monómero A (en amarillo) y el B (en azul), sitio catalítico, dominio corona, extremo N-terminal y sito de anclaje GPI (43). .....	18
Figura 2. Funciones principales de la isoenzima IAP. ....	24
Figura 3. Funciones fisiopatológicas de la TNAP. ....	27
Figura 4. Proceso de mineralización ósea. ANKH: proteína de anquilosis transmembrana de paso múltiple, PANX1: panexina 1, ATP: adenosina trifosfato, PPI: pirofosfato inorgánico, Pi: fosfato inorgánico, ENPP1: miembro de la familia 1 de la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa, TNAP: fosfatasa alcalina no específica de tejido, PHOSPHO1: <i>phosphoethanolamine/ phosphocholine phosphatase 1</i> , PCho: fosfocolina, PEA: fosfoetanolamina, VM: vesícula de la matriz.....	28
Figura 5. Diseño experimental en el estudio del efecto de la delección de <i>Alpl</i> en la evolución de la colitis experimental en ratones WT y <i>Alpl</i> <sup>EC-/-</sup> . ....	67
Figura 6. Desarrollo del modelo MCD en ratones WT y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> . Evolución de pesos (A). Actividad ALT en plasma (B). Concentración de glucosa en plasma (C). Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	87
Figura 7. Contenido de grasa hepática y estudio histológico del hígado. Contenido grasa en hígado (A) e imágenes histológicas (10x) de secciones de tejido hepático sometidas a la tinción con H&E (B). Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	88
Figura 8. Concentraciones plasmáticas de insulina e índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Resultados de multiplex de la concentración plasmática de insulina (A) y HOMA-IR (B). Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	89
Figura 9. Concentraciones plasmáticas de marcadores de inflamación, obesidad y esteatosis en plasma de ratones WT y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> . Niveles plasmáticos de leptina (A), IL-6 (B), péptido C (C), grelina (D), polipéptido inhibidor gástrico (E), péptido similar al glucagón tipo 1 (F), péptido pancreático (PP) (G), péptido YY (PYY) (H), resistina (I), glucagón (J) y amilina (K) medidos mediante multiplex. Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y grupo MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05....	90
Figura 10. Estudio de la expresión de <i>Alpl</i> , actividad AP y su perfil de inhibición en tejido hepático en ratones WT y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> . Expresión de <i>Alpl</i> (A), actividad AP (B) y sensibilidad a levamisol (C). Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	91
Figura 11. Expresión de genes relacionados con fibrosis en tejido hepático en ratones WT y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> . Expresión de <i>Des</i> (A) y <i>Tgfb1</i> (B) mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=8 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y <i>TNAP</i> <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	92
Figura 12. Expresión de genes relacionados con inflamación y señalización de LPS en tejido hepático. Expresión de <i>Il1b</i> (A), <i>Il6</i> (B), <i>Tnf</i> (C), <i>Lbp</i> (D) y <i>Cd14</i> (E). Grupos: control (WT	

## ÍNDICE DE FIGURAS

n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	93
Figura 13. Expresión de genes relacionados con inflamación y fibrosis hepáticas. Expresión de <i>Gpx1</i> (A), <i>Spp1</i> (B) y <i>Panx1</i> (C). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. ....	94
Figura 14. Expresión de genes relacionados el metabolismo glucídico en hígado. Expresión de <i>Pck1</i> (A), <i>G6pc</i> (B), <i>Glut2</i> (C) y <i>Pdk4</i> (D). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	95
Figura 15. Expresión de genes relacionados el metabolismo lipídico en hígado. Expresión de <i>Acaca</i> (A), <i>Fasn</i> (B), <i>Srebf1</i> (C), <i>Scd1</i> (D), <i>Fads1</i> (E) y <i>Fads2</i> (F). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. ....	96
Figura 16. Expresión de <i>Tff3</i> en hígado. Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	96
Figura 17. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos en hígado. Expresión de <i>Acsm2</i> (A) y <i>Acot5</i> (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	97
Figura 18. Expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares en hígado. Expresión de <i>Star</i> (A), <i>Cyp7b1</i> (B), <i>Sult2a1</i> (C), <i>Sult3a1</i> (D) y <i>Hsd3b5</i> (E). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	98
Figura 19. Expresión proteica de p-AMPK y AMPK en tejido hepático. Expresión proteica de p-AMPK y AMPK (A) y ratio (B) medida mediante <i>Western Blot</i> en tejido hepático de ratones WT y TNAP <sup>+/-</sup> . Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	99
Figura 20. Expresión proteica de p-AKT/AKT y PPARα en tejido hepático. Expresión proteica de p-AKT y AKT (A), cuantificación de la ratio p-AKT/AKT (B), expresión proteica de PPARα (C) y su cuantificación (D) mediante <i>Western Blot</i> en tejido hepático de ratones WT y TNAP <sup>+/-</sup> . Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. ....	99
Figura 21. Expresión de <i>S100a8</i> y <i>Alpl</i> en tejido colónico. Expresión de <i>S100a8</i> (A) y <i>Alpl</i> (B) mediante RT-qPCR en tejido colónico en ratones WT y TNAP <sup>+/-</sup> . Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. ....	100
Figura 22. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico. Actividad fosfatasa alcalina (mU/mg proteína) (A) y sensibilidad de la actividad fosfatasa alcalina a distintas concentraciones de levamisol (B), expresado como porcentaje de inhibición de la actividad AP. Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	101
Figura 23. Expresión de genes relacionados con uniones estrechas en tejido colónico. Expresión de claudina 4 ( <i>Cldn4</i> ) (A) y ZO-1 ( <i>Tjp1</i> ) (B). Grupos: control (WT n=8 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8) y MCD (WT n=7 y TNAP <sup>+/-</sup> n=8). Los resultados fueron expresados como media ± EEM. +: p<0,05. ....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 24. Genotipo de los ratones $Alpl_{flox/flox}$ , $Alpl_{flox/WT}$ y $Alpl_{WT/WT}$ . Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR del genotipaje de ratones para la obtención de ratones $Alpl_{flox/flox}$ .....	103
Figura 25. Genotipo de los ratones Vil-Cre Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR del genotipaje de ratones para la obtención de ratones Vil-Cre(+) y Vil-Cre(-). La banda superior corresponde a la $\beta$ -actina y la inferior a la recombinasa Cre. ....	103
Figura 26. Genotipo de los ratones $Alpl$ -VilCre Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p:v) en TAE 1x del producto de PCR de la comprobación de recombinación del gen $Alpl$ por la recombinasa CRE. ....	104
Figura 27. Expresión génica de $Alpl$ y $Alpl_{flox}$ para confirmar la delección del gen en los ratones $Alpl^{IEC-/-}$ . Expresión génica medida mediante RT-qPCR en IECs de intestino delgado (A) y colon (B) completos de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ a los 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. Grupos: WT (n=13) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=12). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	106
Figura 28. Histología de intestino delgado y colon. Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción H&E de yeyuno y colon de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ a los 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. ....	106
Figura 29. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en yeyuno, íleon y colon. (A) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en yeyuno, íleon y colon. (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol y TNAP <sub>inh</sub> (40 $\mu$ M). Grupos: WT (n=7-11) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6-10). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	107
Figura 30. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejidos o materia extraintestinales. (A) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en hígado, bazo y plasma. (B) Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en riñón, hueso y heces. Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol y TNAP <sub>inh</sub> (40 $\mu$ M) en riñón (C) y hueso (D). Grupos: WT (n=7-25) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6-25). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	108
Figura 31. Estudio de la expresión génica de $Alpl$ , $Alpl_{flox}$ , $Akp3$ , y $Akp6$ en tejido completo en intestino delgado y colon. Expresión génica por RT-qPCR en intestino delgado completo (A), y tejido colónico completo (B). Grupos: WT (n=7-11) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6-10). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	109
Figura 32. Estudio de la expresión génica de $Alpl$ , $Alpl_{flox}$ , $Akp3$ y $Akp6$ en enterocitos de intestino delgado y colon. Expresión génica por RT-qPCR en IECs provenientes de intestino delgado (A) y colon (B). Grupos: WT (n=12) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=12). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	110
Figura 33. Estudio de la expresión génica de $Alpl$ , $Alpl_{flox}$ , $Akp3$ y $Akp6$ en riñón e hígado. Expresión génica por RT-qPCR en riñón (A) e hígado (B). Grupos: WT (n=6-7) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6-7). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	110
Figura 34. Estudio de la expresión génica de quimioquinas, citoquinas y péptidos antimicrobianos en tejido colónico. Expresión génica por RT-qPCR de $Cxcl1$ , $Ccl2$ (A), $Ifng$ , $Tnf$ , $Il6$ , $Il17c$ (B), $Lyz1$ , $Reg3g$ (C). Grupos: WT (n=11) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=10). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 35. Estudio de la expresión génica de <i>Tjp1</i> , <i>Tff3</i> , <i>S100a8</i> y <i>S100a9</i> en tejido colónico. Expresión génica por RT-qPCR. Grupos: WT (n=11) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=10). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	112
Figura 36. Estudio de la expresión génica de <i>Nt5e</i> en tejido colónico. Expresión génica por RT-qPCR. Grupos: WT (n=11) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=10). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	112
Figura 37. Estudio de la expresión génica de <i>Cxcl1</i> , <i>Nt5e</i> , <i>Tjp1</i> y <i>Defa1</i> en IECs provenientes de intestino delgado y colon. Expresión génica por RT-qPCR de los genes <i>Cxcl1</i> , <i>Nt5e</i> y <i>Tjp1</i> en IEC de intestino delgado (A) y <i>Cxcl1</i> , <i>Defa1</i> , <i>Nt5e</i> y <i>Zo1</i> en IEC de colon (B). Grupos: WT (n=13) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=12). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	113
Figura 38. Matriz de correlación de la expresión génica en tejido colónico completo en ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ . Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco. ....	114
Figura 39. Matriz de correlación de la expresión génica en IECs provenientes de colon e intestino delgado de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ . Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco. ....	115
Figura 40. Estudio de la expresión génica de <i>Tgfb1</i> , <i>Des</i> y <i>Tnf</i> en tejido hepático. Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=13) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=12). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	116
Figura 41. Estudio de la expresión génica de <i>Cd14</i> y <i>Lbp</i> en tejido hepático. Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=13) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=12). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	116
Figura 42. Estudio de la expresión génica de <i>Nt5e</i> y <i>Tff3</i> en tejido hepático. Expresión génica de <i>Nt5e</i> (A) y <i>Tff3</i> (B) mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=25) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=23). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	117
Figura 43. Estudio de la expresión génica de <i>Acsm2</i> , <i>Fads2</i> , <i>Fasn</i> , <i>Scd1</i> , <i>Star</i> y <i>Sult3a1</i> en tejido hepático. Expresión génica mediante RT-qPCR. Grupos: WT (n=25) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=23). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	117
Figura 44. Matriz de correlación de la expresión génica en hígado de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ . Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t $p < 0,05$ ) se muestran indicadas con un asterisco. ....	118
Figura 45. Niveles hepáticos de fosocolina, colina, dimetilglicina (DMG), betaína, creatina y metionina. Grupos: WT (n=7) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: $p < 0,05$ . ....	119
Figura 46. Desglose del filo de las comunidades bacterianas más abundantes en las muestras de heces de los ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ . Grupos: WT (n=6) y $Alpl^{IEC-/-}$ (n=6). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 47. Comunidades bacterianas a nivel género más abundantes en las muestras de heces de los ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ . Grupos: WT (n=6) y  $Alpl^{IEC-/-}$  (n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 120
- Figura 48. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS durante 7 días. Evolución de pesos de los animales WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  durante la colitis experimental inducida por DSS. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso adquirido o perdido, tomando como referencia el peso inicial de cada animal. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 122
- Figura 49. Evolución del índice de actividad de la enfermedad en la colitis inducida por DSS durante 7 días. Evolución del DAI (A) y presencia de sangre en heces (B) en los animales WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  durante la colitis experimental inducida por DSS durante 7 días. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 123
- Figura 50. Longitud (A) y peso (B) del colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 123
- Figura 51. Cortes histológicos de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina y eosina de colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  en la colitis inducida por DSS a día 7. .... 124
- Figura 52. Grado histológico de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Evaluación de los diferentes parámetros realizada a simple ciego. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. .... 125
- Figura 53. Presencia de células MRP8+ en cortes histológicos de colon en la colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Imágenes representativas de IHC de MRP8 y puntuación de células MRP8+ de colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  en la colitis inducida por DSS a día 7. Evaluación realizada a simple ciego. .... 126
- Figura 54. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas de AP en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Expresión génica de *Alpl* (A), *Alpl<sub>fllox</sub>* (B), *Akp3* (C) y *Akp6* (D) por RT-qPCR en colon. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . .... 127
- Figura 55. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. (A) Actividad AP mU/mg proteína; (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol (Leva) y TNAPinh (40 $\mu$ M). Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . .... 128
- Figura 56. Evaluación del estado inflamatorio del colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Resultados mediante RT-qPCR de los genes *S100a8* (A), *S100a9* (B), *Il6* (C) y *Tnf* (D). Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. .... 129
- Figura 57. Expresión génica de quimioquinas en el colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Resultados mediante RT-qPCR de los genes *Cxcl1* (A), *Cxcl10* (B) y *Ccl2* (C). Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. .... 129

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 58. Expresión génica de *Tjp1* (A), *Lyz1* (B), *Il17c* (C) y *Tff3* (D) en el colon en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 130
- Figura 59. Expresión génica de *Alpl* (A), *Cd14* (B), *Lbp* (C), *Des* (D) y *Tff3* (E) en hígado en colitis inducida por la administración de DSS durante 7 días. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=4 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=4) y DSS (WT n=8 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=8). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 131
- Figura 60. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS durante 7 días (protocolo experimental a dos tiempos). Evolución de pesos de los animales WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  durante la colitis experimental por DSS. Los resultados se expresaron como porcentaje de peso, tomando como referencia el peso inicial de cada animal. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 133
- Figura 61. Evolución del índice de actividad de la enfermedad en la colitis inducida por DSS durante 7 días (protocolo experimental a dos tiempos). Evolución del DAI en los animales WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  durante la colitis experimental por DSS durante 7 días. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 133
- Figura 62. Longitud (A) y peso (B) del colon en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 134
- Figura 63. Cortes histológicos de colon en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Imágenes representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina y eosina de colon de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$  en la colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. .... 135
- Figura 64. Estudio de la expresión génica de las isoenzimas de AP en tejido colónico en colitis inducida por la administración de DSS durante 4 y 7 días. Expresión génica de *Alpl* (A), *Alpl\_flox* (B), *Akp3* (C) y *Akp6* (D) por RT-qPCR en colon. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 136
- Figura 65. Determinación de la actividad fosfatasa alcalina en tejido colónico en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. (A) Actividad AP mU/mg proteína. (B) Estudio de la inhibición de la actividad AP por los inhibidores levamisol (Leva) y TNAPinh (40 $\mu$ M). Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 137
- Figura 66. Evaluación del estado inflamatorio del colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR de los genes *S100a8* (A), *S100a9* (B), *Il6* (C) y *Tnf* (D). Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. .... 138
- Figura 67. Expresión génica de quimioquinas en el colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR de los genes *Cxcl1* (A), *Cxcl2* (B) y *Ccl2* (C). Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día 4 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. +:  $p < 0,05$ . ..... 139
- Figura 68. Determinación de FITC dextrano 4 kD en plasma en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante fluorimetría. Grupos: control (WT n=7 y  $Alpl^{IEC-/-}$  n=6), DSS día

## ÍNDICE DE FIGURAS

4 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	140
Figura 69. Expresión génica de <i>Tjp1</i> (A), <i>Lyzt1</i> (B), <i>Il17c</i> (C) y <i>Tff3</i> (D) en el colon en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=7 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6), DSS día 4 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. ....	141
Figura 70. Expresión génica de <i>Alpl</i> (A), <i>Cd14</i> (B), <i>Lbp</i> (C), <i>Des</i> (D) y <i>Tff3</i> (E) en el hígado en colitis inducida por DSS a día 4 y día 7. Resultados mediante RT-qPCR. Grupos: control (WT n=7 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6), DSS día 4 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6) y DSS día 7 (WT n=6 y $Alpl^{IEC-/-}$ n=6). Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: p<0,05. ....	142
Figura 71. Matriz de correlación de la expresión génica en colon de ratones WT en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t p<0,05) se muestran con un asterisco. ....	143
Figura 72. Matriz de correlación de la expresión génica en colon de ratones $Alpl^{IEC-/-}$ en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t p<0,05) se muestran con un asterisco. ....	144
Figura 73. Matriz de correlación parámetros colónicos (C), hepáticos (H) y plasmáticos (P) de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ a 4 días en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t p<0,05) se muestran con un asterisco. ....	145
Figura 74. Matriz de correlación parámetros colónicos (C), hepáticos (H) y plasmáticos (P) de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ a 7 días en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t p<0,05) se muestran con un asterisco. ....	145
Figura 75. Matriz de correlación de la expresión génica en colon (C) e hígado (H) de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ en la colitis inducida por DSS. Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t p<0,05) se muestran con un asterisco. ....	146
Figura 76. Organoides de yeyuno de ratones WT y $Alpl^{IEC-/-}$ . Fotografías representativas de organoides de yeyuno de ratones a día 1, 3 y 5 tras el silenciamiento con tamoxifeno 1 $\mu$ M. ....	147
Figura 77. Estudio de la expresión génica de <i>Alpl</i> , <i>Alpl_flox</i> , <i>Akp3</i> y <i>Akp6</i> en organoides de yeyuno. Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: p<0,05. ....	148
Figura 78. Estudio de la expresión génica de <i>Cxcl1</i> y <i>Cxcl10</i> en organoides de yeyuno. Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media $\pm$ EEM. +: p<0,05. ....	148

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 79. Estudio de la expresión génica y proteica de proteínas implicadas en las uniones estrechas en organoides de yeyuno. (A) Expresión génica por RT-qPCR de los genes *Cldn4*, *Tjp1* y *Ocln*. (B) Expresión proteica mediante *Western Blot* de ZO-1 y claudina-4 (*Cldn4*) (B). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM. Se muestra el valor de p para las diferencias de expresión en *Cldn4*. ..... 149
- Figura 80. Estudio de la expresión génica de *Tnf*, *Defa2*, *Muc4*, *Tgfb1*, *Il17c* y *Sis* en organoides de yeyuno. Expresión génica por RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM..... 149
- Figura 81. Matriz de correlación de la expresión génica en organoides yeyunales de ratones WT y  $Alpl^{IEC-/-}$ . Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas en azul. La intensidad del color es proporcional a los coeficientes de correlación. Las correlaciones estadísticamente significativas (correlación de Pearson, prueba t  $p < 0,05$ ) se muestran subrayadas y en negrita. .... 151



### 8.3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura génica, proteica, nombre común y distribución de las distintas isoenzimas de fosfatasa alcalina de humano y ratón (43). .....	14
Tabla 2. Sensibilidad de las APs a L-fenilalanina, L-homoarginina, levamisol y teofilina. ....	21
Tabla 3. Composición de la dieta control y la dieta MCD.....	65
Tabla 4. Criterios de valoración del índice de daño de la enfermedad (DAI) en la colitis experimental por DSS. ....	68
Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la RT-qPCR. ....	81



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



1. Millán JL. Alkaline phosphatases. *Purinergic Signal*. 2006;2(2):335–41.
2. Millán JL, Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(4):398–416.
3. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):437–502.
4. Poupon R. Liver alkaline phosphatase: a missing link between choleresis and biliary inflammation. *Hepatology*. 2015 Jun;61(6):2080–90.
5. Sun Y, Rahbani JF, Jedrychowski MP, Riley CL, Vidoni S, Bogoslavski D, et al. Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. *Nature*. 2021;593(7860):580–5.
6. Hernández-Chirlaque C, Gámez-Belmonte R, Ocón B, Martínez-Moya P, Wirtz S, de Medina FS, et al. Tissue non-specific alkaline phosphatase expression is needed for the full stimulation of T cells and T cell-dependent colitis. *J Crohn's Colitis*. 2017;11(7):857–70.
7. Marquez C, Toribio ML, Marcos MA, de la Hera A, Barcena A, Pezzi L, et al. Expression of alkaline phosphatase in murine B lymphocytes. Correlation with B cell differentiation into Ig secretion. *J Immunol*. 1989 May;142(9):3187–92.
8. Bessueille L, Kawtharany L, Quillard T, Goetsch C, Briolay A, Taraconat N, et al. Inhibition of alkaline phosphatase impairs dyslipidemia and protects mice from atherosclerosis. *Transl Res*. 2022;1–16.
9. López-Posadas R, González R, Ballester I, Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Suárez MD, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(2):543–56.
10. Glickman RM, Alpers DH, Drummey GD, Isselbacher KJ. Increased lymph alkaline phosphatase after fat feeding: effects of medium chain triglycerides and inhibition of protein synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Feb;201(2):226–35.
11. Guthmann F, Maehl P, Preiss J, Kolleck I, Rüstow B. Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 regulates palmitate uptake by human platelets. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2023 May 28];59(11):1999–2003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12530530/>
12. Mizumori M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, Akiba Y. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J Physiol* [Internet]. 2009 Jul 15 [cited 2023 May 28];587(Pt 14):3651–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451200/>
13. Akiba Y, Mizumori M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. Duodenal brush border intestinal

## BIBLIOGRAFÍA

- alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2023 May 28];293(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916646/>
14. Martínez-Moya P, Ortega-González M, González R, Anzola A, Ocón B, Hernández-Chirlaque C, et al. Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats. *Pharmacol Res* [Internet]. 2012;66(2):144–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.006>
  15. Chen KT, Malo MS, Moss AK, Zeller S, Johnson P, Ebrahimi F, et al. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Aug;299(2):G467-75.
  16. Pettengill M, Matute JD, Tresenriter M, Hibbert J, Burgner D, Richmond P, et al. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PLoS One*. 2017;12(4):1–12.
  17. Bates JM, Akerlund J, Mittge E, Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2007 Dec 13 [cited 2023 May 28];2(6):371–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18078689/>
  18. Wilkes JM, Garner A, Peters TJ. Studies on the localization and properties of rat duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase with special relation to alkaline phosphatase. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1987 Apr 16 [cited 2023 May 28];924(1):159–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2950930/>
  19. Moss AK, Hamarneh SR, Mohamed MMR, Ramasamy S, Yammine H, Patel P, et al. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2013 [cited 2023 May 28];304(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23306083/>
  20. Tuyama AC, Chang CY. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes*. 2012;4(3):266–80.
  21. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J Hepatol* [Internet]. 2018;69(4):896–904. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.036>
  22. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84.
  23. Dai Xin, Lv Zong-Shun, Wang Bang-Mao ZL. Expression of intestinal tight junction proteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease - PubMed [Internet]. [cited 2023 May 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24895809/>

24. Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 May 14];151(4):733-746.e12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27342212/>
25. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015 Mar;1(2):222–32.
26. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):1877–87.
27. Alisi A, Manco M, Devito R, Piemonte F, Nobili V. Endotoxin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels associated with nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jun;50(6):645–9.
28. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*. 2007 Oct;17(10):1374–80.
29. Fukui H, Brauner B, Bode JC, Bode C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol*. 1991 Mar;12(2):162–9.
30. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];152(2):313-321.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27793607/>
31. Sánchez De Medina F, Martínez-Augustin O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(12):2317–26.
32. Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA, 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 Mar;84(5):1234–8.
33. Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M. Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. Evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution. *J Biol Chem*. 1988 Aug;263(24):12020–7.
34. Millán JL, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 May;85(9):3024–8.

## BIBLIOGRAFÍA

35. Griffin CA, Smith M, Henthorn PS, Harris H, Weiss MJ, Raducha M, et al. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am J Hum Genet.* 1987 Dec;41(6):1025–34.
36. Martin D, Tucker DF, Gorman P, Sheer D, Spurr NK, Trowsdale J. The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. *Ann Hum Genet.* 1987 May;51(2):145–52.
37. Studer M, Terao M, Gianni M, Garattini E. 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 Sep;179(3):1352–60.
38. Matsuura S, Kishi F, Kajii T. Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 May;168(3):993–1000.
39. Kishi F, Matsuura S, Kajii T. Nucleotide sequence of the human liver-type alkaline phosphatase cDNA. *Nucleic Acids Res.* 1989 Mar;17(5):2129.
40. Terao M, Pravtcheva D, Ruddle FH, Mintz B. Mapping of gene encoding mouse placental alkaline phosphatase to chromosome 4. *Somat Cell Mol Genet.* 1988 Mar;14(2):211–5.
41. Manes T, Glade K, Ziomek CA, Millán JL. Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics.* 1990 Nov;8(3):541–54.
42. Narisawa S, Hoylaerts MF, Doctor KS, Fukuda MN, Alpers DH, Millán JL. A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Nov;293(5):G1068-77.
43. René Buchet JLM& DM. Phosphatase Modulators IN M O L E C U L A R B I O L O G Y™ Series Editor.
44. Merchant-Larios H, Mendlovic F, Alvarez-Buylla A. Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse. *Differentiation* [Internet]. 1985 [cited 2023 May 15];29(2):145–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4043584/>
45. MacGregor GR, Zambrowicz BP, Soriano P. 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 May;121(5):1487–96.
46. Narisawa S, Hasegawa H, Watanabe K, Millán JL. Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse. *Dev Dyn* [Internet]. 1994 [cited 2023 May 15];201(3):227–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7533563/>



47. Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol*. 1997 Mar;107(3):183–91.
48. Fonta C, Négyessy L, Renaud L, Barone P. Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission. *Cereb Cortex* [Internet]. 2004 Jun [cited 2023 May 15];14(6):595–609. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15054075/>
49. Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2008 Nov [cited 2023 May 15];334(2):199–217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18843508/>
50. N Sato , Y Takahashi SA. Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes - PubMed [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7509208/>
51. Scheibe RJ, Moeller-Runge I, Mueller WH. Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1991 [cited 2023 May 15];266(31):21300–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1939166/>
52. Heath JK, Suva LJ, Yoon K, Kiledjian M, Martin TJ, Rodan GA. Retinoic acid stimulates transcriptional activity from the alkaline phosphatase promoter in the immortalized rat calvarial cell line, RCT-1. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1992 [cited 2023 May 15];6(4):636–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1584226/>
53. Gianni' M, Studer M, Carpani G, Terao M, Garattini E. Retinoic acid induces liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *Biochem J*. 1991;274(3):673–8.
54. Zernik J, Kream B, Twarog K. Tissue-specific and dexamethasone-inducible expression of alkaline phosphatase from alternative promoters of the rat bone/liver/kidney/placenta gene. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1991 May 15 [cited 2023 May 15];176(3):1149–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2039500/>
55. Gianni M, Terao M, Sozzani S, Garattini E. Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells. *Biochem J* [Internet]. 1993 [cited 2023 May 15];296 ( Pt 1)(Pt 1):67–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8250858/>
56. Orimo H, Shimada T. Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-trans-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line. *Bone* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 15];36(5):866–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814302/>

## BIBLIOGRAFÍA

57. Hatta M, Daitoku H, Matsuzaki H, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, et al. Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR. *Int J Mol Med* [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2023 May 15];9(2):147–52. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.9.2.147/abstract>
58. N Yusa 1, K Watanabe, S Yoshida, N Shirafuji, S Shimomura, K Tani, S Asano NS. Transcription factor Sp3 activates the liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase promoter in hematopoietic cells - PubMed [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11073119/>
59. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*. 2002;17(7):1190–9.
60. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. 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* [Internet]. 2002 Sep 27 [cited 2023 May 15];277(39):36024–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12130649/>
61. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2003 Oct [cited 2023 May 15];18(10):1842–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14584895/>
62. Fakhry M, Roszkowska M, Briolay A, Bougault C, Guignandon A, Diaz-Hernandez JI, 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 Mol Basis Dis* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2023 May 15];1863(3):643–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27932058/>
63. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2023 May 15];391(1):1087–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20004646/>
64. Lencel P, Delplace S, Pilet P, Leterme D, Miellot F, Sourice S, et al. Cell-specific effects of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 May 15];91(10):1434–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21555997/>
65. Hustin J, Collette J, Franchimont P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours. *Int J Androl* [Internet]. 1987 [cited 2023 May 27];10(1):29–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3583420/>

66. Chang CH, Angellis D, Fishman WH. Presence of the Rare D-Variant Heat-stable, Placental-type Alkaline Phosphatase in Normal Human Testis. *Cancer Res* [Internet]. 1980 [cited 2023 May 27];40(5):1506–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6154531/>
67. Goldstein DJ, Rogers C, Harris H. 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* [Internet]. 1982 Oct 13 [cited 2023 May 27];125(1):63–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6814793/>
68. Fishman L, Miyayama H, Fishman WH. Developmental Phase-specific Alkaline Phosphatase Isoenzymes of Human Placenta and Their Occurrence in Human Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1976 [cited 2023 May 27];36:2268–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1277131/>
69. Prakash UNS, Srinivasan K. Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats. *Br J Nutr* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 May 27];104(1):31–9. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/beneficial-influence-of-dietary-spices-on-the-ultrastructure-and-fluidity-of-the-intestinal-brush-border-in-rats/0897715206BBF523C30046D3C60CC263>
70. Martin L, Pieper R, Schunter N, Vahjen W, Zentek J. 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* [Internet]. 2013 Jun [cited 2023 May 27];67(3):248–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23742645/>
71. Sogabe N, Maruyama R, Hosoi T, Goseki-Sone M. Enhancement effects of vitamin K1 (phyloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [Internet]. 2007 Jun [cited 2023 May 27];53(3):219–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17874826/>
72. Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M. Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* [Internet]. 2004 Jul [cited 2023 May 27];35(1):249–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15207765/>
73. Mineo H, Morikawa N, Ohmi S, Ishida K, Machida A, Kanazawa T, et al. Ingestion of potato starch containing esterified phosphorus increases alkaline phosphatase activity in the small intestine in rats. *Nutr Res* [Internet]. 2010 [cited 2023 May 27];30(5):341–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20579526/>
74. Yeh KY, Yeh M, Holt PR, Alpers DH. Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes. *Biochem J* [Internet]. 1994 [cited 2023 May 27];301 ( Pt 3)(Pt 3):893–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8053913/>

## BIBLIOGRAFÍA

75. Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, et al. Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2004 [cited 2023 May 27];286(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919939/>
76. Alkhoury F, Malo MS, Mozumder M, Mostafa G, Hodin RA. Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2023 May 27];289(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15774940/>
77. Shin J, Carr A, Corner GA, Tögel L, Dávaos-Salas M, Tran H, 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* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 27];289(36):25306–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25037223/>
78. Malo MS, Biswas S, Abedrapo MA, Yeh L, Chen A, Hodin RA. The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2023 May 27];25(12):684–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17233117/>
79. Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Menez A, Stura EA. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem*. 2001 Mar;276(12):9158–65.
80. Millán JL. Protein Structure and Functional Domains. Vol. 1, Mammalian Alkaline Phosphatases. 2006. 25–66 p.
81. Hoylaerts MF, Manes T, Millan JL. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem J* [Internet]. 1992 [cited 2023 May 27];286 ( Pt 1)(Pt 1):23–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1520273/>
82. Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Millán JL. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jun 21 [cited 2023 May 27];277(25):22992–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11937510/>
83. Ghosh K, Mazumder Tagore D, Anumula R, Lakshmaiah B, Kumar PPBS, Singaram S, et al. Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase--role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases. *J Struct Biol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2023 May 27];184(2):182–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076154/>
84. Martins MJ, Negrão MR, Hipólito-Reis C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. *Clin Biochem* [Internet]. 2001 [cited 2023 May 27];34(6):463–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11676975/>

85. Komaru K, Satou Y, Al-Shawafi HA, Numa-Kinjoh N, Sohda M, Oda K. Glycosylation-deficient mutations in tissue-nonspecific alkaline phosphatase impair its structure and function and are linked to infantile hypophosphatasia. *FEBS J* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Jun 3];283(6):1168–79. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.13663>
86. Halling Linder C, Narisawa S, Millán JL, Magnusson P. Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. *Bone* [Internet]. 2009 Nov [cited 2023 May 27];45(5):987–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19631305/>
87. Millán JL. Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology. *Mamm Alkaline Phosphatases From Biol to Appl Med Biotechnol* [Internet]. 2006 May 22 [cited 2023 May 28];1–322. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527608060>
88. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet.* 1995;11(1):45–51.
89. Ciancaglini P, Yadav MC, Simão AMS, Narisawa S, Pizauro JM, Farquharson C, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2010 Apr;25(4):716–23.
90. Ohkubo S, Kimura J, Matsuoka I. Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells : a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Br J Pharmacol.* 2000 Dec;131(8):1667–72.
91. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem.* 2003 Apr;278(15):13468–79.
92. Picher M, Burch LH, Boucher RC. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J Biol Chem.* 2004 May;279(19):20234–41.
93. Díez-Zaera M, Díaz-Hernández JI, Hernández-Álvarez E, Zimmermann H, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 2011;22(7):1014–24.
94. Li Z, Vance DE. Thematic Review Series: Glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res.* 2008 Jun 1;49(6):1187–94.
95. Bilski J, Mazur-Bialy A, Wojcik D, Zahradnik-Bilska J, Brzozowski B, Magierowski M, et al. The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.* 2017;2017.

## BIBLIOGRAFÍA

96. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes A-MMA, Meijer DKF, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Feb;290(2):G377-85.
97. Bol-Schoenmakers M, Fiechter D, Raaben W, Hassing I, Bleumink R, Kruijswijk D, et al. Intestinal alkaline phosphatase contributes to the reduction of severe intestinal epithelial damage. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;633(1–3):71–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.01.023>
98. Fishman WH, Green S, Inglis NI. L-phenylalanine : An organ specific, stereo-specific inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase. *Nature*. 1963;198(4881):685–6.
99. Fishman WH, Sie HG. Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L homoarginine. *Enzymologia*. 1971 Sep;41(3):141–67.
100. Chang L, Duy D Le, Mébarek S, Popowycz F, Pellet-Rostaing S, Lemaire M, et al. Synthesis and evaluation of thiophenyl derivatives as inhibitors of alkaline phosphatase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 Apr;21(8):2297–301.
101. Debray J, Chang L, Marquès S, Pellet-Rostaing S, Le Duy D, Mebarek S, et al. Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests. *Bioorg Med Chem*. 2013 Dec;21(24):7981–7.
102. Marquès S, Buchet R, Popowycz F, Lemaire M, Mebarek S. Synthesis of benzofuran derivatives as selective inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: effects on cell toxicity and osteoblast-induced mineralization. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016 Mar;26(5):1457–9.
103. Pinkerton AB, Sergienko E, Bravo Y, Dahl R, Ma C-T, Sun Q, et al. Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018 Jan;28(1):31–4.
104. Li Q, Huang J, Pinkerton AB, Millan JL, van Zelst BD, Levine MA, et al. Inhibition of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Attenuates Ectopic Mineralization in the Abcc6<sup>-/-</sup> Mouse Model of PXE but Not in the Enpp1 Mutant Mouse Models of GACI. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2019;139(2):360–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.030>
105. Maruyama S, Visser H, Ito T, Limsakun T, Zahir H, Ford D, et al. Phase I studies of the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of DS-1211, a tissue-nonspecific alkaline phosphatase inhibitor. *Clin Transl Sci*. 2022;15(4):967–80.
106. Soma K, Izumi M, Yamamoto Y, Miyazaki S, Watanabe K. In Vitro and In Vivo Pharmacological Profiles of DS-1211, a Novel Potent, Selective, and Orally Bioavailable Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Inhibitor. *J Bone Miner Res*.

- 2022;37(10):2033–43.
107. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*. 1990 Jan;186(2):133–50.
  108. Chen Y, Ou W, Lin D, Lin M, Huang X, Ni S, et al. Increased Uric Acid, Gamma-Glutamyl Transpeptidase and Alkaline Phosphatase in Early-Pregnancy Associated With the Development of Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2021 Oct 15 [cited 2023 May 28];8:756140. Available from: [/pmc/articles/PMC8554001/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3544001/)
  109. Aihara Y, Watanabe S, Amano K, Komatsu K, Chiba K, Imanaka K, et al. Placental alkaline phosphatase levels in cerebrospinal fluid can have a decisive role in the differential diagnosis of intracranial germ cell tumors. *J Neurosurg*. 2018 Sep;131(3):687–94.
  110. Magrini A, Bottini N, Gloria-Bottini F, Stefanini L, Bergamaschi A, Cosmi E, et al. Enzyme polymorphisms, smoking, and human reproduction. A study of human placental alkaline phosphatase. *Am J Hum Biol* [Internet]. 2003 Nov [cited 2023 May 28];15(6):781–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14595869/>
  111. Orsaria M, Londero AP, Marzinotto S, Di Loreto C, Marchesoni D, Mariuzzi L. Placental type alkaline phosphatase tissue expression in ovarian serous carcinoma. *Cancer Biomark*. 2016;17(4):479–86.
  112. Sartori MJ, Mezzano L, Lin S, Muñoz S, de Fabro SP. Role of placental alkaline phosphatase in the internalization of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into HEp2 cells. *Trop Med Int Health*. 2003 Sep;8(9):832–9.
  113. Lin S, Sartori MJ, Mezzano L, de Fabro SP. Placental alkaline phosphatase (PLAP) enzyme activity and binding to IgG in Chagas' disease. *Placenta*. 2005 Nov;26(10):789–95.
  114. Watanabe S, Watanabe T, Li WB, Soong BW, Chou JY. Expression of the germ cell alkaline phosphatase gene in human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem*. 1989 Jul;264(21):12611–9.
  115. Van Dongen JM, Kooyman J, Visser WJ, Holt SJ, Galjaard H. The effect of increased crypt cell proliferation on the activity and subcellular localization of esterases and alkaline phosphatase in the rat small intestine. *Histochem J*. 1977 Jan;9(1):61–75.
  116. Bamba T, Vaja S, Murphy GM, Dowling RH. Effect of fasting and feeding on polyamines and related enzymes along the villus: crypt axis. *Digestion*. 1990;46 Suppl 2:424–9.
  117. Nakano T, Inoue I, Koyama I, Kanazawa K, Nakamura KI, Narisawa S, 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*

## BIBLIOGRAFÍA

- Liver Physiol. 2007;292(5):1439–49.
118. Lynes M, Narisawa S, Millán JL, Widmaier EP. 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):1738–47.
119. Lynes MD, Widmaier EP. Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet. *Life Sci [Internet]*. 2011;88(9–10):384–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.12.015>
120. Drover VA, Ajmal M, Nassir F, Davidson NO, Nauli AM, Sahoo D, et al. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest [Internet]*. 2005 [cited 2023 May 28];115(5):1290–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841205/>
121. Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, Abumrad NA. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem [Internet]*. 2007 Jul 6 [cited 2023 May 28];282(27):19493–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17507371/>
122. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol [Internet]*. 2007 Sep 10 [cited 2023 May 28];297(5):353–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17481951/>
123. Trent MS. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol [Internet]*. 2004 Feb [cited 2023 May 28];82(1):71–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15052329/>
124. Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol [Internet]*. 2006 Sep 15 [cited 2023 May 28];297(2):374–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16781702/>
125. Malo MS, Nasrin Alam S, Mostafa G, Zeller SJ, Johnson P V., Mohammad N, et al. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut [Internet]*. 2010 Nov [cited 2023 May 28];59(11):1476–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20947883/>
126. Fawley J, Koehler S, Cabrera S, Lam V, Fredrich K, Hessner M, et al. Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to dysbiosis and bacterial translocation in the newborn intestine. *J Surg Res [Internet]*. 2017 Oct 1 [cited 2023 May 28];218:35–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28985873/>
127. Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, et al. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 May;306(10):G826–38.



128. Chirambo G, van Niekerk C, Crowther NJ. Specific knock-down of tissue non-specific alkaline phosphatase mRNA levels inhibits intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 and HepG2 cells. *Int J Exp Pathol*. 2017;98(5):260–8.
129. Gámez-Belmonte R, Hernández-Chirlaque C, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O. Experimental acute pancreatitis is enhanced in mice with tissue nonspecific alkaline phosphatase haplodeficiency due to modulation of neutrophils and acinar cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2018;1864(11):3769–79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.009>
130. Salles JP. Hypophosphatasia: Biological and Clinical Aspects, Avenues for Therapy. *Clin Biochem Rev* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jun 3];41(1):13–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32158059/>
131. Sebinelli HG, Andrilli LHS, Favarin BZ, Cruz MAE, Bolean M, Fiore M, et al. Shedding Light on the Role of Na,K-ATPase as a Phosphatase during Matrix-Vesicle-Mediated Mineralization. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Sep 10];23(23):15072. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39739803/>
132. Sekaran S, Selvaraj V, Thangavelu L. The Physiological and Pathological Role of Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase beyond Mineralization. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Jun 3];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34827562/>
133. Mornet E. Hypophosphatasia. *Metabolism* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Jun 3];82:142–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28939177/>
134. Yadav MC, Simão AMS, Narisawa S, Huesa C, McKee MD, Farquharson 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* [Internet]. 2011 Feb [cited 2023 May 28];26(2):286–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20684022/>
135. Huesa C, Houston D, Kiffer-Moreira T, Yadav MC, Luis Millan J, Farquharson C. The functional co-operativity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) and PHOSPHO1 during initiation of skeletal mineralization. *Biochem Biophys Reports*. 2015 Dec 1;4:196–201.
136. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabell LA, Coburn SP. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. 1985 [cited 2023 Jun 3];76(2):752–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4031070/>
137. Amadasi A, Bertoldi M, Contestabile R, Bettati S, Cellini B, Luigi di Salvo M, et al. Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr Med Chem* [Internet]. 2007 Apr 28 [cited 2023 Jun 3];14(12):1291–324. Available from:

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17504214/>
138. Narisawa S, Wennberg C, Millán JL. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol*. 2001;193(1):125–33.
139. Brun-Heath I, Ermonval M, Chabrol E, Xiao J, Palkovits M, Lyck R, 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):521–36.
140. Anstrom JA, Thore CR, Moody DM, Brown WR. Immunolocalization of tight junction proteins in blood vessels in human germinal matrix and cortex. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2023 Jun 3];127(2):205–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16957815/>
141. Fonta C, Barone P, Martinez LR, Négyessy L. Rediscovering TNAP in the Brain: A Major Role in Regulating the Function and Development of the Cerebral Cortex. *Subcell Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jun 3];76:85–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219708/>
142. Zimmermann H, Langer D. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in the Developing Brain and in Adult Neurogenesis. *Subcell Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jun 3];76:61–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219707/>
143. Demirbilek H, Alanay Y, Alikasıfoğlu A, Topçu M, Mornet E, Gönç N, et al. Hypophosphatasia presenting with pyridoxine-responsive seizures, hypercalcemia, and pseudotumor cerebri: case report. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jun 3];4(1):34–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22394703/>
144. Hofmann C, Liese J, Schwarz T, Kunzmann S, Wirbelauer J, Nowak J, et al. Compound heterozygosity of two functional null mutations in the ALPL gene associated with deleterious neurological outcome in an infant with hypophosphatasia. *Bone* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 3];55(1):150–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23454488/>
145. De Roo MGA, Abeling NGGM, Majoie CB, Bosch AM, Koelman JHTM, Cobben JM, et al. Infantile hypophosphatasia without bone deformities presenting with severe pyridoxine-resistant seizures. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2014 Mar [cited 2023 Jun 3];111(3):404–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24100244/>
146. Fukazawa M, Tezuka J, Sasazuki M, Masumoto N, Baba H, Doi T, et al. Infantile hypophosphatasia combined with vitamin B6-responsive seizures and reticular formation lesions on magnetic resonance imaging: A case report. *Brain Dev* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Jun 3];40(2):140–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802630/>
147. Nunes ML, Mugnol F, Bica I, Fiori RM. Pyridoxine-dependent seizures associated with

- hypophosphatasia in a newborn. *J Child Neurol* [Internet]. 2002 [cited 2023 Jun 3];17(3):222–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12026240/>
148. Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn an Off Publ Am Assoc Anat*. 1997 Mar;208(3):432–46.
149. Hanics J, Barna J, Xiao J, Millán JL, Fonta C, Négyessy L. Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2023 Jun 3];349(2):459–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22696173/>
150. Bossi M, Hoylaerts MF, Millan JL. Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 [cited 2023 Jun 3];268(34):25409–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8244974/>
151. Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, Oda K, et al. The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. *PLoS One* [Internet]. 2009 Aug 4 [cited 2023 Jun 3];4(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19652718/>
152. Cruz T, Gleizes M, Balayssac S, Mornet E, Marsal G, Millán JL, et al. Identification of altered brain metabolites associated with TNAP activity in a mouse model of hypophosphatasia using untargeted NMR-based metabolomics analysis. *J Neurochem* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2023 Jun 3];140(6):919–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28072448/>
153. Balasubramaniam S, Bowling F, Carpenter K, Earl J, Chaitow J, Pitt J, et al. Perinatal hypophosphatasia presenting as neonatal epileptic encephalopathy with abnormal neurotransmitter metabolism secondary to reduced co-factor pyridoxal-5'-phosphate availability. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jun 3];33 Suppl 3(SUPPL. 3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20049532/>
154. Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JAAM, Hardonk MJ, Meijer DKF. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am J Pathol* [Internet]. 1997 [cited 2023 Jun 3];151(4):1163–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9327750/>
155. Lei W, Ni H, Herington J, Reese J, Paria BC. Alkaline phosphatase protects lipopolysaccharide-induced early pregnancy defects in mice. *PLoS One*. 2015;10(4):1–20.
156. Fleisch H, Russell RGG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* [Internet]. 1966 [cited 2023 Jun 3];212(5065):901–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4306793/>

## BIBLIOGRAFÍA

157. Nitschke Y, Rutsch F. Inherited Arterial Calcification Syndromes: Etiologies and Treatment Concepts. *Curr Osteoporos Rep* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Jun 3];15(4):255–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28585220/>
158. O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2010 Jan [cited 2023 Jun 3];25(1):187–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19633093/>
159. Opdebeeck B, Neven E, Millán JL, Pinkerton AB, D'Haese PC, Verhulst A. Chronic Kidney Disease-Induced Arterial Media Calcification in Rats Prevented by Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Substrate Supplementation Rather Than Inhibition of the Enzyme. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Jun 3];13(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34452102/>
160. Romanelli F, Corbo AM, Salehi M, Yadav MC, Salman S, Petrosian D, et al. Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in endothelial cells accelerates coronary artery disease in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *PLoS One* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Jun 3];12(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29023576/>
161. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, Yadav MC, Nigro J, Wang W, et al. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 Jun 3];30(5):824–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25428889/>
162. Tani T, Fujiwara M, Orimo H, Shimizu A, Narisawa S, Pinkerton AB, et al. Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J Pathol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Jun 3];250(1):30–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31509234/>
163. Ziegler SG, Ferreira CR, Macfarlane EG, Riddle RC, Tomlinson RE, Chew EY, et al. Ectopic calcification in pseudoxanthoma elasticum responds to inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Sci Transl Med* [Internet]. 2017 Jun 7 [cited 2023 Jun 3];9(393). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28592560/>
164. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, Van Niekerk C, Smit A, Ferris WF, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jun 3];354(1–2):101–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748605/>
165. Ali AT, Penny CB, Paiker JE, Psaras G, Ikram F, Crowther NJ. The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue. *Ann Clin Biochem*. 2006 May;43(Pt 3):207–13.
166. Hernández-Mosqueira C, Velez-Delvalle C, Kuri-Harcuch W. Tissue alkaline

- phosphatase is involved in lipid metabolism and gene expression and secretion of adipokines in adipocytes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2015;1850(12):2485–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.014>
167. Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 1997 [cited 2023 May 15];107(3):183–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9105889/>
168. Suzuki N, Irie M, Iwata K, Nakane H, Yoshikane M, Koyama Y, et al. Altered expression of alkaline phosphatase (ALP) in the liver of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. *Hepatol Res* [Internet]. 2006 May [cited 2023 Jun 3];35(1):37–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16567122/>
169. Halling Linder C, Englund UH, Narisawa S, Millán JL, Magnusson P. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. *Bone*. 2013 Apr;53(2):399–408.
170. Hatoff DE, Hardison WGM. Bile acid-dependent secretion of alkaline phosphatase in rat bile. *Hepatology* [Internet]. 1982 [cited 2023 Aug 9];2(4):433S-439S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7095744/>
171. Iluz-Freundlich D, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. *Ann Hepatol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Jun 3];19(2):204–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628070/>
172. Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, Delle Monache M, Monterubbianesi R, Di Cosimo E, et al. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jun 3];32(2):174–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10915721/>
173. Chirambo GM, van Niekerk C, Crowther NJ. The role of alkaline phosphatase in intracellular lipid accumulation in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2023 Jun 3];102(2):224–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209522/>
174. Su RC, Lad A, Breidenbach JD, Blomquist TM, Gunning WT, Dube P, et al. Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the Leprdb/J mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PLoS One* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Jun 3];14(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31805072/>
175. Corbin KD, Zeisel SH. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Jun 3];28(2):159–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22134222/>
176. Bessueille L, Briolay A, Como J, Mebarek S, Mansouri C, Gleizes M, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone* [Internet].

## BIBLIOGRAFÍA

- 2020;133(February):115262. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115262>
177. Zywicki ME, Blohowiak SE, Magness RR, Segar JL, Kling PJ. Impact of the ovarian cycle and pregnancy on plasma chemistry values in ewes. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Jun 3];30(2):238–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29291683/>
178. Turan S, Topcu B, Gökçe I, Güran T, Atay Z, Omar A, 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* [Internet]. 2011 Mar [cited 2023 Jun 3];3(1):7–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21448327/>
179. Verma J, Gorard DA. Persistently elevated alkaline phosphatase. *BMJ Case Rep* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jun 3];2012. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922932/>
180. Magnusson P, Davie MWJ, Sharp CA. Circulating and tissue-derived isoforms of bone alkaline phosphatase in Paget's disease of bone. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 2010 [cited 2023 Jun 3];70(2):128–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20175736/>
181. Shankar S, Hosking DJ. Biochemical assessment of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 2007 Feb;22(SUPPL. 2).
182. Cole DEC, Thompson MD. Neurogenetic Aspects of Hyperphosphatasia in Mabry Syndrome. *Subcell Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jun 3];76:343–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26219719/>
183. McKiernan FE, Shrestha LK, Berg RL, Fuehrer J. Acute hypophosphatasemia. *Osteoporos Int* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 3];25(2):519–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23912555/>
184. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut*. 2009 Mar;58(3):379–87.
185. Ramasamy S, Nguyen DD, Eston MA, Alam SN, Moss AK, Ebrahimi F, et al. Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Feb;17(2):532–42.
186. Lukas M, Drastich P, Konecny M, Gionchetti P, Urban O, Cantoni F, et al. Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Jul;16(7):1180–6.
187. Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, 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):826–38.

188. Liu Y, Cavallaro PM, Kim B-M, Liu T, Wang H, Kühn F, et al. A role for intestinal alkaline phosphatase in preventing liver fibrosis. *Theranostics*. 2021;11(1):14–26.
189. Adiliaghdam F, Cavallaro P, Mohad V, Almpani M, Kühn F, Gharedaghi MH, et al. Targeting the gut to prevent sepsis from a cutaneous burn. *JCI insight*. 2020 Oct;5(19).
190. Hamarneh SR, Kim B-M, Kaliannan K, Morrison SA, Tantillo TJ, Tao Q, et al. Intestinal Alkaline Phosphatase Attenuates Alcohol-Induced Hepatosteatosis in Mice. *Dig Dis Sci*. 2017 Aug;62(8):2021–34.
191. Wang W, Chen S-W, Zhu J, Zuo S, Ma Y-Y, Chen Z-Y, et al. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the translocation of bacteria of gut-origin in mice with peritonitis: mechanism of action. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124835.
192. Plaeke P, De Man JG, Smet A, Malhotra-Kumar S, Pintelon I, Timmermans J-P, et al. Effects of intestinal alkaline phosphatase on intestinal barrier function in a cecal ligation and puncture (CLP)-induced mouse model for sepsis. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2020 Mar;32(3):e13754.
193. Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr;110(17):7003–8.
194. Kats S, Brands R, Hamad MAS, Seinen W, Scharnhorst V, Wulkan RW, et al. Prophylactic treatment with alkaline phosphatase in cardiac surgery induces endogenous alkaline phosphatase release. *Int J Artif Organs*. 2012 Feb;35(2):144–51.
195. Heemskerk S, Masereeuw R, Moesker O, Bouw MPWJM, van der Hoeven JG, Peters WHM, et al. Alkaline phosphatase treatment improves renal function in severe sepsis or septic shock patients. *Crit Care Med*. 2009 Feb;37(2):417–23, e1.
196. Peters E, Schirris T, van Asbeck AH, Gerretsen J, Eymael J, Ashikov A, et al. Effects of a human recombinant alkaline phosphatase during impaired mitochondrial function in human renal proximal tubule epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2017 Feb;796:149–57.
197. Peters E, Geraci S, Heemskerk S, Wilmer MJ, Bilos A, Kraenzlin B, et al. Alkaline phosphatase protects against renal inflammation through dephosphorylation of lipopolysaccharide and adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol*. 2015;172(20):4932–45.
198. Pickkers P, Heemskerk S, Schouten J, Laterre P-F, Vincent J-L, Beishuizen A, et al. Alkaline phosphatase for treatment of sepsis-induced acute kidney injury: a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial. *Crit Care*. 2012 Jan;16(1):R14.
199. Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med*. 2012 Mar;366(10):904–13.

## BIBLIOGRAFÍA

200. Whyte MP, Rockman-Greenberg C, Ozono K, Riese R, Moseley S, Melian A, et al. Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jan;101(1):334–42.
201. Whyte MP, Madson KL, Phillips D, Reeves AL, McAlister WH, Yakimoski A, et al. Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia. *JCI insight.* 2016 Jun;1(9):e85971.
202. Kishnani PS, Rockman-Greenberg C, Rauch F, Bhatti MT, Moseley S, Denker AE, et al. Five-year efficacy and safety of asfotase alfa therapy for adults and adolescents with hypophosphatasia. *Bone.* 2019 Apr;121:149–62.
203. Whyte MP, Simmons JH, Moseley S, Fujita KP, Bishop N, Salman NJ, et al. Asfotase alfa for infants and young children with hypophosphatasia: 7 year outcomes of a single-arm, open-label, phase 2 extension trial. *lancet Diabetes Endocrinol.* 2019 Feb;7(2):93–105.
204. Sanitarios AE de M y P. Informe de Posicionamiento Terapéutico de asfotasa alfa ( Strensiq® ) en hipofosfatasa de inicio pediátrico. 2017;1–6.
205. Scott LJ. Asfotase Alfa in Perinatal/Infantile-Onset and Juvenile-Onset Hypophosphatasia: A Guide to Its Use in the USA. *BioDrugs.* 2016 Feb;30(1):41–8.
206. Narisawa S. Genetically Modified Mice for Studying TNAP Function. *Subcell Biochem.* 2015;76:45–57.
207. Leser TD, Mølbak L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol [Internet].* 2009 Sep 1 [cited 2023 May 14];11(9):2194–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x>
208. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci [Internet].* 2013 Feb [cited 2023 May 14];70(4):631–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22782113/>
209. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. 2020 [cited 2023 May 14]; Available from: <https://doi.org/10.1111/asj.13357>
210. Ho S, Pothoulakis C, Wai Koon H. Antimicrobial peptides and colitis. *Curr Pharm Des [Internet].* 2013 Dec 19 [cited 2023 May 14];19(1):40–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22950497/>
211. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, et al. Microbiome and Host Interactions: Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol [Internet].* 2017 Mar 3 [cited 2023 May 14];312(3):G171. Available from: [/pmc/articles/PMC5440615/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28154461/)



212. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue barriers* [Internet]. 2017 Oct 2 [cited 2023 May 14];5(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28956703/>
213. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2023 May 14];16(9):1583–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20803699/>
214. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 May 14];20(1):166–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23974993/>
215. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Feb;288(2):E462-8.
216. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun;332(6037):1519–23.
217. Powell EE, Wong VWS, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet* [Internet]. 2021;397(10290):2212–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
218. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 May 14];21(5):739–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25955209/>
219. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* [Internet]. 2009 [cited 2023 May 14];50(3):772–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19650159/>
220. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 May 14];24(7):908–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29967350/>
221. Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 May 14];16(6):377–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31024089/>
222. De Munck TJI, Xu P, Verwijs HJA, Masclee AAM, Jonkers D, Verbeek J, et al. Intestinal permeability in human nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 May 14];40(12):2906–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33037768/>

## BIBLIOGRAFÍA

223. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 Aug 9];57(2):601–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.26093>
224. Chen X, Zhang Z, Li H, Zhao J, Wei X, Lin W, et al. Endogenous ethanol produced by intestinal bacteria induces mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Aug 9];35(11):2009–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150306/>
225. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: Implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2023 Aug 9];119(5):1340–7. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508500202357/fulltext>
226. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab*. 2017 May;25(5):1054-1062.e5.
227. Caussy C, Tripathi A, Humphrey G, Bassirian S, Singh S, Faulkner C, et al. A gut microbiome signature for cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2019 Mar;10(1):1406.
228. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Nov 19 [cited 2023 Jun 3];361(21):2066–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19923578/>
229. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* (London, England). 2007 May;369(9573):1627–40.
230. Ballester Ferré MP, Boscá-Watts MM, Mínguez Pérez M. Crohn's disease. *Med Clínica* (English Ed [Internet]). 2018 Jul 13 [cited 2023 Jun 3];151(1):26–33. Available from: <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-clinica-english-edition--462-articulo-crohn39s-disease-S2387020618301979>
231. Kelly JK, Siu TO. The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 1986 [cited 2023 May 7];8(5):594–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3782760/>
232. Lohsiriwat V, Clark SK. Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course. *Dis Colon Rectum* [Internet]. 2008 Dec [cited 2023 May 7];51(12):1795–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18626712/>
233. Brahme F, Lindström C. A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 1970 [cited 2023 Jun 3];11(11):928–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5492249/>

234. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jun 4];142(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22001864/>
235. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2017 Dec 23 [cited 2023 Jun 4];390(10114):2769–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29050646/>
236. Kaplan GG, Bernstein CN, Coward S, Bitton A, Murthy SK, Nguyen GC, et al. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Epidemiology. *J Can Assoc Gastroenterol* [Internet]. 2019 Feb 2 [cited 2023 Jun 4];2(Suppl 1):S6–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31294381/>
237. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2023 Jun 4];12(12):720–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26323879/>
238. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van Den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 Jun 4];17(1):423–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20564651/>
239. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2001 Jun 16 [cited 2023 Jun 4];357(9272):1925–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11425413/>
240. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* [Internet]. 2001 May 31 [cited 2023 Jun 4];411(6837):603–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385577/>
241. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* [Internet]. 2001 May 31 [cited 2023 Jun 4];411(6837):599–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385576/>
242. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2023 Jun 4];491(7422):119–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23128233/>
243. Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association

## BIBLIOGRAFÍA

- analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Aug 27 [cited 2023 Jun 4];47(9):979–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26192919/>
244. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 16 [cited 2023 Jun 4];474(7351):307–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677747/>
245. Prideaux L, Kang S, Wagner J, Buckley M, Mahar JE, De Cruz P, et al. Impact of ethnicity, geography, and disease on the microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Jun 4];19(13):2906–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24240708/>
246. De Cruz P, Prideaux L, Wagner J, Ng SC, McSweeney C, Kirkwood C, et al. Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2012 Feb [cited 2023 Jun 4];18(2):372–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21604329/>
247. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29285689/>
248. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jun 4];146(6):1489–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24560869/>
249. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 Mar 12 [cited 2023 Jun 4];15(3):382–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24629344/>
250. De Cruz P, Kang S, Wagner J, Buckley M, Sim WH, Prideaux L, et al. Association between specific mucosa-associated microbiota in Crohn's disease at the time of resection and subsequent disease recurrence: a pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];30(2):268–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25087692/>
251. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Jul [cited 2023 Jun 4];101(7):1559–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16863561/>
252. Frolkis A, Dieleman LA, Barkema HW, Panaccione R, Ghosh S, Fedorak RN, et al. Environment and the inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 4];27(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23516681/>
253. Probert CSJ, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiological study of

- ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* [Internet]. 1992 [cited 2023 Jun 4];33(5):687–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1307684/>
254. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* [Internet]. 1989 Dec [cited 2023 Jun 4];34(12):1841–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2598752/>
255. Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-blades B. Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1994 Aug 1 [cited 2023 Jun 4];140(3):268–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8030630/>
256. Meyer AM, Ramzan NN, Heigh RI, Leighton JA. Relapse of inflammatory bowel disease associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2006 Jan [cited 2023 Jun 4];51(1):168–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16416231/>
257. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekborn A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Mar 15 [cited 2023 Jun 4];344(11):808–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11248156/>
258. Hart A, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Bergmann MM, Boeing H, et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 Jun 4];58(12):1606–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19628674/>
259. Jantchou P, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Jun 4];105(10):2195–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20461067/>
260. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer R-JM. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2023 Jun 4];95(4):1008–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10763951/>
261. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, De Silva P, Korzenik JR, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jun 4];145(5):970–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23912083/>
262. Nitescu M, Istratescu D, Preda CM, Manuc TE, Louis E, Manuc M, et al. Role of an Exclusion Diet (Reduced Disaccharides, Saturated Fats, Emulsifiers, Red and Ultra-processed Meats) in Maintaining the Remission of Chronic Inflammatory Bowel

## BIBLIOGRAFÍA

- Diseases in Adults. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Jun 4];59(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36837530/>
263. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 1999 [cited 2023 May 14];116(2):301–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9922310/>
264. Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1993 Jun 5 [cited 2023 May 14];341(8858):1437–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8099141/>
265. D'Inca R, De Leo V, Corrao G, Martines D, D'Odorico A, Mestriner C, et al. Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 1999 Oct [cited 2023 May 14];94(10):2956–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10520851/>
266. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* [Internet]. 1986 [cited 2023 May 14];105(6):883–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3777713/>
267. Turpin W, Lee SH, Raygoza Garay JA, Madsen KL, Meddings JB, Bedrani L, et al. Increased Intestinal Permeability Is Associated With Later Development of Crohn's Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 May 14];159(6):2092-2100.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32791132/>
268. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015 Jan 31 [cited 2023 May 14];1(2):241–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26000334/>
269. Iwaya H, Maeta K, Hara H, Ishizuka S. Mucosal permeability is an intrinsic factor in susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2012 Apr [cited 2023 May 14];237(4):451–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22522346/>
270. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2023 May 14];140(1):12–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17418867/>
271. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* [Internet]. 1999 [cited 2023 May 14];48(3):137–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10480018/>
272. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-

- induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 14];104(SUPPL.104). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24510619/>
273. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel A V., Knight SC, et al. Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2005 Jul 1;129(1):50–65.
274. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* [Internet]. 2005 Feb [cited 2023 Jun 6];54(2):228. Available from: [/pmc/articles/PMC1774844/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1574844/)
275. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Jan 8 [cited 2023 Jun 6];99(1):351–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11773639/>
276. Papadakis KA, Zhu D, Prehn JL, Landers C, Avanesyan A, Lafkas G, et al. Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 2005 Apr 15 [cited 2023 Jun 6];174(8):4985–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15814728/>
277. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* [Internet]. 2004 May [cited 2023 Jun 6];53(5):678–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15082586/>
278. Van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, et al. Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2023 Jun 6];124(5):1420–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12730881/>
279. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's Disease T Cells to Multiple Apoptotic Signals Is Associated with a Bcl-2/Bax Mucosal Imbalance. *J Immunol* [Internet]. 1999 [cited 2023 Jun 6];163(2):1081–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10395708/>
280. Van den Brande JMH, Braat H, Van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2023 Jun 6];124(7):1774–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12806611/>
281. Iacomino G, Rotondi Aufiero V, Iannaccone N, Melina R, Giardullo N, De Chiara G, et al. IBD: Role of intestinal compartments in the mucosal immune response. *Immunobiology* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Jun 6];225(1). Available from:

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31563276/>
282. Silva FAR, Rodrigues BL, Ayrizono MDLS, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2016 [cited 2023 Jun 6];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28070181/>
283. Tindemans I, Joosse ME, Samsom JN. Dissecting the Heterogeneity in T-Cell Mediated Inflammation in IBD. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 2 [cited 2023 Jun 6];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906479/>
284. El Marjou F, Janssen KP, Chang BHJ, Li M, Hindie V, Chan L, et al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* [Internet]. 2004 [cited 2023 Sep 20];39(3):186–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282745/>
285. Koc H, Mar MH, Ranasinghe A, Swenberg JA, Zeisel SH. Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 2002 Sep 15 [cited 2023 Sep 2];74(18):4734–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12349977/>
286. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner* [Internet]. 1994 [cited 2023 Aug 6];27(1):57–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7849547/>
287. Merry TL, Tran M, Dodd GT, Mangiafico SP, Wiede F, Kaur S, et al. Hepatocyte glutathione peroxidase-1 deficiency improves hepatic glucose metabolism and decreases steatohepatitis in mice. *Diabetologia* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 May 21];59(12):2632–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27628106/>
288. Wang W, Liu X, Wei P, Ye F, Chen Y, Shi L, et al. SPP1 and CXCL9 Promote Non-alcoholic Steatohepatitis Progression Based on Bioinformatics Analysis and Experimental Studies. *Front Med* [Internet]. 2022 Apr 19 [cited 2023 May 21];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35514751/>
289. Willebrords J, Maes M, Pereira IVA, da Silva TC, Govoni VM, Lopes VV, et al. Protective effect of genetic deletion of pannexin1 in experimental mouse models of acute and chronic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 May 21];1864(3):819–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29246445/>
290. Zhang M, Zhao Y, Li Z, Wang C. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 mediates lipogenesis and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):582–6.
291. Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Cosić A, et al. Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2018 Jun 1



- [cited 2023 May 27];47(2):827–41. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807366/>
292. Briolay A, Bessueille L, Magne D. TNAP: A new multitask enzyme in energy metabolism. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
293. Pandak WM, Kakiyama G. The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway. *Liver Res*. 2019 Jun 1;3(2):88–98.
294. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, et al. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res* [Internet]. 2006 Oct [cited 2023 Jun 18];47(10):2280–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829692/>
295. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, De Almeida TP, Boursier J, Bohnic B, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2023 Jun 18];10(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26017539/>
296. Alshawsh MA, Alsalahi A, Alshehade SA, Saghir SAM, Ahmeda AF, Zarzour RH AI, et al. A Comparison of the Gene Expression Profiles of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease between Animal Models of a High-Fat Diet and Methionine-Choline-Deficient Diet. *Molecules* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Sep 18];27(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35164140/>
297. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 [cited 2023 Jul 4];111(2):225–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12531878/>
298. Nair MG, Guild KJ, Du Y, Zaph C, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2023 Jul 4];181(7):4709–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18802073/>
299. McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TMH, Kierstein S, Shin ME, Lehrke M, et al. Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2023 Jul 4];116(11):2914–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17024245/>
300. Krimi RB, Kotelevets L, Dubuquoy L, Plaisancié P, Walker F, Lehy T, et al. Resistin-like molecule beta regulates intestinal mucous secretion and curtails TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2008 Jul [cited 2023 Jul 4];14(7):931–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18300276/>
301. Okubo H, Kushiyaama A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, et al. Involvement of resistin-like molecule  $\beta$  in the development of methionine-choline deficient diet-induced

## BIBLIOGRAFÍA

- non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jan 28 [cited 2023 Jul 4];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4730188/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2641188/)
302. Burgess SC, Hausler N, Merritt M, Jeffrey FMH, Storey C, Milde A, et al. Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Nov 19 [cited 2023 Jul 4];279(47):48941–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15347677/>
303. Jha P, Knopf A, Koefeler H, Mueller M, Lackner C, Hoefler G, et al. Role of adipose tissue in methionine–choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 4];1842(7):959. Available from: [/pmc/articles/PMC4034162/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/244162/)
304. Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa JP, Sydor S, Best J, Schlattjan M, et al. Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2013 Apr [cited 2023 Jul 4];57(4):1394–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23299969/>
305. Guillén N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbonés-Mainar JM, Acín S, et al. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Jul 4];37(3):187–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19258494/>
306. Setchell KDR, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Nov 11 [cited 2023 Sep 23];102(9):1690. Available from: [/pmc/articles/PMC509117/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10509117/)
307. Ueki I, Kimura A, Nishiyori A, Chen HL, Takei H, Nittono H, et al. Neonatal cholestatic liver disease in an Asian patient with a homozygous mutation in the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2008 Apr [cited 2023 Sep 23];46(4):465–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18367963/>
308. Asghari A, Ishikawa T, Hiramitsu S, Lee WR, Umetani J, Bui L, et al. 27-Hydroxycholesterol Promotes Adiposity and Mimics Adipogenic Diet-Induced Inflammatory Signaling. *Endocrinology* [Internet]. 2019 Aug 6 [cited 2023 Sep 23];160(10):2485–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31386147/>
309. Kastrinou Lampou V, Poller B, Huth F, Fischer A, Kullak-Ublick GA, Arand M, et al. Novel insights into bile acid detoxification via CYP, UGT and SULT enzymes. *Toxicol Vitro*. 2023 Mar 1;87:105533.
310. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Role of AMPK. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*

- [Internet]. 2016 [cited 2023 Jul 5];311(4):E730–40. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00225.2016>
311. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017 192 [Internet]. 2017 Oct 4 [cited 2023 Jul 5];19(2):121–35. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.95>
312. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 2011 1212 [Internet]. 2011 Oct 12 [cited 2023 Sep 23];12(12):1159–66. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.2156>
313. Graser S, Liedtke D, Jakob F. Tnap as a new player in chronic inflammatory conditions and metabolism. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):1–14.
314. Peng Z, Fernandez P, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Chan ESL, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis. *FASEB J* [Internet]. 2008 Jul [cited 2023 Jul 7];22(7):2263–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18263696/>
315. Sherriff JL, O'Sullivan TA, Properzi C, Oddo JL, Adams LA. Choline, Its Potential Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and the Case for Human and Bacterial Genes. *Adv Nutr* [Internet]. 2016 [cited 2023 Sep 23];7(1):5. Available from: </pmc/articles/PMC4717871/>
316. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman S V., et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jun 29 [cited 2023 Sep 13];4(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19562033/>
317. Kalla R, Kennedy NA, Ventham NT, Boyapati RK, Adams AT, Nimmo ER, et al. Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Sep 14];111(12):1796–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27596694/>
318. Seeger D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2023 Sep 14];48(3):326–32. Available from: <https://gut.bmj.com/content/48/3/326>
319. Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, et al. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 24 [cited 2023 Sep 14];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24662742/>
320. Suenae P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Assche G Van, et al. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2002 Aug [cited 2023 Sep 14];97(8):2000–4. Available from:

## BIBLIOGRAFÍA

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12190167/>
321. Mitsuyama K, Tsuruta O, Tomiyasu N, Takaki K, Suzuki A, Masuda J, et al. Increased circulating concentrations of growth-related oncogene (GRO)-alpha in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2006 Jan [cited 2023 Sep 14];51(1):173–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16416232/>
322. Khan WI, Motomura Y, Wang H, El-Sharkawy RT, Verdu EF, Verma-Gandhu M, et al. Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2023 Sep 14];291(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728728/>
323. Yu S, Balasubramanian I, Laubitz D, Tong K, Bandyopadhyay S, Lin X, et al. Paneth cell-derived lysozyme defines the composition of mucolytic microbiota and the inflammatory tone of the intestine. *Immunity* [Internet]. 2020 Aug 8 [cited 2023 Sep 14];53(2):398. Available from: </pmc/articles/PMC7461615/>
324. Hoffmann W. Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Links to Inflammation: A Re-evaluation and New Medical Perspectives. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Sep 14];22(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066339/>
325. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang Y-H, Dong C. Regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *J Immunol* [Internet]. 2012 Nov 11 [cited 2023 Sep 24];189(9):4226. Available from: </pmc/articles/PMC3478486/>
326. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2023 Sep 24];35(4):611–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21982598/>
327. Swedik SM, Madola A, Cruz MA, Llorens-Bonilla BJ, Levine AD. Th17-Derived Cytokines Synergistically Enhance IL-17C Production by the Colonic Epithelium. *J Immunol* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Sep 24];209(9):1768–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36130829/>
328. Korbecki J, Szatkowska I, Kupnicka P, Żwieręto W, Barczak K, Poziomkowska-Gęśicka I, et al. The Importance of CXCL1 in the Physiological State and in Noncancer Diseases of the Oral Cavity and Abdominal Organs. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Sep 18];23(13). Available from: </pmc/articles/PMC9266754/>
329. Østvik AE, Granlund AVB, Bugge M, Nilsen NJ, Torp SH, Waldum HL, et al. Enhanced Expression of CXCL10 in Inflammatory Bowel Disease Potential Role of Mucosal Toll-like Receptor 3 Stimulation. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 Sep 18];19(2):265–74. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/ibd.23034>

## BIBLIOGRAFÍA