

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Programa Oficial de Posgrado en Biomedicina



**Estudio de la función inmunológica de la fosfatasa
alcalina no específica de tejido.**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

Cristina Hernández Chirlaque

Bajo la dirección de los Doctores

Olga Martínez Augustin

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Granada, 2017

Gf kqt<Wpkgtuk cf 'f g'I tpcfc0Vguku'F qevtcrpu"
Cwqtc<Etkukpc"J gtp^a pf gl 'Ej kncs wg
KUDP <, 9: /: 6/; 385/42; /4"
"WTKj wr <lj frj cpf rpgv326: 3 168753

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

En Granada a 7 de febrero de 2017

Director/es de la Tesis

Fdo.: Olga Martínez Augustin

Fdo.: Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Doctoranda.

Fdo.: Cristina Hernández Chirlaque

A mi familia

*“La ignorancia afirma
o niega rotundamente;
la Ciencia duda”.*

Voltaire

ÍNDICE

ÍNDICE

<i>A mi familia</i>	6
<i>“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la Ciencia duda”</i>	8
<i>Voltaire</i>	8
ÍNDICE	12
SUMMARY.....	19
1. INTRODUCTION	21
2. AIMS	22
3. MATERIALS AND METHODS	23
4. RESULTS AND DISCUSSION	23
5. CONCLUSIONS.....	25
INTRODUCCION	28
I. FOSFATASA ALCALINA.....	30
1. Generalidades.....	30
2. Genética.....	30
3. Estructura.....	34
4. Propiedades enzimáticas	36
5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)	37
6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)	39
7. Perspectivas en la utilización farmacológica de la AP	42
8. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina	44
9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP.....	45
II. SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	46
Linfocitos T	47

III. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	56
1. Generalidades.....	56
2. Etiología.....	60
3. Inmunología de la EII.....	65
4. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal	75
OBJETIVO.....	79
MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
1. REACTIVOS.....	85
2. EXPERIMENTOS IN VIVO.....	85
2.1. Animales de experimentación.....	85
2.2. Estimulación de células T <i>in vivo</i> mediante el anticuerpo anti-CD3 ϵ	86
2.3. Inducción de colitis por transferencia linfocitaria.....	86
2.4. Evaluación patológica de los modelos <i>in vivo</i>	88
3. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	91
3.1. Diseño experimental <i>ex vivo</i>	91
3.2. Cultivos primarios de células mononucleares.....	91
3.3. Purificación celular magnética	92
3.4. Ensayo de diferenciación de linfocitos T CD4 <i>naïve</i> hacia Th0, Th1, Th2 y Th17.....	93
3.5. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina triada	94
4. TÉCNICAS GENERALES	95
4.1. Determinación de la actividad y fosfatasa alcalina en distintos tejidos/células y actividad mieloperoxidasa en colon	95
4.2. Ensayo de toxicidad por lactato deshidrogenasa (LDH)	95

4.2. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular, en plasma y en homogenado de colon mediante ELISA y Multiplex® .	96
4.3.Extracción de ARN de linfocitos y secuenciación	96
4.4. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción	97
4.5. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	97
4.6. Citometría de flujo	97
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98
RESULTADOS	100
1. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN HETEROCITOGO PARA LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO	102
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	111
2.1 Implicación de la TNAP en la activación <i>in vivo</i> de linfocitos T	111
2.2 Importancia de la TNAP en el desarrollo de la colitis por transferencia linfocitaria.	117
3. ESTUDIOS <i>EX VIVO</i>	136
3.1 Estudio de la diferenciación de linfocitos T en células TNAP ^{P+/-}	136
3.2 Estudio de la TNAP en la proliferación de linfocitos T	138
DISCUSIÓN	142
CONCLUSIONES.....	156
CONCLUSIONS	160
ANEXOS	164
I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	166
II. ÍNDICE DE TABLAS	170
III. ÍNDICE DE IMÁGENES	172
IV. ÍNDICE DE FIGURAS	174

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
AGRADECIMIENTOS.....	205

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Alkaline phosphatases are a large family of enzymes distributed from bacteria to man that cleave phosphate moieties with release of inorganic phosphate at alkaline pH. There are four main alkaline phosphatase (AP) isoforms: the intestinal (IAP), the placental, and the germ cell isoforms, which are tissue-specific, plus the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), which is widely expressed. The TNAP gene in turn gives rise to three different enzyme variants that differ only in the glycosidic fraction, namely the liver, bone and kidney isoforms, which are predominantly found in these organs. The tissue specific AP forms are also glycosylated [1].

TNAP has been widely studied due to its involvement in various liver, bone and colonic disorders. Additionally, TNAP is known to be essential for the development of bone and teeth . Furthermore, TNAP has been shown to be crucial in axonal growth [2], neuron proliferation and differentiation [3]. These effects are related to regulation of purinergic signalling by way of ATP hydrolysis, which in turn is linked to the establishment of neuronal circuits [4]. Moreover, the production of adenosine by TNAP acting as a 5'-ectonucleotidase in the dorsal spinal cord is imperative in maintaining a good purinergic tone in nociceptive circuits [5]. On the other hand, new evidence points to a neurotoxic effect of TNAP, as it dephosphorylates hyperphosphorylated tau protein, a key player in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases [6].

In addition to the above, the *Alpl* gene encoding TNAP is highly expressed late in adipogenesis during adipose terminal differentiation in mice, being involved in lipid and energy metabolism of fat cells, and TNAP might regulate glucose metabolism and insulin sensitivity through adipokine synthesis and secretion [7].

The small intestine of the adult mouse is thought to express IAP, although the TNAP is transiently expressed in the fetal stage. In the last few years AP has drawn attention because of its protective anti-inflammatory role, when limiting bacterial translocation across the mucosal barrier, detoxifying lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria, thereby attenuating LPS-mediated toxicity and inflammation [8-10]. Several authors indicated that IAP is involved in the maintenance of normal gut microbial homeostasis, and could therefore have a therapeutic potential against disbiosis and pathogenic infections [9]. Of note, several human studies have also assessed the defensive role of AP. Administration

of AP has been associated with short-term improvement in disease activity scores in patients with ulcerative colitis [11].

On the other hand, two alkaline phosphatase isoforms, intestinal (IAP) and tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), are coexpressed in mouse colon, with the latter augmented in animal models of inflammatory bowel disease, and humans, as well [12]. This increase appears to arise both to the influx of leukocytes into the inflamed colonic tissue and to enhanced expression in epithelial cells [13-15]. Colonic epithelial cells express the liver type of TNAP in quiescent conditions but when under stress the pattern of glycosylation is altered, resulting in increased activity due to the shift to the bone or kidney isoforms [15].

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two idiopathic and major inflammatory diseases: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis. Both forms of IBD significantly impair quality of life, and require prolonged medical and/or surgical interventions. What makes it particularly challenging is its still unknown cause, its unpredictable presentations and symptoms, the less than optimal treatments, and a rise in its incidence and prevalence in many areas of the world. The inflammatory responses located in the intestinal area, oftenly course with an enhancement of a wide variety of proinflammatory cytokines and chemokines, as well as a stimulation of some signalling pathways that play a pivotal role driving the effects of different inflammatory soluble mediators.

Thus, TNAP is expressed in immune cells. In polymorphonuclear cells, the neutrophil alkaline phosphatase (NAP) is localized in secretory vesicles and it is relocalized to the cellular membrane following cell stimulation [16]. Moreover, TNAP is expressed in leukocytes, and it has a role in B cell differentiation into antibody-secreting cells [17, 18], in addition to its effects on adipokine production [7]. However, little is known about the role of TNAP in T cells [19].

2. AIMS

Based on all of the above, we set out to characterize the implication of tissue non-specific alkaline phosphatase in the activity, proliferation and differentiation of immune system cells, in particular T lymphocytes. For this purpose we use heterozygous TNAP mice and specific AP inhibitors. Moreover, to test whether tissue non-specific alkaline phosphatase expressed in T lymphocytes is involved in

the inflammatory response *in vivo*, a T cell activation acute model plus a T cell dependent transfer colitis model are used, the latter based on transferring *naïve* T cells from heterozygous TNAP mice to Rag1^{-/-} mice.

3. MATERIALS AND METHODS

To carry out the objective of the present thesis, we used C57BL/6 (B6.129S7-Akp2^{tm1Sor/J}) heterozygous mice for *Alpl* (referred to as TNAP^{+/-}), with WT littermates used as controls. Homozygous *Alpl* KO mice are not viable. A wide variety of techniques, including cellular culture techniques, qRT-PCR, magnetic cell separation and cell culture of primary cells for T cell study *in vitro*, histology techniques, flow cytometry, ELISA and Multiplex, proliferation assays, as well as different animal models for T cell study *in vivo*: T cell activation with anti-CD3 antibody and T cell transfer model of colitis.

4. RESULTS AND DISCUSSION

The phenotype of TNAP^{+/-} mice was perfectly normal, and they were indistinguishable from WT mice in terms of appearance and general behaviour. TNAP expression and AP activity were measured. The presence of a single *Alpl* allele simply results in a decrease of mRNA levels in all the tissues analysed, correlating with the same degree of reduction in AP activity in some but not all target tissues, so that there was no major loss of activity in any of the organs analyzed, with the exception of the kidney, which lost half of AP activity [20]. However, differential sensitivity to the specific AP inhibitor levamisole *in vitro* indicates that enzymatic characteristics are changed, possibly due to altered glycosylation, as the 3 TNAP isoforms differ precisely in the glycosylation pattern of the protein [14, 15].

In order to assess the role of TNAP in immune cell function, we studied the *ex vivo* response of WT vs. TNAP^{+/-} splenocytes to LPS and ConA, and T lymphocytes to ConA and anti-CD3 ϵ /anti-CD28. In terms of immune response, activation of immune cells resulted, in all cases, in an increased production of pro-inflammatory cytokines; IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-17A in the case of spleen cells, and TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-10 and IL-4 in lymphocytes. These differences were almost always significant.

Despite the attenuated response to stimulation of purified T cells from TNAP^{+/-} mice, no change in the capacity of Th0 cells for polarization was noted, as the *in vitro* polarization experiments yielded similar outcomes in the different T naïve cell polarization conditions towards Th1, Th2 or Th17. Rather, T cell proliferation was affected. Our results show that TNAP^{+/-} T cells exhibit a lower proliferative response to anti-CD3/anti-CD28, albeit not to ConA, perhaps owing to the stronger overall response in the former. In this experiment, AP activity was not significantly different in WT and TNAP^{+/-} cells, although AP activity in WT lymphocytes was levamisole sensitive, in contrast to that of TNAP^{+/-} cells.

Although basal mRNA levels and enzymatic activity, including sensitivity to levamisole inhibition, were comparable in T cells isolated from TNAP^{+/-} and WT mice, we found a differential response to stimulation *in vivo*, since TNAP was significantly induced in T cells of WT mice receiving anti-CD3 antibody, but not in those from TNAP^{+/-} mice. The shift in T cell function had significant consequences *in vivo*. Administration of anti-CD3 ϵ antibodies to mice results in both stimulation of T cells at short term with enhanced release of proinflammatory cytokines, a rapid depletion of blood T lymphocytes, and a long lasting immunosuppressant effect [21, 22]. In WT mice, this resulted in lymphopenia and marked mRNA upregulation of IFN- γ , IL-4, IL-5, and other cytokines. In contrast, TNAP^{+/-} mice exhibited an attenuated lymphopenia and cytokine production in plasma and splenocyte culture, consistent with reduced T cell activation and/or enhanced T cell depletion in this context.

Next, we test the hypothesis that TNAP expressed in T lymphocytes is involved in the inflammatory response *in vivo* in a model of chronic colitis, namely the adoptive T cell transfer model of colitis. Transfer of TNAP^{+/-} naïve T cells (naïve TNAP^{+/-} mice) resulted in colitis of reduced severity compared to naïve WT cells (naïve WT mice), particularly a lower degree of fibrosis. Moreover, naïve TNAP^{+/-} mice showed a reduced levels of colonic cytokine production (IFN- γ , TNF- α and IL-10, only significant for the former) and expression (significant for *Ifng* and *Il1b*) as well as a significantly reduced expression of the Th1 driving transcription factor T-bet, consistent with a lower activation of the adaptive immune system.

We further determined pro-inflammatory cytokine levels in plasma, IFN- γ being significantly reduced in TNAP^{+/-} colitic mice, and culture supernatants from splenocytes under LPS or ConA stimulation, where cytokine production was reduced by 31 and 40% for TNF- α (significant), and 57 and 13% for IFN- γ (non-significant), respectively. These observations were supported by PCR analysis of

gene expression, where mRNA levels of *Tnf*, *Ifng*, *Il10* and *Il17a* paralleled those of cytokine release, while T-bet expression showed a trend for downregulation. In addition, we examined different MLN T cell populations, namely CD4⁺Foxp3⁺ cells and CD4⁺IFN- γ ⁺ cells, by flow cytometry. The percentage of CD4⁺Foxp3⁺ cells, representative of Treg population, was increased in the naïve TNAP^{+/-} group in comparison with the naïve WT colitic group, consistent with a significant increase of IL-10 and Foxp3 mRNA levels assessed by RT-qPCR in these cells. Conversely, the percentage of CD4⁺IFN- γ ⁺ cells was reduced in the naïve TNAP^{+/-} group, although there was an increase in both colitic groups compared with the noncolitic groups, consistent with elevated plasma IFN- γ levels.

Our results do not allow us to establish the mechanism accounting for the phenotype of TNAP^{+/-} T lymphocytes. However, they indicate that activated T cells undergo a shift in TNAP expression, with increased activity and augmented sensitivity to levamisole, features that are attenuated in TNAP^{+/-} cells. The fact that treatment of WT T cells with 3 different AP inhibitors recapitulates the depressed cytokine production and proliferative response observed, as well as a levamisole-resistant TNAP in TNAP^{+/-} T lymphocytes, strongly suggests that levamisole-sensitive TNAP is required for full activation of T cells.

5. CONCLUSIONS

1. The lack of one *Alpl* allele generally affects enzyme sensitivity to the specific inhibitor levamisole in vitro without altering activity, as measured using p-nitrophenylphosphate as substrate, suggesting changes in glycosylation.
2. TNAP modulates T lymphocyte function, as evidenced by a diminished production and release of pro-inflammatory cytokines and a reduced proliferative response in anti-CD3/anti-CD28 activated TNAP^{+/-} T cells, which also exhibit an atypical expression of TNAP. TNAP dependent T cell function occurs also in vivo, including a milder T cell transfer colitis.
3. TNAP dependent effects on T cell proliferation are recapitulated by TNAP inhibitors, consistent with the requirement of levamisole-sensitive TNAP for full T cell activation. Such modulation of TNAP properties is attributable to changes in glycosylation, and opens up possible new strategies to modulate inflammation in the future.

INTRODUCCION

I. FOSFATASA ALCALINA

1. Generalidades

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

Aunque las principales características del mecanismo catalítico se conservan entre especies, cuando se comparan las APs de mamíferos y bacterias, se observa que las APs de mamíferos tienen mayor actividad específica, un mayor pH alcalino óptimo y una menor estabilidad al calor. Además, las APs de mamíferos se encuentran ancladas a la membrana y son inhibidas por L-amino ácidos y péptidos mediante un mecanismo incompetitivo [23]. La tabla 1 resume la nomenclatura, distribución tisular y localización cromosómica de las isoformas de AP en humano y ratón.

2. Genética

2.1. Genes de fosfatasa alcalina

En humanos, las isoenzimas de fosfatasa alcalina (AP) están codificadas por cuatro genes distintos designados según su localización mayoritaria (tabla 1). Tres isoformas son específicas de tejido; la intestinal (IAP codificada por *ALPI*), la placentaria (PLAP codificada por *ALPP*) y la de células germinales (GCAP codificada por *ALPPL2*). El cuarto gen, *ALPL*, codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), que como su nombre indica, se expresa en distintos tejidos, mayoritariamente en hígado, hueso y riñón [1].

Los genes que codifican las APs específicas de tejido en humano, *ALPP*, *ALPPL2* y *ALPI*, están íntimamente relacionados. Su estructura es prácticamente idéntica, conteniendo 11 exones interrumpidos por pequeños intrones en posiciones análogas, todo comprimido en menos de 5 kb de ADN genómico [24-26]. La similitud entre la estructura de las tres isoformas sugiere una evolución divergente ya que los tres *loci* (*ALPP*, *ALPPL2* y *ALPI*) están localizados en ese orden del centrómero al telómero en la misma región del brazo largo del cromosoma 2, bandas q34-q37 [27, 28].

Tabla 1. Resumen de la nomenclatura génica, nombre común, distribución tisular y localización cromosómica de las distintas isoformas de fosfatasa alcalina en humanos y ratones.

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

Por otro lado, el gen *ALPL* está localizado en el brazo corto del cromosoma 1. Su estructura supera los 50 kb y contiene 12 exones (esquema 1) [29, 30]. El exón 1 contiene secuencias 5' no transcritas y se compone del exón Ia y el exón Ib, que tienen inicio de transcripción alternativo, es decir, que los exones son incorporados al ARNm de forma excluyente al contener cada uno su propia secuencia promotora [29, 31]. Así, la transcripción del exón Ia está dirigida principalmente por un promotor activo en osteoblastos mientras que en el exón Ib está dirigida por un promotor distinto, activo en hígado y riñón [31, 32].



Esquema 1. Organización genómica del gen humano ALPL. En negro los exones y en gris las regiones 5' y 3' no transcritas [33].

En ratones, además del gen *Alpl* (*Akp2*), localizado en el cromosoma 4 [34], que codifica la TNAP, hay 4 *loci* más que codifican para AP en el cromosoma 1, el *locus Akp3* codifica la AP intestinal duodenal (dIAP) [35], *Akp5* codifica la AP embrionaria (EAP) [35], *Akp6* codifica la isoforma intestinal global (gIAP) [36] y por último el pseudogen no transcrito en el *locus Akp-ps1* [35].

Las moléculas de ARNm correspondientes a todas las isoformas en humano y ratón tienen una longitud de entre 2,4 y 3,0 kb y codifican péptidos de 518-535 aminoácidos. Además, no se han encontrado isoformas placentaria ni de células germinales en ratón, estableciendo a la IAP como la única AP específica de tejido [34, 37].

2.2 Expresión génica y factores de transcripción

La expresión de *Alpl* en ratón (o *Akp2*), que codifica la TNAP, está muy extendida durante el desarrollo, incluso se le ha propuesto que puede ejercer un papel en el mantenimiento del estado indiferenciado de células madres embrionarias [38]. La expresión de *Alpl* se puede observar en diferentes tejidos, como el tubo neural y el cerebro (en distintos estadios del desarrollo embrionario del ratón) [39, 40], las células endoteliales, túbulos renales, el canalículo biliar en el hígado [41] y de forma predominante en el tejido óseo, cartílago y dientes [41]. También hay evidencias claras de que se expresa en distintos tipos celulares del cerebro [42, 43]. En las neuronas de ratón parece que se expresa *Alpl* bajo el

promotor del exón Ib (tipo hígado), mientras que en humanos el transcrito de *ALPL* contiene el exón Ia o tipo hueso [44]. Por otro lado, nuestro grupo de investigación, y otros, han puesto de manifiesto la presencia de TNAP a nivel colónico [14], que es secretada por los colonocitos en partículas tipo surfactante (*surfactant-like particles*, SLPs), disminuyendo la tensión superficial [45, 46].

Diversos estudios usando distintos agentes han puesto en evidencia que la modulación de la actividad TNAP puede deberse a procesos transcripcionales así como postrcripcionales [47]. La transcripción de la TNAP mediante el promotor Ia puede estar regulada por dexametasona, ácido retinoico y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) [48, 49]. Además, se ha observado que en ratón los tejidos que no expresan TNAP hipermetilan el promotor Ia *in vivo*, reprimiendo su expresión [50]. Por otro lado, el promotor Ib es activado por dexametasona [51], dibutilil AMP cíclico y el ácido holo-trans-retinoico [52, 53]. También se han identificado varios factores de transcripción implicados en la regulación de TNAP: FKHR (*forkhead box O1*) [54], Sp3 (activador en células hematopoyéticas) [55] y dos miembros de la familia Smad; Smad 1 que inhibe el promotor de TNAP y Smad 3 que activa la expresión de TNAP y la mineralización en líneas celulares osteoblásticas [56, 57].

La AP embrionaria de ratón (EAP) [35], codificada por el gen *Akp5*, se expresa en el estadio embrionario blastocisto en niveles 10 veces superiores a la expresión de *Akp2* en el mismo estadio [58]. En el estado adulto se expresa en los testículos y el intestino. En el feto humano es la isoenzima de AP de células germinales (GCAP), y no la TNAP como en ratón, la que expresan las células primordiales germinales migratorias y las gónadas fetales [59], aunque todavía no se ha establecido si las células embrionarias germinales expresan la GCAP. También se encuentra en testículos, pulmón, cervix y timo [60, 61].

La AP placentaria (PLAP) se expresa en gran cantidad en los sincitiotrofoblastos de la placenta sobre la semana ocho de gestación y a lo largo del resto del embarazo [62]. Se cree que está involucrada en la transferencia de la IgG materna al feto [63]. Por otro lado es una de las primeras proteínas expresadas por células cancerosas, de forma ectópica [64].

Por último la AP intestinal (IAP), que como su nombre indica, se expresa en el intestino delgado de muchas especies. Los ratones coexpresan *Akp3*, *Akp5* y *Akp6* en el intestino, aunque *Akp3* es expresada justo antes del destete en el duodeno, mientras que *Akp5* y *Akp6* se expresan en todo el intestino desde el nacimiento y

aumentan su expresión tras el destete [36]. Distintos componentes dietéticos, como la pimienta, la capsaicina [65], el zinc [66], el calcio libre [67], el fosfato esterificado [68] y factores de crecimiento y hormonales como el calcitriol [69], la cortisona sola o con tiroxina [70] son capaces de estimular la actividad IAP. Uno de los principales factores de transcripción para la expresión génica de IAP es el factor KLF4 (*gut-enriched Kruppel-like*). En 2005 Alkhoury y col. identificaron dos factores de transcripción intestinales: Cdx1 que activa el gen IAP mientras que Cdx2 inhibe el efecto de Cdx1 [71]. Además, el inhibidor de la desacetilación de histonas butirato regula epigenéticamente la expresión génica de la IAP potenciando la unión del factor KLF5 al promotor [72], acción que por otro lado las citoquinas IL-1 β y TNF- α impiden [73].

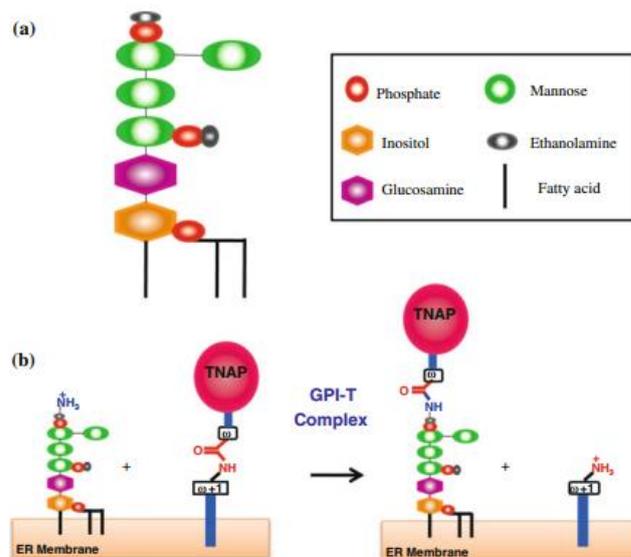
3. Estructura

Durante mucho tiempo la estructura cristalográfica de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* (ECAP) ha sido la única fuente de información de la estructura de las APs, sin embargo, en 2001 Le Du y col. consiguieron la primera estructura tridimensional de una AP mamífera, la AP placentaria (PLAP; 1EW2; Protein Data Bank) [74]. El núcleo central, muy similar al de ECAP, consta de una hoja β extendida y α -hélices rodeando. En general, la estructura de la PLAP es dimerica, donde cada monómero consta de 484 residuos, cuatro átomos metálicos y un ión fosfato, así como una molécula de agua. La superficie de la proteína tan solo conserva un 8% de los residuos en común con la ECAP. Además, en el centro activo solo los residuos esenciales para la catálisis están preservados: la serina catalítica, los tres sitios de los metales iónicos, M1 (ocupado por Zn²⁺ o Zn1), M2 (ocupado por Zn2) y M3 (ocupado por Mg²⁺). Brevemente, el Zn²⁺ de M1 activa la serina catalítica, formando el intermediario fosfoserina, que será hidrolizado por una molécula de agua activada por el Zn2 de M2. El grupo fosfato será entonces liberado o transferido a un aceptor [75]. El Mg²⁺ del sitio M3 estabiliza la fracción de fosfato transferida en el estado de transición [76]. Asimismo, hay un sitio de unión no catalítico, M4, que contiene un metal, Ca²⁺. La localización de este ión Ca²⁺ en el bucle sugiere una función relacionada con la estabilidad conformacional de las dos α -hélices de las zonas periféricas.

Las diferentes isoformas específicas de tejido, PLAP, GCAP e IAP, presentan una homología entre el 90-98%, mientras la TNAP tan solo se parece en un 50% a las otras tres.

La fracción N-terminal de uno de los monómeros envuelve el segundo monómero confiriendo propiedades alostéricas al dímero de fosfatasa alcalina. Por otro lado, el dominio flexible que queda en la parte superior de la AP, “dominio corona”, contiene residuos importantes para la estabilización de los inhibidores de AP (como E429 e Y367 [23, 77]) y determina las propiedades específicas de la isoenzima, como la estabilidad al calor o la unión a colágeno[78, 79]. La presencia de cadenas de carbohidrato no parece ser un impedimento para la actividad catalítica en las isoenzimas de AP específicas de tejido, sin embargo, si tienen mucha importancia para la TNAP. Las isoformas hueso, hígado y riñón de TNAP contienen la misma secuencia de aminoácidos (507), aunque su ARNm sea distinto al contener el exón I (no codificante) diferente (Ia en hueso y Ib para hígado y riñón), pero difieren en las modificaciones de glicosilación postraduccionales [80]. La secuencia de ADNc de *ALPL* sugiere la presencia de 5 sitios de N-glicosilación. Además, la TNAP parece estar O-glucosilada en hueso pero no en hígado. De hecho, estas diferencias de glicosilación afectan a la actividad catalítica de las isoformas.[81].

Finalmente, mientras la AP de *Escherichia coli* se localiza en el espacio periplásmico bacteriano, todas las APs mamíferas se encuentran ancladas a la membrana plasmática mediante un glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en cada monómero [82]. El GPI está formado por un grupo fosfatidilinositol unido a etanolamina mediante carbohidratos (glucosamina y manosa unidas mediante enlace glucosídico al inositol). La cadena nascente de AP se unirá por su C-terminal al GPI mediante transaminación (esquema 2). Los ácidos grasos del GPI anclan la proteína a la membrana [83].



Esquema 2. Representación del anclaje de la AP con la molécula GPI.

(a) Estructura del GPI. (b) Reacción de transaminación que reemplaza el C-terminal de la AP con el GPI de la membrana [83].

4. Propiedades enzimáticas

4.1. Especificidad de sustratos

Las APs de mamíferos tienen un amplio espectro de sustratos específicos y son capaces de hidrolizar o transfosforilar una amplia variedad de compuestos fosforilados *in vitro*. Sin embargo, solo unos pocos compuestos han sido confirmados como sustratos naturales en algunas isoenzimas de AP [10].

Uno de los principales sustratos de la TNAP es el P_{Pi} presente en las vesículas de la matriz ósea, y que actúa como inhibidor de la mineralización ósea, formando P_i necesario para la cristalización de la hidroxiapatita y el crecimiento óseo. A nivel renal, también tiene como sustrato el inhibidor de la mineralización P_{Pi}, estando por tanto involucrada en la ratio P_i/P_{Pi} renal que puede llevar a calcificación renal.

Otro de los sustratos importantes de TNAP es el piridoxal-5'-fosfato (PLP) presente en leucocitos [84] y en sangre periférica [82]. La TNAP actuaría como ectoenzima regulando los niveles extracelulares de PLP y permitiendo el acceso de la forma desfosforilada al SNC para la formación de neurotransmisores [85].

Además, las APs parecen estar involucradas en el metabolismo de nucleótidos, la TNAP de osteocitos es capaz de hidrolizar ATP, ADP, AMP, glucosa-1 fosfato, glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, β-glicerolfosfato y bis-(*p*-nitrofenil)fosfato, así como el *p*-nitrofenilfosfato [86]. Además, la TNAP en ratón, junto a la fosfatasa ácida prostática y la 5-ecto nucleotidasa, es una de las enzimas que genera adenosina desde AMP, con sus implicaciones a nivel del sistema nervioso [5] e inmunológico [87, 88].

Por último, IAP y TNAP son capaces de hidrolizar el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y otros componentes bacterianos a nivel intestinal, hepático [89] y renal [90].

4.2. Inhibición enzimática

Desde los años 60 se han descubierto numerosos inhibidores de las distintas isoformas de AP. Incluyen L-aminoácidos como L-fenilalanina, L-triptófano, L-leucina y L-homoarginina, así como otros compuestos no relacionados como levamisol (L-tetramisol) y teofilina (derivado 1,3-dimetil xantina). La inhibición es de tipo acompetitiva, poco frecuente. El sitio exacto de unión y el mecanismo preciso de inhibición tan solo han sido dilucidados para L-fenilalanina y L-leucina en el sitio activo de la PLAP. Por otro lado se ha visto que la teofilina puede actuar como inhibidor acompetitivo pero también inhibiendo el sustrato, cuando éste se encuentra a concentraciones altas [91, 92]. Además, hay que tener en cuenta que la

teofilina aumenta la concentración intracelular de AMPc [93], lo que desencadenará un efecto adicional sobre la activación y proliferación de células T pudiendo cambiar el perfil de inhibición [94].

Entre los L-aminoácidos, L-homoarginina (L-hArg) es un inhibidor específico de la TNAP [95] (30 veces más eficiente que para PLAP), mientras que L-fenilalanina (L-Phe) inhibe 25 veces mejor la PLAP y la IAP [96] que la TNAP [97]. Levamisol es un potente inhibidor de TNAP, alrededor de 100 veces más efectivo que L-hArg, al igual que teofilina, ambos mejor inhibidores de TNAP que de PLAP.

4.3. Termoestabilidad

La IAP y la TNAP son inactivadas rápidamente a temperaturas superiores a 65 °C, entre ellas la IAP es más termoestable que la TNAP. Se ha visto que en plasma, entre las isoformas de TNAP, el subtipo hígado es algo más termoestable que el subtipo hueso. Por otro lado, la PLAP es muy termoestable, puede ser calentada a 65 °C durante 1h sin perder su actividad catalítica [98].

5. Fosfatasa alcalina intestinal (IAP)

La IAP tiene un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, su expresión y actividad están además moduladas por la dieta. Se le han atribuido diversas funciones a la IAP, entre las más importantes se encuentran:

- Regulación duodenal de la secreción de bicarbonato y del pH superficial. Diversos autores sugieren un papel como quimiosensor (un bucle IAP, ATP extracelular y receptor P2Y₁ acoplado a proteína G) que regula el pH duodenal confiriendo protección a la mucosa contra los ácidos gástricos [99, 100].

- Regulación en la absorción de ácidos grasos. Los niveles de IAP en suero de rata están aumentados tras la ingesta de comida rica en grasa [101]. Por el contrario, los niveles de IAP disminuyen drásticamente tras el ayuno [102]. Por otro lado, Nakano y col. mostraron que la administración oral del inhibidor de IAP L-Phe a ratones C57Bl/6 inhibía notablemente el aumento postprandial de triacilglicerol en suero, indicando que la disminución de trigliceridemia postprandial estaba asociada a la inhibición de la actividad de IAP [103]. Los estudios con animales con delección de *Akp3* (dIAP) generados por Narisawa y col. mostraron un aumento de ganancia de peso y transporte de ácidos grasos (AG) respecto a ratones normales [104]. Se dio a la IAP un papel regulador negativo de la absorción de grasa en una primera aproximación, que luego fue puesta en duda al comprobar un incremento de expresión yeyuno-ilíaco de *Akp6* (gIAP) acompañado de la elevación

concomitante de CD36, translocasa fosforilada de AG que se considera que está involucrada en el transporte de AG de cadena larga a la célula. La gIAP desfosforila y modula a CD36, lo que sugiere que son parte del mecanismo de incremento de absorción de AG en los ratones *Akp3^{-/-}*. Sin embargo, estudios posteriores atribuyeron a *Akp6* y CD36 un efecto marginal sobre la absorción de la grasa, ya que ratones knockout del gen *Cd36* no tenían afectada la absorción de AG de cadena corta [105-107]. Los últimos datos sugieren que el aumento de AG observado en ratones *Akp3^{-/-}* podría ser resultado de una disminución del pH del lumen y un incremento del ATP libre [108].

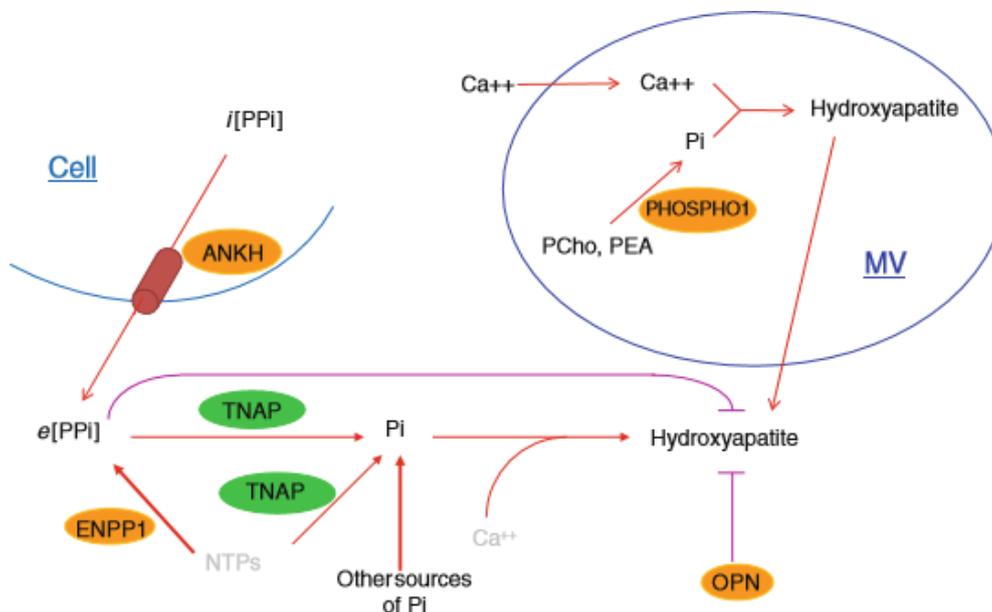
- Destoxificación mediante desfosforilación de la fracción lipídica A del lipopolisacárido bacteriano (LPS) de bacterias Gram-negativas (cuya toxicidad reside en el lípido A y en el grado de fosforilación [109]), impidiendo que alcance circulación sistémica y reduciendo por tanto la inflamación y el shock séptico [110]. La administración exógena de IAP en pacientes tras cirugía de bypass arterial coronario [111], así como en modelos animales de encefalomiелitis [112], NEC [enterocolitis necrotizante] [111, 112] y colitis [13] disminuyó las alteraciones neuronales, la inflamación sistémica e intestinal y la translocación bacteriana, respectivamente. Asimismo, la IAP reduce la translocación bacteriana protegiendo frente a la inflamación inducida por LPS [8, 13, 113], al impedir la unión del LPS a su receptor TLR-4 e incluso bloqueando el receptor. La IAP juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal entre el hospedador y la microbiota intestinal. En el pez cebra libre de bacterias (*germ-free*) la diferenciación epitelial intestinal está incompleta y la expresión de IAP es baja, aunque la actividad aumenta con la introducción de bacterias Gram-negativas o LPS solo [113]. Por otro lado, cuando se estimula la expresión de IAP, las células epiteliales intestinales (IECs) son capaces de regular negativamente la producción de IL-8 inducida previamente por bacterias gram-negativas como *E.coli* o *S. typhimurim* pero no de gram-positivas [114]. También se ha observado como la microbiota fecal de animales *Akp3^{-/-}*, sin IAP, difiere de la de los *wild-type* (WT), no hay detección de *E.coli* y el número de bacterias totales aerobias y anaerobias está reducido [9].

- Desfosforilación de nucleótidos libres con papel proinflamatorio, como ATP [115] y UDP [116], así como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos, *pathogen-associated molecular patterns*), entre ellos, flagelina y CpG DNA, ligandos de TLR-5 y TLR-9 [114]. Estos hallazgos son importantes ya que tanto los nucleótidos libres como los PAMPs están asociados a la patología intestinal en enfermedades como fibrosis quística [108] y enfermedad inflamatoria intestinal [116].

6. Fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP)

La TNAP es esencial en la mineralización ósea. La enzima hidroliza el pirofosfato inorgánico (PPi), que es un inhibidor de la mineralización, proporcionando fosfato inorgánico (Pi) para la formación de hidroxiapatita. La TNAP es una de las proteínas encargadas de mantener el ratio Pi/PPi extracelular para una correcta calcificación ósea. Existen además otras 4 proteínas que regulan este ratio: PC-1 (expresado por el gen *ENPP1*, produce PPi a partir de dNTPs) [117], ANKH (canal que media la salida de PPi de la célula) [118, 119], osteopontina (OPN, otro inhibidor de la mineralización) [118] y PHOSPHO1 (fosfatasa encargada del primer paso de la mineralización en las vesículas de matriz) [120].

Esquema 3. Representación esquemática de los agentes clave en la mineralización ósea y su



regulación. MV = vesícula de matriz; PEA = fosfoetanolamina; PPi = pirofosfato inorgánico (i = intracelular; e = extracelular); Pi = fosfato inorgánico; NTPs = nucleótidos trifosfato; ENPP1 = ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1; OPN = osteopontina; TNAP = fosfatasa alcalina no específica de tejido; ANKH = proteína homóloga del responsable de anquilosis progresiva; PEA = fosfoetanolamina; PCho = fosfocolina; PHOSPHO1 = fosfatasa huérfana 1. [Adaptación de [117, 118, 120, 121]].

La hipofosfatasa (HPP, OMIM 146300, 241500, 241510) es una enfermedad hereditaria caracterizada por una deficiencia de fosfatasa alcalina no específica de tejido, como resultado de mutaciones en el gen *ALPL*, que expresa la TNAP. Las consecuencias visibles de la pérdida de función de la enzima son debidas al acúmulo de sus sustratos, que están elevados en pacientes con HPP y en modelos animales: el pirofosfato inorgánico (PPi), que inhibe la mineralización ósea y por ello el crecimiento del esqueleto en niños, derivando en raquitismo y en caso del

adulto en osteomalacia, al cerrar el plato óseo de crecimiento. Por otro lado, altos niveles de piridoxal 5'-fosfato (PLP) reflejan la hidrólisis defectiva de PLP por la TNAP, disminuyendo la disponibilidad de piridoxal (PL) capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y proporcionar PLP al cerebro, apareciendo en consecuencia ataques epilépticos en estos pacientes.

En el hígado la eliminación de endotoxina circulante (LPS) es llevada a cabo principalmente por las células de Kupffer. Posteriormente es excretada a la bilis por los hepatocitos [122]. Además, Poelstra y col. propusieron que la función de la TNAP en el hígado es la destoxicación de LPS circulante [10]. En situación de colestasis, la actividad de las células de Kupffer está suprimida y la ruta enterohepática de eliminación de toxinas obstruida, y como respuesta fisiológica se potencia la actividad TNAP [10]. Además, Tuin y col. comprobaron como la administración de LPS en ratas estimula la expresión de TNAP en los hepatocitos *in vivo* [89].

Por otro lado, la función de la TNAP a nivel renal parece algo controvertida ya que hidroliza el PPI, inhibidor de la mineralización en orina. De hecho, individuos con predisposición a la formación de piedras de oxalato cálcico presentan una menor excreción de PPI [123]. Hasta la fecha, la función de la TNAP en el riñón parece estar unida al metabolismo del PPI y la destoxicación de LPS [90].

En neonatos, Pettengill y col. demostraron que la TNAP en sangre está involucrada en la producción de adenosina anti-inflamatoria [88].

Además, recientes estudios destacan la importancia de la TNAP en distintos procesos en el sistema nervioso. La glicoproteína TNAP hidroliza el piridoxal 5'-fosfato (PLP), forma activa de la vitamina 6 [85]. Consecuentemente, la actividad TNAP está implicada en el metabolismo de diferentes neurotransmisores, como GABA y serotonina, cuya síntesis necesita PLP como cofactor [124]. Como se ha comentado anteriormente, en situación de ausencia de TNAP, como en caso de hipofosfatasa humana (HPP) y en modelos animales de ésta (*Akp2^{-/-}*), se ha observado el desarrollo de ataques epilépticos asociados a la deficiencia en el metabolismo de PLP y GABA [125, 126]. Asimismo, en ratones *Akp2^{-/-}* se observó una disminución significativa de materia blanca en la médula espinal así como ausencia de axones mielinizados en la corteza cerebral [2]. Además, se ha asociado la localización de la TNAP en la hendidura sináptica [42] y los nódulos de Ranvier

[127], respaldando el papel de la TNAP en la regulación de la actividad neuronal a nivel de corteza cerebral.

Asimismo, se considera a la TNAP un elemento clave en el origen de dos fenómenos contrapuestos a nivel cerebral, la diferenciación neuronal y la degeneración neuronal. Durante el desarrollo neuronal, la TNAP juega un papel esencial en el establecimiento de circuitos neuronales. Un estudio *in vitro* reciente muestra un efecto pro-neurítico inducido por altos niveles TNAP, correlacionados con bajos niveles de ATP, que resulta en el incremento de la longitud del axón en el área del cono de crecimiento neural en neuronas del hipocampo [4]. De forma interesante, se ha visto que la TNAP también regula la diferenciación de las células madres neurales *in vitro* [3]. Además, la producción de adenosina mediante la actividad 5'-ectonucleotidasa en la médula espinal dorsal es esencial para el mantenimiento de un buen tono purinérgico en los circuitos nociceptivos [5]. Todos estos efectos están relacionados con la regulación de la señalización purinérgica mediante la hidrólisis de ATP. Por el contrario, nuevas evidencias apuntan a un efecto neurotóxico producido por la TNAP, cuya expresión y actividad se han visto incrementadas en el hipocampo y el suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con pacientes control [6, 128]. Diaz-Hernández y col. han descrito la capacidad de la TNAP para desfosforilar la proteína tau hiperfosforilada, componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares presentes en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, y que es liberada tras la muerte celular de neuronas afectadas [6]. Una vez desfosforilada, la proteína tau es agonista de los receptores muscarínicos M1 y M3, provocando un aumento del calcio intracelular que desencadenará en muerte neuronal [6, 128].

La TNAP también está relacionada con el tejido adiposo. Los niveles plasmáticos de AP se correlacionan con la obesidad y el síndrome metabólico, la población obesa tiene niveles más altos de la enzima que la delgada [129]. Además, el tratamiento de ratas Zucker obesas con resveratrol atenuó la esteatosis hepática, los ácidos grasos disponibles, el estrés oxidativo y los niveles plasmáticos de AP [130]. Por otro lado, estudios en células 3T3-L1 murinas y pre-adipocitos obtenidos de tejido adiposo mamario humano revelaron el papel de la TNAP en la diferenciación hacia adipocitos actuando sobre la acumulación intracelular de lípidos [131] y encontrándose además diferencias étnicas en la acumulación lipídica y de AP en pre-adipocitos [132]. Hernández-Mosqueira y col. demostraron que el gen *Alpl* se expresa en la diferenciación terminal del adipocito, en la línea murina

T3F442A, concluyendo que la TNAP podría estar involucrada en la regulación del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina a través de la síntesis y secreción de adipocinas [7]. Estos estudios sugieren que cambios en la actividad de esta enzima podrían estar correlacionados con los cambios del metabolismo lipídico en el organismo.

Sin embargo, la influencia de la TNAP en la respuesta inmune va más allá del efecto sobre la producción de adipocinas. La TNAP se expresa en leucocitos. En células B, la TNAP se localiza en la membrana, aunque también se ha encontrado en el sobrenadante de cultivos celulares, probablemente como resultado de su liberación por la actividad de la fosfolipasa C sobre el GPI. Esta liberación puede ser, pudiendo ser importante para la activación y la diferenciación de las células [133]. La TNAP ha sido asociada a procesos de diferenciación hacia células secretoras de anticuerpos [17, 18]. Además, se ha observado un aumento de la actividad TNAP y de la expresión de Alpl en linfocitos B de bazo de ratón estimulados con LPS, frente a linfocitos B no estimulados, así como en líneas celulares malignas de ratón, U266 B1. Sin embargo, poco se sabe en lo referente a la función de la TNAP en linfocitos T, macrófagos y otras células del sistema inmune [19].

7. Perspectivas en la utilización farmacológica de la AP

La administración de IAP por diferentes vías de administración ha sido muy estudiada debido a su actividad desfosforilante de endotoxinas como el LPS, con el consiguiente beneficio para enfermedades intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Tuin y col. administraron comprimidos de IAP a ratas con colitis por DSS [134], nuestro grupo de investigación la administró de forma oral e intrarrectal a ratas con colitis por TNBS [13] y Lukas y col. administraron 30 KU/día de IAP durante 7 días, de forma intraduodenal, a 21 pacientes con colitis ulcerosa (CU) [11]. En todos los casos se observó una mejora en el desarrollo de la colitis, en caso de animales, y una disminución en el índice Mayo, la proteína C reactiva y la calprotectina en heces, en caso de pacientes enfermos. También a nivel intestinal, Rentea y col. acaban de publicar que la administración de IAP oral (40 U/Kg) a ratas tras el tratamiento de irradiación hemicorporal baja (13 Gy) resulta beneficioso al mitigar el daño intestinal derivado de la radiación, demostrado por la mejora de la inflamación intestinal aguda y la normalización de la microbiota [135].

Por otro lado, se ha asociado la administración de IAP a roedores con la prevención del síndrome metabólico [136].

Además, con el fin de evitar problemas asociados a endotoxemia y sepsis se han realizado varios estudios por grupos neerlandeses en humano. Kats y col. administraron IAP bovina de forma profiláctica a 32 pacientes para evitar la respuesta inflamatoria a la cirugía de bypass pulmonar en pacientes con bypass coronario [111]. Otro grupo ha estudiado la mejora de la función renal tras la administración intravenosa de IAP bovina a 36 pacientes con daño renal agudo asociado a sépsis en un estudio fase IIa [137]. De forma paralela, estudiaron la mejora de la hiperreactividad plaquetaria asociada a esta patología, por formación de microtrombos y amplificación de la inflamación sistémica, tras el tratamiento *ex vivo* de AP recombinante humana a sangre total y sangre rica en plaquetas de pacientes sanos y pacientes con daño renal agudo asociado a sepsis [138]. Por último, han visto una disminución en la respuesta inflamatoria de células humanas de epitelio proximal renal con función mitocondrial dañada tras la administración de AP recombinante humana [139].

Por otro lado, hay varios estudios en fase II de terapia de remplazo enzimático de larga duración con TNAP recombinante humana, que es dirigida a hueso, en pacientes con HPP de inicio perinatal/infantil o juvenil para tratar las manifestaciones óseas de la enfermedad. En general, en estos estudios, que una vez concluidos se extienden para evaluar la farmacocinética y la eficacia, se han observado mejoras en la estatura, la fuerza y la agilidad muscular de los niños, así como una curación de las manifestaciones óseas, aunque no totales [140, 141]. La proteína recombinante de fusión de TNAP humana es una glucoproteína soluble compuesta por dos cadenas idénticas de polipéptidos, cada una de una longitud de 726 aminoácidos elaborada a partir del dominio catalítico de la fosfatasa alcalina no específica de tejido humana, el dominio Fc de la inmunoglobulina humana G1 y un dominio péptido deca-aspartato (D10), como péptido de distribución específica al hueso [142]. Fue designada inicialmente como sALP-FcD10, y asfotasa alfa al inicio de los ensayos clínicos. La asfotasa alfa es bien tolerada y parece segura. Los efectos más frecuentes tienen una intensidad entre leve y moderada, siendo los más comunes: reacciones en el lugar de inyección, lipodistrofia, calcificación ectópica y reacciones de hipersensibilidad. En 2015, la asfotasa alfa se convirtió en el primer tratamiento médico para la HPP aprobado en Japón y el único tratamiento médico para la HPP de inicio pediátrico aprobado en Canadá, la Unión Europea y EE. UU. [143].

8. Relevancia clínica de la fosfatasa alcalina

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

El rango normal de varía entre 44 y 147 UI/L (Unidades Internacionales por litro, siendo UI la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto). Los valores pueden variar dependiendo de la edad y sexo, así como entre laboratorios.

Hiperfosfatasa

Término utilizado para describir la elevación persistente de actividad fosfatasa alcalina en suero de forma aislada pero con importantes cambios bioquímicos asociados. El aumento de la actividad AP no es constitutivo, reflejando un aumento de su liberación desde órganos dañados:

- colestasis hepática
- aumento del recambio en tejidos mineralizantes

En otras ocasiones puede deberse a la liberación aguda de otras isoenzimas como la placentaria (durante embarazo), la ósea (durante el crecimiento repentino en pubertad), la intestinal (en casos de enfermedad inflamatoria intestinal severa) o incluso de tumores (Nagao o AP de células germinales). Normalmente este aumento de AP es debido, de forma primaria, a un aumento de liberación de dímeros o tetrameros anclados a la membrana plasmática de células que expresan AP.

Por otro lado, la hiperfosfatasa aislada persistente sin daño de órganos es más rara. Se ha visto en condiciones hereditarias con un aumento de recambio óseo constitutivo, enfermedad de Paget juvenil (mutaciones en el gen *TNFRSF11B*-OMIM *602643).

Por último, la hiperfosfatasa persistente asociada con un trastorno neurodegenerativo posnatal moderado-severo con ataques epilépticos y déficits cognitivos designado síndrome de Mabry (OMIM #239300), asociado a mutaciones en genes responsables de la síntesis y anclaje de la AP a la membrana (glicosilfosfatidilinositol, GPI).

Hipofosfatasemias:

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

9. Ratones genéticamente modificados para el estudio de la TNAP

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

Entre los ratones *knockout* para TNAP se encuentran:

- Convencionales: Hay dos ratones *knockout* para TNAP denominados $Alpl^{tm1Sor}$ y $Alpl^{tm1Jlm}$, que fueron independientemente desarrollados por los grupos de Soriano [39] y Millan [144], mediante recombinación homóloga. Ambos presentan altos niveles de sustratos naturales de TNAP, PPI y PLP, que son eliminados por orina. Aproximadamente, a los 6 días de vida manifiestan un crecimiento deficiente, desarrollan ataques epilépticos como consecuencia de los niveles altos de PLP en sangre, apnea y finalmente mueren alrededor de las 2 semanas [126]. Respecto a esto, inyecciones intraperitoneales diarias de piridoxal a ratones $Alpl^{-/-}$ resultan en una mejora de los ataques epilépticos, doblando la esperanza de vida, como mínimo [125]. Además presentan una mineralización ósea disminuida y tienen un timo apoptótico, raíces de nervios descendentes finas, menor número de leucocitos en sangre y acúmulo de gases en el intestino delgado [144], imitando la hipofosfatasa (HPP) infantil. Por otro lado los ratones $Alpl^{+/+}$ son sanos y fértiles, sin presentar anomalías en condiciones normales.
- Químicamente inducidos: mutantes generados por mutagénesis ENU, N-etil N nitrosourea, para obtener modelos animales de HPP adulta, la mayoría con mutaciones puntuales de nucleótidos [145, 146]. Es una herramienta importante para entender las variaciones en la severidad de la HPP. Estos ratones tienen un desarrollo esquelético inicial normal, al igual que su crecimiento y esperanza de vida. Además, no padecen ataques epilépticos. No obstante, presentan un inicio tardío de enfermedad esquelética, con osificación endocontral y mineralización ósea defectuosa que conduce a artropatías de rodillas y hombros.

- Condicionados: La generación de una línea de ratones floxados, $Alpl^{flox/flox}$, por parte del grupo de Millan, es una herramienta con futuro prometedor para entender la función de la TNAP en células neuronales, endoteliales, renales e incluso linfocitos, al cruzar con líneas transgénicas Cre apropiadas [147]. Hasta el momento solo se ha generado una línea específica para el estudio de TNAP en hueso [$Alpl^{flox/flox}; Col1a1-Cre$]. $Col1a1$ expresa para la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo 1.

Los transgénicos con sobreexpresión de TNAP o *knockin* están siendo una buena herramienta de estudio de la mineralización ósea (mediante expresión de ADNc de TNAP humano bajo el control del promotor $col1a1$ [20]) y de la calcificación vascular de la media, debida a la transdiferenciación de células del músculo liso vascular hacia un fenotipo osteogénico [148] (insertando ADNc de TNAP humano por recombinación homóloga en el locus *Hprt* y cruzado con una línea Cre específica de musculo liso, SM22-Cre) [149].

II. SISTEMA INMUNOLÓGICO

El propósito principal de sistema inmunológico (SI) es la protección del cuerpo humano frente a enfermedades infecciosas, para lo que ha ido evolucionando a la vez que lo han hecho los microorganismos. La mayoría de enfermedades infecciosas están producidas por microorganismos más pequeños que una célula humana. Tanto para microorganismos benignos como para patógenos, el cuerpo humano constituye un entorno rico en recursos en el que vivir, alimentarse y reproducirse. Por otra parte, el SI ayuda al hospedador a eliminar sustancias alergénicas o tóxicas que penetran a través de las superficies mucosas del organismo [150, 151].

Los mecanismos que permiten el reconocimiento de microorganismos, toxinas o estructuras alérgenas pueden dividirse en dos categorías generales:

-Respuesta inmune innata: representa la primera línea de defensa del organismo, codificada por genes de la línea germinal del hospedador para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) no presentes en el hospedador. Caracterizado por ser un mecanismo de defensa independiente de antígeno y sin memoria. Además es crucial para la activación del SI adaptativo. Las células involucradas en el sistema inmune innato son: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y células epiteliales [152].

-Respuesta inmune adaptativa o adquirida: aparece cuando la respuesta innata es incapaz de eliminar el agente infeccioso y se establece la infección. Tiene como función principal el reconocimiento de antígenos extraños de forma específica, en presencia de antígenos propios, y desencadenar una respuesta inmunológica para eliminar de forma específica al patógeno o a las células infectadas. Además, es capaz de generar células de memoria frente a ese antígeno, confiriendo al hospedador la capacidad de crear una respuesta inmune más rápida y eficiente en caso de exposición posterior al antígeno. Las células del SI adaptativo son los linfocitos T, activados por células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*), y los linfocitos B, productores de anticuerpos.

Linfocitos T

Los linfocitos T derivan de las células madres hematopoyéticas de la médula ósea, y tras su migración, maduran en el timo. Se caracterizan por la expresión del receptor de linfocitos (TCR), con cadenas α y β . Este receptor es esencial en el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por las APC formando un complejo principal de histocompatibilidad de clase I y clase II (MHC, *major histocompatibility complex*). Estas células T se diferencian en subtipos diferentes: células T CD8⁺, actúan principalmente matando células infectadas con patógenos intracelulares y otros; células T CD4⁺, que actúan regulando la respuesta inmune celular y humoral; células NK (*natural killer*), son CD8⁻ CD4⁺ y expresan NK1.1 o CD161 que reconocen antígenos presentados por la molécula CD1d y poseen función inmunoreguladora [153].

Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel esencial en la función del sistema inmune: ayudan a las células B en la producción de anticuerpos, potencian y mantienen las respuestas de células T CD8⁺, regulan la función de macrófagos y dirigen las repuestas inmunes contra una gran variedad de microorganismos patógenos. Además, mediante mecanismos de regulación y supresión controlan la autoinmunidad y ajustan la magnitud y persistencia de las respuestas inmunes.

Cuando las células T *naïve* (Th0) se encuentran con un péptido antigénico presentado por una APC en el nódulo linfático, se adhieren y comienzan un programa de proliferación y diferenciación. Estas acciones integran distintas actividades como el aumento de integrinas de adhesión, la reordenación del citoesqueleto, la producción y movilización coordinada de factores de transcripción, así como cambios en el metabolismo de la célula.

1. Activación de Linfocitos T

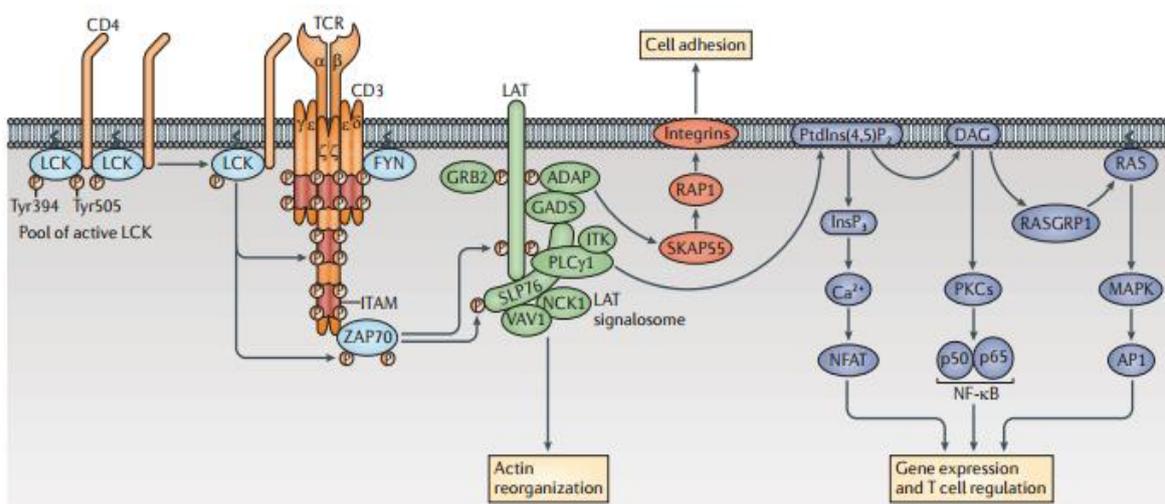
Los linfocitos T reconocen péptidos antigénicos de origen endógeno o bien exógeno previamente procesados y expuestos en la superficie de la APC unidos a una molécula MHC. Las células CD8⁺ reconocen antígenos presentados en el MHC tipo I y las CD4⁺ en MHC tipo II. Las células T son super reactivas, reciben continuamente señales tónicas del MHC unidos a péptidos propios que inducen una unión de baja afinidad con el TCR en la periferia [154] y que en combinación con señales a través del receptor de la interleuquina-7, son esenciales para su supervivencia [155, 156].

Tras el reconocimiento por parte del TCR del antígeno presentado por la APC se forma una estructura supramolecular (estable, tridimensional y muy dinámica) en la región de contacto entre el linfocito y la APC con una intensa actividad de señales bioquímicas entre ambas células. A esta región de contacto y comunicación entre las dos células se la conoce como sinapsis inmunitaria. La sinapsis inmunitaria está compuesta por los complejos de activación supramoleculares central (cSMAC), periférico (pSMAC) y distal (dSMAC), que contienen moléculas específicas cruciales para la formación y función de la sinapsis (esquema 5B) [157].

A continuación explicaremos el proceso de transducción de señales implicado en la activación de linfocitos T. No se conoce con exactitud la señalización del TCR que desencadena la cascada de activación de los linfocitos. No obstante, entre otros modelos propuestos, el modelo de cambio conformacional sugiere que la unión del péptido antigénico con el MHC produce una alteración conformacional del TCR iniciando la señalización [158].

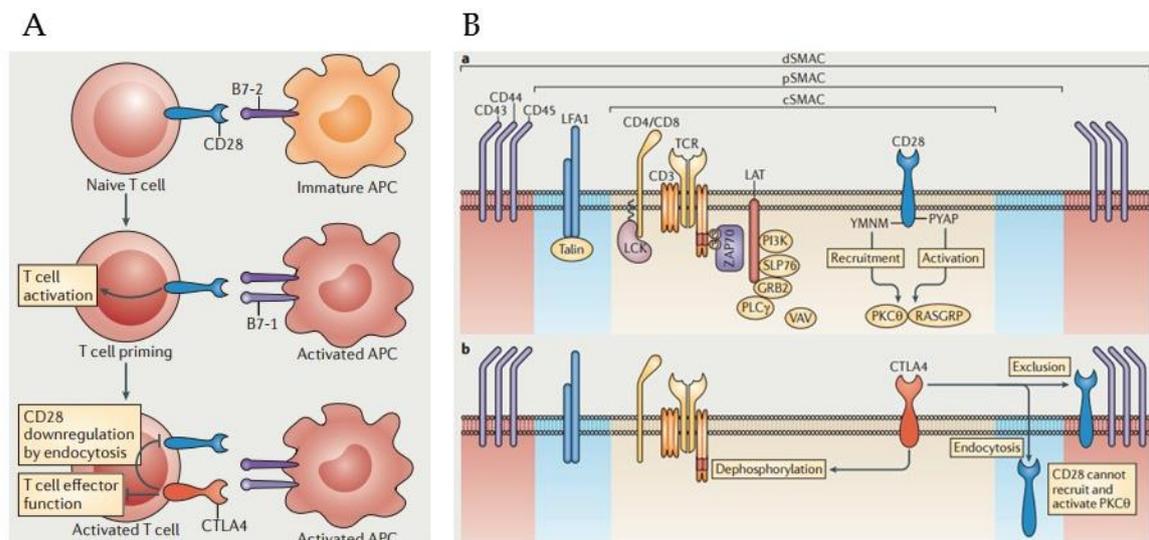
El TCR no tiene actividad enzimática intrínseca por lo que depende de la actividad quinasa de la familia de quinasas SRC (SFK, *SRC family kinase*), en particular LCK (proteína tirosina quinasa específica de leucocitos, *lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase*) y FYN, para iniciar la señalización (esquema 4) [159, 160]. La molécula LCK se une al dominio citoplasmático del co-receptor de TCR CD4 o CD8 fosforilando el motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de las cadenas CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ y cadenas ζ . La fosforilación de ITAMs permite el reclutamiento de ZAP70 (proteína-quinasa de 70 kDa asociado a cadena ζ , *ζ -chain associated protein kinase of 70 kDa*), su fosforilación por LCK y su activación [161]. Esta fosforilación produce un cambio conformacional en ZAP70 lo que le confiere actividad quinasa para fosforilar 4 residuos de tirosina claves en la activación de la proteína

adaptadora anclada a la membrana LAT (*linker for activation of T cells*), que recluta numerosas moléculas de señalización formando un complejo multiproteico llamado signalosoma LAT. Como se aprecia en el esquema 4, podemos encontrar diversas proteínas adaptadoras como la proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2 (GRB2, *growth factor receptor-bound protein 2*), la proteína adaptadora de la familia GRB2 (GADS, *BRB2-related adaptor protein*), la proteína específica de leucocito que contiene SH2 (SLP76, *SH2 domain-containing leukocyte protein of 72 kDa*), la proteína adaptadora promotora de adhesión y desgranulación (ADAP, *adhesion-and degranulation-promoting adaptor protein*), la quinasa de células T inducible con IL-2 (ITK, *interleukin-2-inducible T cell kinase*), NCK1 y VAV1. Después de la activación de estos adaptadores se producirá la fosforilación en tirosina de la enzima fosfolipasa C $\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$, *phospholipase C $\gamma 1$*), activándose e induciendo la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) generándose los metabolitos inositol trifosfato (IP₃, *inositol-1,4,5-trisphosphate*) y diacilglicerol (DAG). De esta forma se propaga una señal ramificada hacia tres vías de señalización importantes: Ca²⁺, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) y el factor nuclear κB (NF- κB), lo que conlleva numerosas consecuencias: regulación positiva de la afinidad de distintas integrinas, confiriendo adhesión celular; movilización de factores de transcripción críticos para la expresión de genes necesarios para el crecimiento y diferenciación de linfocitos T; y reorganización de actina, que es esencial para la activación, proliferación y adhesión de las células T. En conjunto, estos procesos concluyen en la proliferación y diferenciación de las células T hacia células efectoras.



Esquema 4. Resumen de la señalización del TCR [Adaptación de [162]]

Además de la señalización anteriormente descrita entre TCR:CD3, CD4 o CD8 y el MHC, se necesita una señal co-estimuladora, sin la cual la célula T será incapaz de dividirse o sobrevivir [163]. El receptor que proporciona la señal en la célula T es el CD28, expresado de forma constitutiva en la superficie de células *naïve* CD4⁺ y CD8⁺, y su ligando la molécula B7 (esquema 5A). La molécula CD28 contiene dos motivos intracitoplasmáticos, YMNM y PYAP, necesarios para la asociación con fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) (esquema 5B), intermediario que inicia la cascada AKT (proteína quinasa B, *protein kinase B*), promoviendo la proliferación y supervivencia de las células T a través de la activación de los siguientes objetivos de la cascada de señalización: NF-κB, el factor nuclear de células T activadas (NFAT, *nuclear factor of activated T cells*), BCL-XL, lamolécula diana de rapamicina en mamíferos (mTOR, *mammalian target of rapamycin*), el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1, *glucose transporter type 1*), entre otros [164].



Esquema 5. Mecanismo molecular de co-estimulación y co-inhibición de células T.

Receptores-ligando de co-estimulación CD28-B7-2 y de co-inhibición CTLA4-B7-1 y B7-2. [165]

Por otro lado, una vez la célula T está activada, se expresa el receptor CTLA4, estructuralmente parecido a CD28 pero con una afinidad 20 veces superior a la molécula B7 de la APC y con función contraria, inhibiendo la activación y proliferación de linfocitos T, desfosforilando el complejo TCR-CD3ζ y regulando eventos de señalización distal que inhiben la fosforilación de ERK y JNK [166]. Así, cuando CTLA4 está sobreexpresado, la expresión de CD28 está disminuida, por endocitosis o al ser apartada de la sinapsis inmune (esquema 5B). Este receptor tiene por ligando tanto a B7-2 como a B7-1 (esquema 5A).

Las expresiones de B7-1 y B7-2 están moduladas por el estado de activación de la APC. La molécula B7-2 está expresada de forma constitutiva en la APC en niveles bajos mientras que en situación de infección, estrés o daño celular son reconocidos por receptores innatos que activan las APCs e inducen la transcripción, translación y transporte de B7-1 y B7-2 a la superficie celular [167, 168].

2. Diferenciación de linfocitos T

Tras la activación de las células T *naïve*, éstas se diferencian en células T colaboradoras o efectoras, reguladoras o citotóxicas.

Tras la activación de las células T CD8⁺, las células adquieren propiedades citotóxicas que les permiten matar directamente a las células que expresan el antígeno que les fue presentado mediante el MHC tipo I por la APC.

Tras la diferenciación de las células *naïve* T CD4⁺ se pueden encontrar al menos cuatro tipos de células T: Th1, Th2, Th17 y Treg. Las células Th1, Th2 y Th17 son importantes en la erradicación de patógenos intracelulares, helmintos, bacterias extracelulares y hongos, respectivamente. Además las células Th1 y Th17 están involucradas también en diversos tipos de enfermedades autoinmunes, mientras que las células Th2 contribuyen a las respuestas alérgicas [169]. Las células Treg son críticas para el mantenimiento de la auto tolerancia y la modulación de las respuestas inmunológicas frente a infecciones [170].

Mosmann y Coffman [171], más tarde Bottomly y col. [172], fueron los primeros investigadores que observaron la existencia de distintas poblaciones de linfocitos T CD4⁺ diferenciados, al analizar distintos clones de células T CD4⁺ en ratón. Las denominaron Th1 y Th2 y eran principalmente distinguibles por las citoquinas producidas y la expresión de diferentes moléculas superficiales. Las células Th1 son productoras principales de IFN- γ , aunque también producen IL-2 y algo de TNF- α . Las Th2 en cambio producen IL-4, IL-5 e IL-13, aunque también algo de TNF- α e IL-9. Ya en 2003 se detectó una tercera población de células colaboradoras, llamadas Th17 y caracterizadas por la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22 [173-175]. Al mismo tiempo, se observó una población con características reguladoras de células T a las que se les denominó T reguladoras (Tregs), productoras de IL-10 y TGF- β [176-178]. Se encontraron dos subpoblaciones distintas: linfocitos T reguladores naturales CD4⁺ CD25⁺ (nTregs), generados en el timo e incorporados a la periferia como linfocitos Tregs funcionales o maduros [179, 180], y linfocitos T reguladores inducibles (iTregs), generados en la periferia a partir

de linfocitos *naïve* TCD4⁺ CD25⁻ o que se expanden a partir de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ [181, 182].

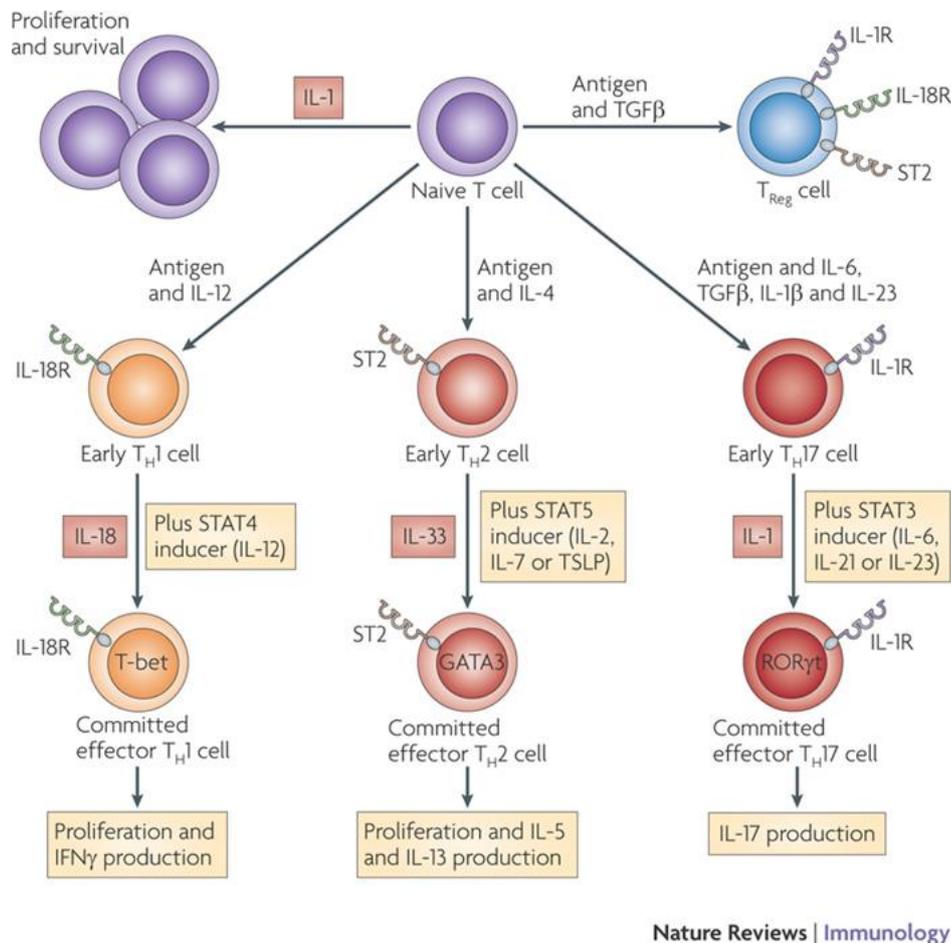
Los distintos estados diferenciados a los que puede llegar una célula T CD4⁺ están determinados por los distintos factores de transcripción que expresen y los genes que regulen. Entre los principales inductores de estos factores de transcripción, y que por tanto determinará el estado de diferenciación de las células se encuentran las citoquinas presentes en el ambiente de la célula durante el proceso de activación del TCR. Así, se requiere una combinación de citoquinas para la diferenciación hacia cada linaje: Th1 necesita IL-12 e INF- γ ; Th2 necesita IL-4, IL-2/IL-7/TSLP [183], Th17 necesita TGF- β e IL-6/IL-21/IL-23 y en caso de Tregs necesitan IL-2 y TGF- β . [184]. El proceso de diferenciación implica también la sobreexpresión de factores de transcripción y activación de proteínas STAT (*signaling transducer and activator of transcription*) [169] (esquema 6). Las actividades de los factores de transcripción vienen determinadas por el nivel de expresión, mientras que las de los STAT están reguladas por modificaciones post-translacionales mediadas por citoquinas, incluyendo la fosforilación de tirosina y/o serina/treonina.

A continuación se detallan los factores de transcripción principales y los miembros de la familia STAT que participan en la diferenciación y expansión de las distintas estirpes (esquema 6):

-**Th1**: Requiere el factor de transcripción T-bet (de la familia T box) para la producción de INF- γ . T-bet induce el gen *Ifng* y la sobreexpresión de IL-12R β 2, aumentando la producción de INF- γ y la expansión de Th1 en respuesta a IL-12 [185, 186]. STAT4 es activado principalmente por IL-12 y su expresión es mayor en Th1 que en Th2 [187, 188]. Su expresión está regulada positivamente por INF- γ y negativamente por IL-4 y GATA3 [187, 188].

-**Th2**: STAT5 y GATA3 (*GATA-binding protein 3*) se unen a los elementos de control del *locus* (LCRs) de Th2, indispensables para la producción de IL-4 y la diferenciación hacia células Th2. STAT5 es activado por IL-2, IL-7 y TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). Bajos niveles de activación de STAT5 son suficientes para la proliferación y supervivencia de células T [189, 190]. GATA3, factor de transcripción principal de Th2, primer regulador en ser identificado [191, 192], es también imprescindible para el desarrollo de las células T CD4 [193]. La regulación positiva de la expresión de GATA3 puede ser debida a: IL-4, a través de la activación de STAT6 [191, 192]; una activación tenue del TCR, independiente de IL-4 y STAT6 [194]; y otras vías de señalización como la de Notch [195] y Wnt, a través de β -

catenina y TFC1 (*T cell factor 1*) [196], que todavía están siendo investigados. GATA3 es regulado negativamente durante la diferenciación de Th1 (directamente por T-bet), como se aprecia en el esquema 7 [191, 197, 198]. Se ha observado que la ausencia de GATA3 en células T CD4 de ratón, impide totalmente la diferenciación hacia Th2, *in vivo* e *in vitro* [199, 200].



Esquema 6. Diferenciación de células T CD4 naïve mediante combinación de citoquinas, factores de transcripción.[201]

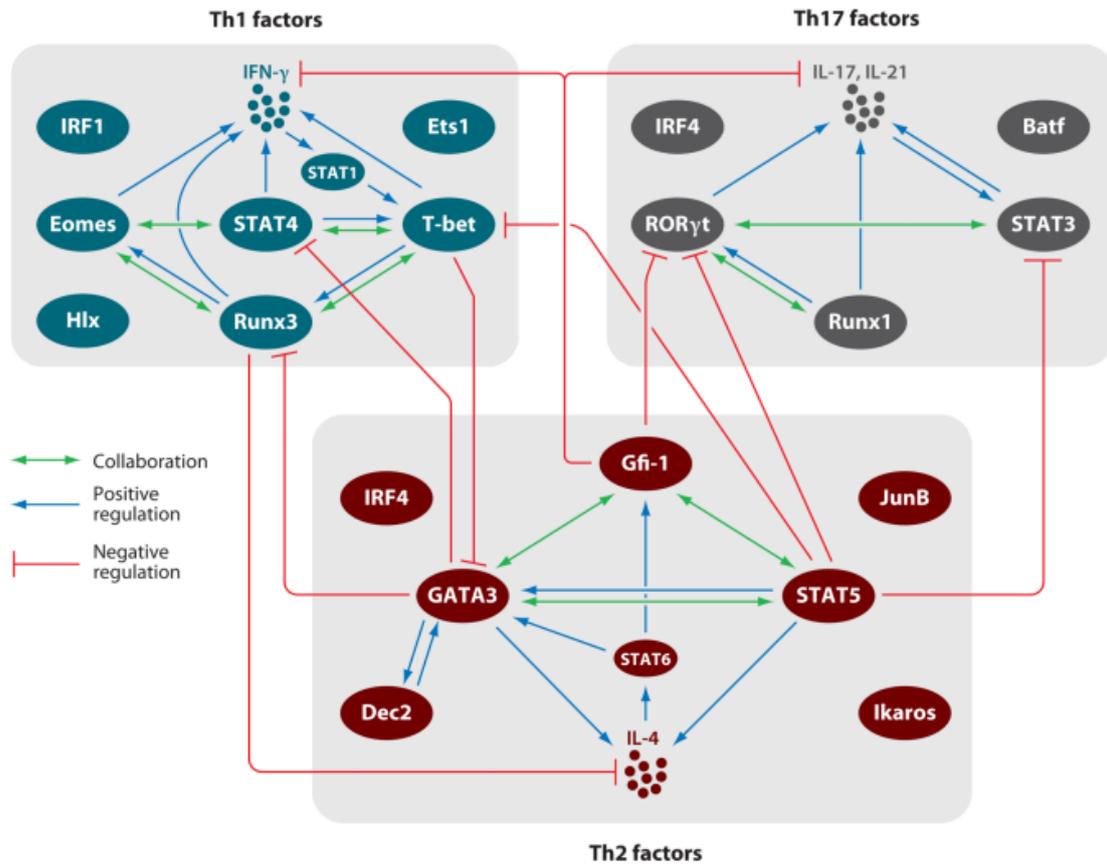
-Th17: Estas células no expresan T-bet ni GATA3 [174, 175], en su lugar expresan altos niveles de RORγt (*retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt*) [202]. RORγt se induce en células T CD4 naïve tras 8h de estimulación del TCR junto a TGF-β e IL-6. RORγt coopera con una red de factores de transcripción, entre ellos STAT3, IRF4 (*IFN-regulatory factor 4*) y BAFT (*basic leucine zipper transcription factor ATF-like*) para iniciar el programa de diferenciación completo [203, 204]. Las citoquinas IL-6, IL-21 e IL-23, involucradas en la diferenciación, amplificación y

mantenimiento de Th17, activan STAT3 [205-208]. STAT3 se une a *Il17* [209] e *Il21* [210] y es responsable de la inducción de ROR γ t y el receptor de IL-23, IL-23R [206, 208, 211]. En paralelo, la activación STAT3 por IL-6 regula negativamente a Foxp3 en células Treg diferenciadas y en diferenciación [205, 212, 213]. Por otro lado, otra proteína STAT, STAT5, reprime la diferenciación de células Th17 [214], aunque es necesaria para la expansión de las células Th17 diferenciadas [215].

-Treg: La expresión del factor de transcripción Foxp3 es necesaria para el desarrollo de las Tregs [216]. La expresión continua de Foxp3 en las Tregs es necesaria para el mantenimiento de la actividad supresora de estas células [217]. Una limitada expresión de Foxp3 parece virar el fenotipo de estas células Treg diferenciadas al fenotipo Th2, lo que implica la existencia de una estrecha relación entre ambos linajes [218]. La activación de STAT5 mediante IL-2 es esencial para el desarrollo de las Treg [219-221]. STAT5 contribuye a la inducción de Foxp3 al unirse a su promotor [220, 222].

En las últimas etapas de diferenciación, las distintas estirpes colaboradoras expresan de forma preferente un receptor de la familia de IL-1: IL18R en Th1, IL33R (T1/ST2) en Th2, IL-1R en Th17 (esquema 6) [223]. Las citoquinas presentes en el ambiente, típicas de Th1, Th2 y Th17, junto a un activador STAT y una citoquina de la familia IL-1, activadores de NF- κ B, son capaces de inducir la producción de citoquinas efectoras de la célula T colaboradora de forma independiente a la activación del TCR. La estimulación de células Th1 con IL-12, activa STAT4, y junto a IL-18, induce la producción de IFN- γ , independientemente de TCR [223-226]. De forma similar, IL-2, IL-7 o TSLP, junto a STAT5 e IL-33 inducen la producción de IL-13 en células Th2 [223]. Y en caso de células Th17, IL-6, IL-21 o IL-23, mediante la activación de STAT3, y junto a IL-1 inducen la producción de IL-17A [223]. Esta producción de citoquinas efectoras inducida por citoquinas pro-inflamatorias, probablemente producidas por células epiteliales de la zona inflamada, de forma independiente a TCR sugiere que las células T colaboradoras tiene algo de función efectora innata cuando se encuentran en un entorno con las citoquinas apropiadas [227].

Los factores de transcripción involucrados en la diferenciación de células T forman una gran red de interacción que incluye la colaboración y regulación positiva y negativa, así como la represión mutua entre factores de transcripción de diferentes linajes (esquema 7).



Esquema 7. Red de factores de transcripción para la diferenciación de células T colaboradoras. [228].

III. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

1. Generalidades

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

La Enfermedad de Crohn (EC) se caracteriza por una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, que puede afectar a cualquiera de los segmentos, desde la boca hasta el ano. La EC cursa con una evolución no penetrante, de forma que solo alrededor del 15% de los casos presentan fístulas o abscesos. Clásicamente se produce una afectación inflamatoria discontinua o parcheada del segmento en cuestión, que en ocasiones se acompaña de otras complicaciones como estenosis o fístulas en la zona perianal. La frecuencia relativa con la que se ve afectado cada uno de los segmentos en los pacientes con EC es del 47% para el íleon terminal, 28% para el colon, 21% en el caso de la región ileocecal y solo de un 3% si consideramos el tracto gastrointestinal superior. La sintomatología puede ser muy diferente en cada paciente, en función de la región intestinal que esté afectada. Si la afectación es en colon el principal síntoma será diarrea acompañada de presencia de sangre y moco. En cambio, si la afectación reside en el intestino delgado suele manifestarse dolor abdominal intenso en el cuadrante inferior derecho. La presencia de ulceraciones severas, fiebre y pérdida de peso derivada de una menor ingesta de alimentos para evitar el dolor postprandial, se presentan en la mayoría de los casos sin importar el segmento intestinal afectado [229].

En los segmentos inflamados en un paciente con EC se observa engrosamiento y rigidez intestinal dando aspecto de órgano macizo a la palpación, debido a la fibrosis y el edema. Además, las porciones afectadas se adhieren con frecuencia a otros segmentos intestinales, pudiendo ocasionar fístulas. Estos segmentos presentan una disminución de la luz intestinal y fibrosis en la pared. La mucosa suele presentar un aspecto en forma de “empedrado”, por la alternancia entre ulceraciones profundas y zonas edematosas. Cuando varias úlceras profundas

se asocian entre sí, puede llegar a originarse una fístula, caso en que la afectación transmural alcanza la capa muscular [230, 231]. A nivel microscópico, destaca la infiltración difusa de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa intestinal y la lámina propia. Asimismo, es frecuente encontrar granulomas localizados en submucosa, subserosa y ganglios linfáticos.

La Colitis Ulcerosa se caracteriza por una inflamación no transmural (superficial) que solo afecta a la mucosa y que está anatómicamente restringida al colon. En función de la longitud del segmento colónico que se encuentre afectado, la CU recibe una denominación diferente. De este modo, se habla de proctitis si solo se ve afectado el recto, proctosigmoiditis cuando se ven afectados 25-30 cm en dirección proximal desde el recto, colitis izquierda cuando está afectado recto, sigma y colon ascendente, y finalmente pancolitis cuando se encuentra inflamada la totalidad del órgano. En algunas ocasiones estos pacientes sufren una inflamación que afecta a la zona distal del íleon, esto es conocido como "*backwash ileitis*", y su aparición dificulta la realización de un adecuado diagnóstico diferencial entre EC y CU. La sintomatología suele estar dominada por dolor abdominal sobre todo postprandial, diarrea con deposiciones muy mucosas e incluso acompañadas de pus, rectorragia y anorexia con la consecuente tendencia a la pérdida de peso o retraso en el crecimiento si hablamos de un paciente pediátrico. Cuando la sintomatología es muy exacerbada, se usa el término de CU fulminante. Si esta sintomatología perdura en el tiempo sin ser controlada clínicamente, puede terminar desembocando en un megacolon tóxico. En esta situación clínica, se produce una fuerte hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto muy fino y frágil. Llegado a este punto, la única alternativa es la realización de una colectomía [232]. Cabe destacar que son frecuentes las alteraciones de tipo sistémico asociadas a la CU como artropatías periféricas, espondilitis anquilopoyética, problemas cutáneos como el pioderma gangrenoso, lesiones oculares, alteraciones renales como la pielonefritis e incluso algunas hepatopatías.

En la CU, a nivel macroscópico la mucosa en fase inflamatoria aparece hiperémica y con hemorragias puntiformes. A medida que el proceso inflamatorio evoluciona aparecen úlceras superficiales, que tienden a extenderse y fusionarse llegando a afectar grandes áreas de la mucosa colónica. Es también frecuente la presencia de pseudopólipos o pólipos inflamatorios que pueden confundirse fácilmente con adenomas. En fase de remisión este aspecto se normaliza bastante, pero la mucosa permanece lisa, brillante, granulosa y atrófica. En fases avanzadas de la enfermedad, el colon se torna fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con

pérdida de las marcas australes [233-235]. A nivel microscópico, la lámina propia se encuentra infiltrada de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Junto a este infiltrado, se distorsiona la arquitectura normal de las criptas apareciendo disposiciones aberrantes.

Tabla 3. Características clínicas de la Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn
Adaptación de Página web de la Unidad de Atención Crohn-Colitis (UACC) del Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Barcelona) [http:// www.ua-cc.org/es/crohn-colitis/enfermedad-de-crohn](http://www.ua-cc.org/es/crohn-colitis/enfermedad-de-crohn) y <http://www.ua-cc.org/es/crohn-colitis/colitis-ulcerosa>

	Colitis Ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Diarrea	<ul style="list-style-type: none"> • Síntoma más frecuente y común • Puede ir acompañada de sangre, mucus o pus • Presente en aproximadamente la totalidad de los casos de CU, mientras que el porcentaje es un tanto menor para la EC • Dependiendo de la gravedad del brote, puede haber incontinencia mientras el paciente duerme 	
Fiebre	<ul style="list-style-type: none"> • Se inicia con el proceso inflamatorio intestinal • En caso de ser alta (mayor a 38 °C) puede dar indicios de una posible infección 	
Dolor abdominal	<ul style="list-style-type: none"> • Poco frecuente 	<ul style="list-style-type: none"> • Presente en el 80% de los pacientes
Rectorragia	<ul style="list-style-type: none"> • Muy frecuente 	<ul style="list-style-type: none"> • Se manifiesta cuando afecta al colon o intestino grueso
Anemia	<ul style="list-style-type: none"> • Suele ser permanente y se intensifica durante los brotes • Entre las posibles causas destacan la pérdida de sangre en las heces, la falta de absorción de los nutrientes de los alimentos y la desnutrición por falta de apetito 	
Pérdida de peso	<ul style="list-style-type: none"> • Se intensifica en los brotes graves • Estrechamente ligada a la pérdida del apetito 	<ul style="list-style-type: none"> • Especialmente importante cuando la EC afecta al intestino delgado
Tenesmo	<ul style="list-style-type: none"> • Frecuente 	<ul style="list-style-type: none"> • Se manifiesta cuando afecta al colon o intestino grueso
Fatiga	<ul style="list-style-type: none"> • Sensación de cansancio permanente, la anemia empeora esta situación 	
Lesiones anales	<ul style="list-style-type: none"> • Poco frecuentes 	<ul style="list-style-type: none"> • Fístulas, úlceras o estenosis
Manifestaciones extraintestinales	<ul style="list-style-type: none"> • Presentes en un 10% de los pacientes • Afecta principalmente a las articulaciones, piel, ojos e hígado 	<ul style="list-style-type: none"> • Presentes entre un 20%-40% de los pacientes • Afecta articulaciones, piel y ojos

La extrema fragilidad tisular que ya se ha citado anteriormente asociada a la CU fulminante, puede reflejarse incluso en la aparición de agrietamientos patentes en la mucosa colónica [236, 237].

El diagnóstico diferencial fiable entre la EC y la CU es una cuestión que ha suscitado debate durante mucho tiempo en la comunidad médica. En general, este diagnóstico se hace atendiendo a las diferencias en la distribución anatómica de la afectación inflamatoria y sobre todo a la transmuralidad del proceso inflamatorio a nivel microscópico (tabla 3). Las técnicas de las que se hace uso para conocer estos detalles comprenden desde la endoscopia hasta la gammagrafía con leucocitos marcados, pasando por la ecografía y a radiografía. A pesar de la tecnología disponible y el creciente conocimiento sobre estas patologías, se dan casos de pacientes que presentan diagnóstico de EII pero que no pueden ser formalmente clasificados en ninguna de las dos presentaciones clínicas antes descritas. Se habla en estos casos de colitis indeterminada [238].

De un modo comparativo entre EC y CU, la CU presenta una incidencia superior[239], estable en los últimos años. No obstante, la EC está viendo incrementada su incidencia fundamentalmente en aquellos países que inicialmente presentaban menos casos.

Distintos factores definen la epidemiología, entre ellos cabe destacar:

- Localización geográfica. Los mayores casos de incidencia se registran en países desarrollados, destacando norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica. Sin embargo, aquellos que tradicionalmente presentaban una tasa baja, sur de Europa, Asia y África, están sufriendo un alarmante incremento en las últimas décadas paralelamente a la occidentalización de la dieta. [240-244]
- La edad parece ser un factor importante en el momento de la instauración de la enfermedad. La EC tiene un pico de máxima incidencia el comienzo de la madurez, entre los 20-40 años, mientras que la CU lo posee alrededor de los 60 [245]. En la última década ha aumentado incidencia de la EII en la edad pediátrica, principalmente EC [246].
- La influencia atribuida al sexo es relativamente pequeña en la instauración y severidad de la EII. Aunque sutiles, las diferencias apuntan una mayor afectación en la mujer por EC y en el hombre por CU [247, 248].
- Raza. Estudios realizados han demostrado una susceptibilidad a la EII comparable entre las razas negra y caucásica, cuando todos los individuos

siguen un estilo de vida occidental comparable [249]. Existe una asociación significativa entre la condición judía y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en comparación con cualquier otra raza [250-252]. Dicha susceptibilidad parece ser debida a factores estrictamente genéticos [253].

- Procesos infecciosos. Las bacterias del género *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* o *Listeria monocytogenes*, podrían tener un papel como factor desencadenante de la EII [254-257]. En ratones se asoció la infección con *Mycobacterium avium* con una inflamación similar a la enterocolitis necrotizante [258]. Algunas cepas de *E. coli* con capacidad adherente e invasiva sobre el epitelio intestinal se han aislados preferentemente de pacientes con EC, aunque hasta la fecha no se ha podido establecer una relación consistente [259-262]. Sorprendentemente, la presencia de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal se asocia con un cierto papel protector ante el desarrollo de la EII [263], no obstante hay resultados controvertidos en ese sentido [264].

2. Etiología

En la actualidad la EII se sigue considerando una afección de carácter idiopático. Sin embargo, la teoría más aceptada es que la EII surge por una respuesta inmunológica exacerbada en la mucosa intestinal y el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, *gastrointestinal associated lymphoid tissue*) frente a antígenos procedentes de la microbiota entérica en pacientes genéticamente predispuestos. Además, esta respuesta inflamatoria que adquiere carácter crónico se ve modulada por los factores ambientales.

2.1. Factores genéticos

La EII tiene un alto componente genético observable tanto en la elevada tasa de agregación como en la mayor susceptibilidad de la población judía. Presentar un historial familiar positivo para la enfermedad es hoy en día el factor de riesgo independiente más relevante a considerar. En el caso de la EC el riesgo de desarrollar la enfermedad ante un caso positivo en un familiar de primer grado es de hasta el 35% [265, 266]. La evidencia más consistente acerca de la influencia de la predisposición genética en el desarrollo de cualquiera de las presentaciones clínicas de la EII, proviene de estudios realizados con gemelos monocigóticos [267, 268]. No obstante, incluso en este caso, la patología no concuerda en su totalidad entre individuos, lo cual da idea del carácter multifactorial de ésta y de lo significativo de

la contribución relativa de los factores ambientales en el inicio de la misma [269-271].

Actualmente el modelo de herencia genética que mejor se adapta es uno de tipo multi-*locus* u oligogénico. Estudios recientes, basados en la realización de estudios del genoma completo (GWAS, *genome-wide association study*) han elevado el número de *loci* asociados con la EII en más de 160, estando muchos de ellos a su vez relacionados con otros desórdenes de carácter autoinmunitario como la espondilitis anquilosante y la psoriasis, así como con una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias [272].

Muchos de los genes en los que se ha encontrado asociación para algunas de sus variantes con la EII, están relacionados con la regulación de fenómenos cruciales en las respuestas inmunitarias en condiciones basales y en inflamación en el tracto gastrointestinal.

El gen *NOD2* es probablemente el que ha sido más estudiado, principalmente por la gran fuerza de asociación que ha mostrado respecto a la EC [273]. Este gen codifica uno de los receptores tipo NOD (*nucleotide binding oligomersitiation*) más relevantes, por lo que una mutación puede generar un cambio sustancial en la percepción del muramildipéptido (MDP) de naturaleza bacteriana, siendo esto relevante en células como las presentadoras de antígenos (APC) y principalmente las células de Paneth. A día de hoy han sido descritas tres mutaciones en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007insC) que, en términos patológicos, se relacionan con inflamación localizada en íleon y en ningún caso en colon, lo que justifica que dicha asociación quede restringida a la EC [274, 275].

Otro gen cuya mutación se ha mostrado fuertemente asociada con la EII es el que codifica la subunidad específica del receptor de la IL-23 (IL23R). Este gen presenta varias mutaciones que determinan cambios sustanciales en la susceptibilidad a la EC y la CU, aunque en menor medida para la segunda [272]. La IL-23 es producida fundamentalmente por macrófagos y células dendríticas, mientras que el receptor lo expresan estas mismas células, así como las células NK y las células linfoides innatas (ILC, *innate lymphoid cells*). Sobre macrófagos y células dendríticas la IL-23 aumenta su actividad como APC. El IL23R de células Th17 regula la producción de IL-17 e IL-22, que juegan un papel relevante en la fisiopatología de la EC, justificando que las mutaciones que generan un receptor menos sensible a IL-23 tienden a implicar cierta protección frente a la EC [276, 277], mientras que las de mayor sensibilidad se asocian con la esta patología [278]. La

importancia del IL23R se ha demostrado haciendo uso del modelo de colitis inducida por DSS [279] y mediante el uso del modelo de colitis espontánea en animales IL-10 KO [280].

Por último, hay múltiples genes de susceptibilidad a la EII que codifican proteínas decisivas en el desarrollo de las respuestas inmunológicas adaptativas. En línea con este concepto, en los genes *STAT3*, *IL2RA*, *IL12B* e *IL18R1* se han encontrado variantes asociadas a la EC y/o CU [281]. También el gen codificante de la IL-10 tiene variantes con asociación a EC y CU al verse afectado su papel inmunoregulador [282]. Independientemente de los genes relacionados con el SI, existe un grupo de ellos que intervienen en la regulación de la autofagia, destacando el polimorfismo (rs2241880) del gen *ATG16L1*, que se encuentra muy asociado con la localización ilíaca de la EC [283]. En concreto, la mutación *T300A* se asocia con una menor capacidad fagocítica para la destrucción de antígenos bacterianos y con una menor producción de péptidos antibacterianos por parte de las células de Paneth [284]. El hallazgo de estos genes implicados en la autofagia, ha iniciado investigaciones enfocadas a dichos procesos [285].

2.2. Factores ambientales

Microbiota intestinal

En el tercio distal del tracto gastrointestinal conviven la mucosa intestinal y la flora bacteriana. Esta convivencia se puede ver alterada por la pérdida de tolerancia inmunológica por parte de las células del SI innato. No obstante, la composición de la microbiota intestinal es un factor que puede contribuir, al menos en parte, a este desequilibrio.

La microbiota ejerce un papel determinante en la EII como se puede deducir de la estricta dependencia de ésta para el desarrollo del proceso inflamatorio en varios modelos de colitis espontánea, la descripción de cierta disbiosis intestinal típicamente asociada a los pacientes con EII, y finalmente, de la eficacia terapéutica de la microbiota intestinal, destacando el uso de prebióticos, probióticos y los trasplantes de microbiota fecal [286].

La disbiosis intestinal se caracteriza por una reducción en la diversidad bacteriana, siendo poco frecuente encontrar bacterias de los géneros *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como *Clostridium coccoides* y *Clostridium leptum*, con buena representación en condiciones normales [287, 288].

Sin duda, la gran incógnita con respecto a la disbiosis es si ésta es la causa o la consecuencia de la inflamación crónica intestinal. Las evidencias invitan a pensar preferentemente en la segunda posibilidad, de forma que sería la susceptibilidad genética del hospedador unida a diferentes factores ambientales la que determinaría un desequilibrio que genera un contexto inflamatorio. En este contexto inflamatorio, se produce una alteración importante en la producción de mediadores solubles por parte del hospedador que, en condiciones normales, contribuyen al equilibrio que la mucosa intestinal establece con la microbiota, justificándose de esta manera una disbiosis. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las variantes genéticas asociadas con la EII se encuentren en genes que codifican proteínas implicadas en el reconocimiento y la respuesta ante antígenos presentes en la luz intestinal, caso de *NOD2*, *IL23R* o *ATG16L1* antes descritos, hace que no se pueda descartar la posibilidad de que alteraciones cualitativas en la microbiota colaboren al menos en parte en la instauración de la inflamación intestinal [289-292].

Estrés

El sistema nervioso entérico controla la motilidad, transporte hidroelectrolítico y la microcirculación del tracto gastrointestinal [293]. Dada su importancia se consideró que la EII podía tener un componente psicósomático [294-296]. Los estudios relativos a este aspecto han definido al estrés como un factor escasamente implicado en la iniciación de la EII, pero que parece ser importante en cuanto a precipitar la recidiva de un paciente en remisión. Teniendo como base fisiológica de esta asociación en un aumento de las descargas de naturaleza colinérgica en dicho sistema nervioso entérico traducidas en un aumento de la motilidad intestinal [297, 298] y de la secreción hidroelectrolítica [299]; y por otro lado en un aumento de los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y por ende de cortisol, que ejercerían efectos inmunomoduladores que pueden alterar la homeostasis intestinal. La CRH actúa sobre los mastocitos produciendo la liberación de múltiples mediadores solubles que comprometen la función de barrera intestinal (FBI) al aumentar la permeabilidad transcelular [300]. En consecuencia se ha observado que la administración de un bloqueante inespecífico de los dos subtipos de receptores para la CRH presenta un efecto antiinflamatorio consistente en un modelo de colitis inducida por la administración de la toxina A de *Clostridium difficile* [301]. Por otro lado, existen múltiples evidencias experimentales que relacionan la exposición crónica de roedores a diferentes modelos de estrés con una mayor susceptibilidad al modelo de colitis inducida por DSS [302-304]. Atendiendo a estas evidencias, se han realizado

algunos estudios epidemiológicos tratando de establecer una conexión entre el éxito terapéutico en el control del estrés o la ansiedad y una menor tendencia a la recidiva en pacientes con EII, pero no se han obtenido resultados concluyentes en ningún sentido [305-307].

Dieta

Hasta la fecha se han realizado multitud de estudios, todos arrojando resultados negativos, orientados al establecimiento de relaciones de causalidad entre el consumo de alimentos como la leche y otros productos lácteos, cereales, margarina e incluso bebidas refrescantes carbonatadas, con una mayor susceptibilidad a la EII. En general, todos estos estudios han tratado de relacionar la dieta occidental, caracterizada por un desequilibrio nutricional a favor de los hidratos de carbono, con una mayor incidencia de EII. De hecho, hay algunos estudios que han conseguido encontrar cierta asociación con una mayor incidencia de CU [308, 309]. Un desequilibrio en el componente lipídico de la dieta y del balance cualitativo de los ácidos grasos del mismo, podría ser la causa subyacente de dicho fenómeno [310, 311], en la medida que existen estudios que apuntan a un efecto beneficioso de los ácidos grasos ω -3 en la inflamación intestinal [312-316].

La lactancia materna reduce significativamente en el lactante el riesgo de padecer tanto EC como CU [317, 318]. Diversos mecanismos pueden explicar al menos en parte esta asociación, destacando por un lado la composición rica en proteínas y oligosacáridos con capacidad inmunoestimulante [319], su riqueza en TGF- β que promueve la polarización de células T CD4⁺ hacia el subtipo Treg que promueve la tolerancia antigénica [320], su alto contenido en sIgA y en CD14 soluble que contribuye a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal del lactante [321-323], la microbiota que aporta de forma directa y que colabora en la conformación de una adecuada diversidad bacteriana en el intestino del neonato [323], e incluso el refuerzo directo de la FBI debido al efecto de algunos péptidos contenidos en ella que aumentan la expresión de proteínas de las uniones estrechas, como claudina 4 u ocludina [324, 325]. Además, hay que considerar que la leche materna contiene una cantidad significativa de cortisol que favorece la maduración final del sistema gastrointestinal del neonato. Finalmente, es importante tener en cuenta que la realización de la lactancia materna completa implica un retraso en la introducción de la leche de vaca, lo que puede influir en el riesgo de forma independiente [326, 327].

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

Tabaco

El único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son lo suficientemente concluyentes para establecer una relación directa y fiable con una mayor o menor susceptibilidad a la EII es el tabaco. En concreto, está establecido un papel protector del consumo de tabaco respecto al desarrollo de CU [328, 329], siendo el porcentaje de fumadores entre los pacientes de CU solo del 10-15% [330]. Por el contrario, este mismo factor se asocia con un riesgo elevado ante el desarrollo de EC y con un peor pronóstico en los casos en los que ésta ya se ha diagnosticado [331-334]. El efecto protector mostrado por el tabaco en la CU parece deberse a los múltiples efectos inmunomoduladores de la nicotina, que ha mostrado efectos antiinflamatorios disminuyendo la producción de citoquinas como la IL-8 o la IL-1 β [335], entre otros [336, 337].

Apendicectomía

En la actualidad está descrita una disminución de la incidencia de la CU, una aparición más tardía de ésta y un perfil de enfermedad menos agresivo, así como una menor tasa de recidivas, entre los pacientes sometidos a apendicectomía, sobre todo si la intervención se produce durante las primeras etapas de la vida [338-343].

3. Inmunología de la EII

El tracto gastrointestinal es la superficie del organismo humano expuesta al medio externo de mayor extensión (alrededor de 400 m²). El objeto principal del SI es diferenciar lo propio de lo ajeno mientras el tracto gastrointestinal preserva la habilidad de digestión y absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos a través de la mucosa [289]. El reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos.

Para ello, el SI gastrointestinal se sirve de una serie de componentes heterogéneos, incluyendo desde las células que componen la pared intestinal hasta las integradas dentro de los órganos linfoides asociados al tejido intestinal (GALT). Todo ello se encuentra a su vez favorecido por el peristaltismo intestinal, que

favoreciendo la motilidad, impide la adhesión mantenida de un determinado microorganismo a la mucosa intestinal, reduciendo el riesgo de invasión.

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

3.1. Homeostasis inmunológica en el intestino sano

Microbiota intestinal y tolerancia oral

Las bacterias comensales son capaces de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera mucosa, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal [271]. Esta relación simbiótica se establece durante los primeros 2 o 3 años de vida. Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y los antígenos procedentes de la dieta no están del todo claros [344].

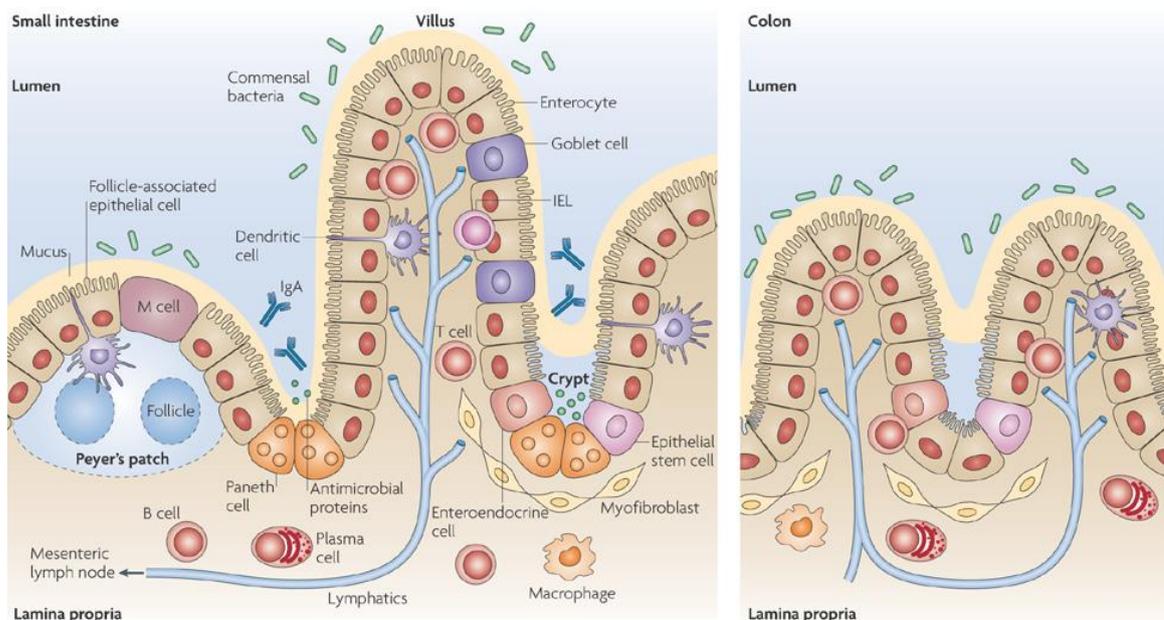
Barrera epitelial

La barrera epitelial está compuesta por una monocapa celular heterogénea en cuanto a la naturaleza y especialización funcional de las células que la forman y que están organizadas en criptas y villi. Todas ellas provienen de células madre pluripotenciales localizadas en las criptas de Lieberkühn [345], que proliferan continuamente permitiendo la renovación del epitelio que se completa en un periodo de 2-5 días [346]. Así, mediante la división de células pluripotenciales de las criptas se generan células que escalan dentro de la monocapa en dirección al borde apical. Paralelamente a la proliferación estas células van a sufrir un proceso de maduración selectiva regulado por distintos factores como la señalización de glucocorticoides de origen adrenal o local intestinal [347], las señales Wnt y Notch [348-351] y la propia señalización de los antígenos de la microbiota comensal. Este proceso de transición progresiva desde un estado proliferativo hacia un estado madurativo-diferenciado, terminará dando lugar a los tipos celulares que componen el epitelio de la mucosa intestinal: enterocitos o células entero-absortivas (IEC); células caliciformes, productoras de moco; células de Paneth, destacadas por la secreción de péptidos antimicrobianos; células enteroendocrinas, que son capaces de producir hormonas que conectan el tracto gastrointestinal con el sistema nervioso entérico; y células M (*villous microfold cells*), enterocitos especializados en la captación de antígenos.

Justo bajo el epitelio intestinal, a nivel de la lámina propia, podemos encontrar células estromales, células B (específicamente células plasmáticas productoras de IgA), células T (linfocitos de la lámina propia), macrófagos y células dendríticas. Además, subpoblaciones especializadas de células T (linfocitos intraepiteliales) y algunas células dendríticas se localizan entre las IECs, estratégicamente posicionadas para detectar el contenido luminal [352-354] (esquema 8).

El movimiento de sustancias a través del epitelio intestinal se produce tanto por un transporte transcelular, mediante bombas y canales de membrana específicos, como paracelular, controlado por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas (*tight junctions*), las cuales además mantienen la estructura polarizada de las IECs [355].

Originariamente se pensaba que la mucosa intestinal, y en general el epitelio, funcionaba únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IECs, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no solo tolera la presencia de antígenos con PAMPs procedentes de bacterias comensales sino que además, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la FBI [356].



Nature Reviews | Immunology

Esquema 8. Anatomía del sistema inmune intestinal. [353]

Reconocimiento antigénico e inmunorregulación

El reconocimiento y procesamiento de antígenos luminales comienza a nivel epitelial [357]. El epitelio intestinal expresa de forma constitutiva varios tipos de receptores con una estructura conservada evolutivamente, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR; *pattern recognition receptor*). Estos receptores son capaces de reconocer PAMP como el LPS, el peptidoglicano, la flagelina, el ácido lipoteicoico, ARN de doble y simple hebra o regiones CpG no metiladas en ADN bacteriano. Las tres grandes familias de PRR incluyen los TLR (receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*), los NLR (receptores tipo NOD; *NOD-like receptors*) y los RLR (receptores tipo RIG; *RIG-1-like receptors*).

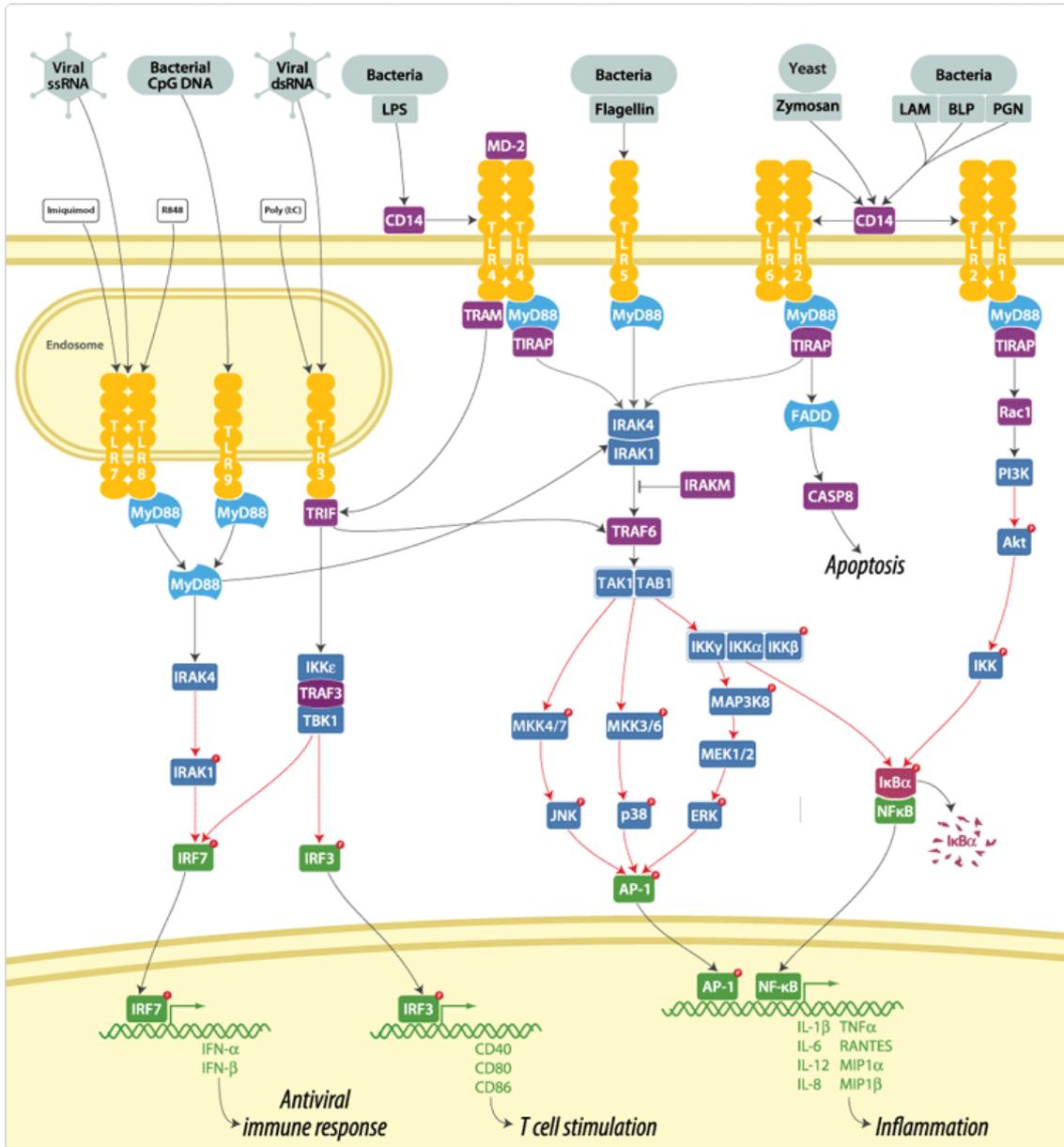
Los TLR reconocen patógenos a nivel de la membrana celular y en endosomas (esquema 9), mientras que NLR y RLR los detectan en el citosol. Los TLR fueron descritos por primera vez en la mosca de la fruta [358, 359]. Los TLR están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de PAMPs. En colon humano, se ha detectado, principalmente por inmunohistoquímica, que las IECs expresan bajos niveles de TLR2 y TLR4 en condiciones normales [360-362], mientras que TLR5 y TLR3 parecen estar ampliamente expresados [361]. Por otro lado, casi todos los TLRs se han detectado a nivel de expresión de ARNm en tejido colónico humano. Además, la expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 también se ha detectado en IECs de intestino delgado humano [360].

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. Las IECs procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de *TLR4* y similar o baja expresión de *TLR2*, *TLR3*, *TLR5* y *TLR9* [361, 363-365] respecto a pacientes sanos. Por otro lado se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias regulan la expresión de TLR en IECs [365-368], lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro [369]. Estudios recientes muestran que IFN- γ y TNF- α inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor LY96 (lymphocyte antigen 96, también conocido como MD2) [365, 367], mientras que IL-4 e IL-13 disminuyen la respuesta de las IECs al LPS, ligando del TLR4, sugiriendo que las citoquinas tipo Th2 disminuyen la expresión de TLR4 por IECs [366, 370]. Estudios que comparan ratones libres de gérmenes (GF del inglés *germ-free*) con ratones convencionales indican que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (*TLR2*, *TLR3*, *TLR4* y *TLR5*) [371]. Mediante

inmunohistoquímica se ha detectado la expresión de TLR9 en la cara apical del borde en cepillo de colon de ratones con microbiota entérica, pero no en ratones libres de gérmenes [372].

La expresión de TLR en el intestino está también regulada de forma espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral. Aunque la expresión de *TLR2* y *TLR4* es baja en colon adulto normal [361], *TLR4* se expresa intensamente en la cara apical de IECs colónicas procedentes de pacientes con EC, aunque no con CU [361]. *In vitro*, *TLR5* se expresa solamente en la cara basolateral [373-375]. En consecuencia, la flagelina luminal sólo podría activar al *TLR5* tras daño en la barrera epitelial [375]. Sin embargo, otro estudio indica que *TLR5* está presente en la cara apical de íleon de ratón [376]. En cuanto al *TLR9*, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- κ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical del *TLR9* inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (*cross-tolerance*). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada [374].

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



Esquema 9. Reconocimiento de PAMPs por los diferentes TLR.

Los NLR proporcionan mecanismos de defensa adicionales en la mucosa intestinal [377, 378]. NOD1 y NOD2 están expresados en el citosol de células presentadoras de antígenos expuestas a patógenos que contienen muramildipéptido (MDP) [379]. A nivel basal, la expresión de *NOD1* y *NOD2* en células epiteliales intestinales es baja o nula, aunque esta expresión se incrementa en casos de inflamación o en presencia de citoquinas proinflamatorias [380, 381]. En modelos de sobreexpresión de *NOD2*, la estimulación con MDP sugiere que éste participa en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos [380, 382, 383]. La función de *NOD2* en IECs está poco caracterizada, aunque la menor producción de α -defensinas en ratones con mutaciones en el gen *NOD2* sugiere que

éste regula la función de células de Paneth [384, 385]. Sin embargo, la importancia de este hecho es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las α -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica [385, 386].

Procesamiento antigénico

Las células M (*villous microfold cells*) funcionan como canales conduciendo los antígenos hacia las APCs, las cuales captan, procesan y dirigen los antígenos hacia tejidos linfoides periféricos subyacentes (placas de Peyer en el intestino delgado y folículos linfoides en el colon) donde se inicia la respuesta inmunológica adaptativa. Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías recientemente revisadas [387]. Una vía de paso es asociada a células caliciformes y otra las denominadas fugas paracelulares (*paracellular leak*), mediante las cuales antígenos de pequeño tamaño (menores de 10kDa), llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde las células dendríticas residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las células dendríticas de la lámina propia tienen la capacidad exponer las dendritas a la luz intestinal adquiriendo la capacidad de reconocer antígenos directamente a ese nivel [388] (esquema 8).

Las células dendríticas son células clave en el control de la inmunidad o tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las células dendríticas muestran un fenotipo inmaduro (baja expresión en su superficie de moléculas MHC-II y de miembros de la familia B7: B7.1 y B7.2) y por tanto inducen ausencia de respuesta (anergia) en las células T *naïve* (Th0) [389]. Estudios *in vitro* sugieren que las células dendríticas interactúan con ciertas cepas bacterianas probióticas produciendo IL-10, lo que induce una respuesta reguladora en lugar de efectora [390]. Ante estímulos de bacterias no comensales, las células dendríticas maduran y adquieren un fenotipo activado, expresando altos niveles de moléculas MHC-II y B7 en su superficie, así como moléculas estimuladoras, lo que les permite llevar a cabo las señales necesarias para la activación de células T *naïve* hacia células T efectoras [391].

Diferenciación de linfocitos T colaboradores

Tras el procesamiento de los antígenos por las APCs, los péptidos resultantes son presentados a través de moléculas del MHC de clase II a las células T *naïve* (Th0), comenzando así su activación seguida de su diferenciación hacia estirpes Th1, Th2,

Th17 y Treg y la consiguiente producción de citoquinas (ver apartado II SI: Linfocitos T).

Por otro lado, las citoquinas producidas por las APCs son de carácter proinflamatorio con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la lámina propia, células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la reacción inflamatoria. Además, la activación de macrófagos y células epiteliales también conlleva la producción de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio [392].

3.2. Disfunción del SI intestinal

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

Eventos primarios

En primer lugar, varios estudios han demostrado una menor resistencia epitelial y una permeabilidad incrementada en la barrera epitelial de mucosas de pacientes con EC y CU [393]. Estos defectos preceden al inicio clínico de la enfermedad en pacientes con riesgo familiar [394]. Defectos en la permeabilidad también han sido evidenciados en pacientes sanos con antecedentes familiares de primer grado y con la mutación en el gen *NOD2*, implicando un defecto genético [395]. Varios mecanismos han sido propuestos como desencadenantes del incremento de la permeabilidad, desde una alteración de las uniones estrechas mediada por células T hasta una disfunción neuronal entérica [393, 396-399].

En segundo lugar, pacientes con EII presentan un SI innato alterado. TLR3 se encuentra disminuido en EC, pero no en CU, mientras que TLR4 está aumentado en ambas [400]. Posiblemente debido a su expresión en la cara basolateral, la expresión de *TLR5* está generalmente suprimida en la EII. Sin embargo, en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación [401]. También se ha observado un incremento en la expresión de *NOD2* en IECs, lo

que puede ser consecuencia de la activación de la cascada de NF- κ B, que puede comprometer la habilidad de la mucosa para la eliminación de patógenos, dando lugar a una inflamación crónica [380, 381].

En tercer lugar, el reconocimiento de antígenos y el procesamiento por APCs están alterados en la EII. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII [402]. Se ha demostrado un incremento en la frecuencia de APCs con fenotipo activado o maduro en la mucosa inflamada [402], así como una escasez de APCs circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas [403]. En células dendríticas humanas procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (*gut homing*), y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG [403]. Esta ausencia en la capacidad de regulación de estas células puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria, perpetuando la inflamación [391, 404].

En cuarto lugar, las APCs no profesionales como IECs, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4⁺, adquieren un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN- γ o TNF- α , quizás por la pérdida de moléculas B7 (B7.1 y B7.2) [405]. Se ha observado que las IECs de pacientes con EII también expresan moléculas coestimuladoras alternativas, transformándolas en APCs funcionales. De hecho, se ha comprobado una activación de células T por IECs a través de vías alternativas no dependientes de MHC-II, como por ejemplo a través de la molécula CD1d, siempre que los antígenos alcancen la cara basolateral de las IECs donde se expresa esta molécula [406].

En quinto lugar, en la EII existe un defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas. Debido a un fallo en la tolerancia central y periférica, las células T activadas persisten y no entran en apoptosis. Esta persistencia ha sido observada en pacientes con EC y de hecho está siendo actualmente abordada con terapias que actúan rompiendo este ciclo de activación [407, 408].

En sexto lugar, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa, dando lugar a la inflamación crónica. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras en la EII. En períodos activos de la

enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las reguladoras como consecuencia de un predominio en la diferenciación de células Th0 hacia Th1 (en la EC) [409]. En la CU, se ha detectado un incremento en el número de células NK activadas productoras de IL-13 e IL-5, perpetuando así la inflamación [410].

Eventos secundarios

Las vías inflamatorias iniciadas por los eventos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se ha detectado una migración de células inflamatorias desde la vasculatura hacia la mucosa intestinal, siendo las principales responsables de tal migración las APCs profesionales y no profesionales. Este proceso se inicia con la liberación de moléculas quimioatrayentes tales como IL-8, MIP-1 α y β (*macrophage inflammatory protein*), RANTES (*regulated on activation normal T cells as secreted*) o MCP-1, 2 y 3 (*monocyte chemoattractant proteins*), que inducen cambios conformacionales en moléculas de adhesión de linfocitos, (integrina $\alpha 4\beta 7$ o el receptor de quimioquinas 7) y de granulocitos (L-selectinas). Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 β secretadas por macrófagos activados inducen la expresión de moléculas de adhesión a nivel del endotelio vascular de la mucosa (E-selectinas y P-selectinas, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1; *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1; *vascular cell adhesion molecule-1*), VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular; *vascular endothelial growth factor*), promoviendo la adhesión leucocitaria y su extravasación al tejido [411, 412].

En segundo lugar, una gran cantidad de metabolitos y mediadores (NO, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, proteasas y metaloproteasas) se acumulan en la mucosa produciendo daño tisular [413-416].

En tercer lugar, además de la inflamación intestinal, la EII se acompaña de una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal (tabla 3). La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso [417, 418], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [419] o fiebre [420]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [421-429], alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis [430]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas

asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe a uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia enfermedad [431-433].

En cuarto lugar, la EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, extensión y gravedad de la EII [434-436]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear NF- κ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [437].

4. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Los modelos experimentales permiten llevar a cabo estudios controlando las condiciones ambientales, genéticas y las referentes al protocolo experimental a aplicar, de forma que constituyen una herramienta insustituible de cara al estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a distintos desórdenes que afectan al ser humano.

En el caso de la EII no existe hoy en día un modelo capaz de reproducir con exactitud la complejidad de la patología que se desarrolla en humanos. Sin embargo, los modelos desarrollados hasta la fecha, su mayoría en roedores, son capaces de reproducir diferentes características inherentes a la EII. Estos se clasifican en función del mecanismo mediante el cual se desarrolla la enfermedad en: inducidos químicamente, inducidos por modificación genética, espontáneos e inducidos por transferencia celular.

4.1. Modelos experimentales de colitis inducida químicamente

Colitis inducida por ácido acético

Este es un modelo de colitis aguda que fue descrito en 1978 por MacPherson y Pfeiffer [438]. Tras la administración intrarrectal de ácido acético disuelto en agua en una concentración de 4-50% (v/v), se desarrolla inflamación limitada a la mucosa o transmural, dependiendo de la concentración y el volumen de ácido acético utilizado, que determina la profundidad y agresividad de la misma.

Colitis inducida por iodoacetamida

La administración intrarrectal de iodoacetamida produce un daño en la mucosa intestinal que genera una colitis caracterizada por diarrea y pérdida de peso, asociada a dilatación colónica y adhesiones significativas con otros segmentos

intestinales [439, 440]. Se produce una respuesta inflamatoria exacerbada gobernada por citoquinas del sello Th1 como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante y la producción de mucinas [441].

Colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS)

Este modelo fue descrito por primera vez por Okayasu en 1990 [442]. La administración de DSS en agua de bebida induce una colitis que se caracteriza por la aparición de una diarrea sanguinolenta, ulceraciones y una potente infiltración leucocitaria. El DSS resulta tóxico para las células epiteliales intestinales con severas consecuencias al afectarse las células madre en la base de las criptas. Esto afecta a la reposición celular normal en este epitelio, comprometiendo a la función de barrera epitelial, permitiendo que antígenos de la microbiota accedan a capas subyacentes de la mucosa intestinal. Allí células inmunitarias del SI innato 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. Actualmente es probablemente el modelo más utilizado para el estudio de mecanismos patogénicos y para el ensayo de terapias experimentales, por su simplicidad y facilidad de aplicación. Existe una variante que se presume más crónica, consistente en la alternancia de varios ciclos de exposición a DSS y de descanso. Asimismo, mediante la combinación de DSS y el carcinógeno azoximetano (AOM) se dispone de un modelo de carcinogénesis intestinal asociada a inflamación [443].

Colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)

El modelo de colitis por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) fue descrito en un principio por Morris en el año 1989, en rata [444]. Dado que el TNBS no es tóxico de forma directa para el epitelio, se administra por vía intrarrectal en una solución de etanol al 50%, la cual daña el epitelio y permite el acceso del TNBS a la mucosa. En dicho contexto, éste se comporta como un hapteno, desencadenando una respuesta de hipersensibilidad retardada previa reacción con las proteínas tisulares. En ausencia de TNBS la respuesta inflamatoria al etanol es aguda y se resuelve completamente en unos 3-4 días. Por el contrario, la combinación TNBS/etanol produce una respuesta que se prolonga durante algunas semanas. El modelo fue adaptado posteriormente al ratón, en el cual se ha descrito una respuesta inmunológica determinada principalmente por citoquinas tipo Th1, además de una menor sensibilidad al etanol, haciendo necesaria la presensibilización de los

animales al TNBS vía tópica 7 días antes de su administración vía intrarrectal [445, 446].

La afectación colónica se caracteriza por ser de tipo transmural, con anorexia, potente pérdida de peso y diarrea. Se produce una necrosis epitelial, seguida de una inflamación de la mucosa, con formación de granulomas y fibrosis marcada, además de alteraciones funcionales como trastornos en el transporte hidroelectrolítico y en la motilidad.

4.2. Modelos experimentales de inflamación intestinal en animales transgénicos

El desarrollo de la ingeniería genética aplicada al embrión de las diferentes cepas de ratones de laboratorio ha dotado a los investigadores de una libertad absoluta para estudiar en profundidad el papel que juega el producto de la expresión de cualquier gen, en la biología general del animal y en tejidos específicos. Hasta la fecha, en el campo de la gastroenterología han aparecido más de 74 tipos de ratones modificados genéticamente que han desarrollado colitis y/o ileítis de forma espontánea. Estos animales han sido generados por transgénesis o por delección genética total o específica de tejido (ratones transgénicos (Tg), *knockout* (KO) o KO condicionales del tejido). Entre los ratones transgénicos más importantes destacan STAT4 Tg, con aumento de expresión STAT4 en bazo y colon diferenciando los linfocitos T CD4⁺ *naïve* hacia Th1 [447], e IL-7 Tg, con incremento de IL-7 por parte de linfocitos infiltrados en la mucosa colónica [448]. Entre los KO: IL-2^{-/-} [449], IL-10^{-/-} [450], TCR- α ^{-/-} [451], MDR1^{-/-} (*multiple drug resistance 1*) [452] y TGF β 1^{-/-} [453]. Por otro lado, se han generado ratones con delecciones específicas en células intestinales epiteliales (IECs) de NEMO (*NF κ B essential modulator*, conocido como IKK γ) [454] y RelA (también conocido como NF- κ Bp65) [455], así como de STAT3 en macrófagos [456], que han desarrollado también colitis espontánea.

4.3. Modelos espontáneos de inflamación intestinal

Se ha demostrado que algunos animales de experimentación desarrollan colitis espontáneamente. Es el caso de las cepas de ratón C3H/HeJBir o SAMP1/Yit. Los ratones C3H/HeJBir son una subcepa de los ratones C3H/HeJ que fue generada mediante cruces selectivos entre aquellos individuos que desarrollaban colitis de un modo espontáneo. Esta cepa presenta un fenotipo muy susceptible a desarrollar colitis que aporta nuevos conocimientos en las interacciones entre sistema inmunológico, el ambiente y los factores genéticos que dan lugar a la EII [457]. Los ratones SAMP1/Yit desarrollan una ileítis similar a la que se produce en la EC, por

lo que resulta un modelo específicamente indicado para la investigación de la fisiopatología específica de la EC [458].

4.4. Modelos de colitis inducida por transferencia celular

Fiona Powrie puso de manifiesto a finales del siglo XX que la inyección de células T CD4⁺ CD45RB^{hi} a ratones sin timo daba lugar a un proceso inflamatorio intestinal que no se producía si se utilizaban células T CD4⁺ no fraccionadas (mezcla de células CD45RB^{hi} y CD45RB^{lo}), lo que sugiere que la respuesta inflamatoria se origina en un desequilibrio inmunoregulatorio inicial [459, 460]. Más tarde, otros investigadores obtuvieron hallazgos en esa misma línea tras la inyección de dichas poblaciones celulares en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) [461]. Aunque se han descrito diversas variantes del modelo, sobre todo en función del criterio en términos de marcadores de superficie en virtud del cual se purifican las células T *naïve* que se transfieren (CD4⁺ CD25⁻, CD4⁺ CD62L⁺ o CD4⁺ CD45RB^{hi}) [462], el proceso inflamatorio en todos los casos es muy similar, quedando esencialmente confinado en el colon, probablemente debido a que las bacterias comensales son las responsables del desarrollo de la colitis. La transferencia de CD4⁺ CD45RB^{hi} a huéspedes con poca carga bacteriana lleva al desarrollo de una colitis más leve y una menor expansión de células T colónicas o a la ausencia de inflamación en caso de encontrarse en condiciones *germ-free* [463, 464]). El colon presenta un marcado engrosamiento debido tanto a la hiperplasia del epitelio como a la infiltración de linfocitos y macrófagos en la lámina propia y la mucosa. El intestino delgado sufre una afectación meramente tangencial, ya que únicamente se observa una infiltración difusa de células mononucleares en la lámina propia.

Transcurridas entre 6-8 semanas tras la transferencia celular, los ratones comienzan a perder peso y a presentar diarrea con sangre oculta en heces. El proceso inflamatorio que se desencadena está dominado por citoquinas de tipo Th1 (IL-12, IL-8, IFN- γ y TNF- α) [465] y las del eje IL-17/IL-23 [466]. El desarrollo de este modelo de colitis queda atenuado ante la co-transferencia de células dendríticas con fenotipo tolerogénico o de células Treg [467, 468]. Este modelo se ha utilizado casi exclusivamente para estudios de modulación inmunológica, pero puede constituir de hecho el modelo más adecuado para hacer estudios farmacológicos con un enfoque traslacional hoy en día, ya que es uno de los que refleja más fielmente las características de la EII, especialmente de la EC.

OBJETIVO

Resultados previos de nuestro grupo de investigación indican que las enzimas fosfatasa alcalina intestinal (IAP) y fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) están coexpresadas en colon de ratón [14]. La isoforma TNAP tiene mayor expresión en colon y se encuentra incrementada en modelos de inflamación intestinal. Este incremento es debido no sólo a la infiltración de neutrófilos y leucocitos en el foco inflamatorio, sino también al incremento de actividad en células del epitelio intestinal. De hecho, nuestro grupo ha descrito que en células de epitelio intestinal sometidas a estrés oxidativo se produce un aumento en la actividad AP, asociado a un cambio de isoforma: de la TNAP tipo hepática, expresada de forma constitutiva, a la tipo ósea o renal, expresada en estrés o inflamación [15].

Nuestros datos en modelos murinos estarían en concordancia con datos obtenidos en humanos; se ha descrito una disminución en la expresión de IAP en el intestino de pacientes con EII [134], estando por el contrario aumentada la actividad AP general en el intestino de estos pacientes. Nuestro grupo ha postulado que las isoformas de TNAP podrían ser las responsables de este efecto [14, 15].

Distintos tipos celulares implicados en la respuesta inmunológica expresan TNAP, aunque su función no ha sido estudiada en detalle. Se ha observado, que la fosfatasa alcalina de neutrófilos (NAP) se encuentra localizada en vesículas que se relocalizan en la membrana tras la activación celular [16]. Por otro lado, se ha asociado la TNAP a la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos [17, 18]. Sin embargo, poco se sabe del papel de la TNAP en linfocitos T [19].

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en esta Tesis Doctoral se propone caracterizar la implicación de la fosfatasa alcalina no específica de tejido en la actividad, diferenciación y proliferación de células del sistema inmunológico y más concretamente de linfocitos T. Se utilizarán para ello distintas herramientas incluyendo ratones heterocigotos para la expresión de TNAP e inhibidores específicos de AP. Además se estudiará la implicación en la respuesta inflamatoria de la TNAP expresada en linfocitos, utilizando un modelo de colitis por transferencia de linfocitos *naïve* de ratones heterocigotos para la TNAP a ratones Rag-1^{-/-}, deficientes en linfocitos T y B maduros.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

1. REACTIVOS

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma-Aldrich® (Madrid, España). Los experimentos *in vitro* fueron realizados con anti-mouse CD3 ϵ (clon 145-2C11), anti-mouse CD28 (clon 37.51) y el control de isotipo *Armenian hamster* IgG (clon Ebio288Arm) en formato *Functional Grade Purified* de eBioscience, y el LPS de *Escherichia coli* clon 055:B5. Las citoquinas y anticuerpos utilizados para la diferenciación de células T *naïve* fueron adquiridos en BioLegend (San Diego, CA, EE. UU.: IL-4, IL-6, anti-IFN- γ , anti-IL-4 y anti-IL-12) y R&D systems (Abingdon, Reino Unido: IL-2, IL-12 y TGF- β).

2. EXPERIMENTOS IN VIVO

2.1. Animales de experimentación

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

Se genotiparon los ratones por PCR convencional (REDEExtract-N-Amp™ PCR REady Mix™ #R4775, Sigma-Aldrich) con el fin de detectar los ratones heterocigotos. El ADN genómico fue obtenido del tejido que queda obtenido en el proceso de marcar las orejas de los ratones para su identificación en el animalario (del inglés *ear punch-outs*). Se utilizó el cassette de Neomicina (Neo) para genotipar a los ratones heterocigotos, así como la *Il2* como control interno. Los cebadores fueron: Neo sentido 5'-GGG TGG AGA GGC TAT TCG GCT ATG A-3', antisentido 3'-CCC ATT CGC CGC CAA GCT CTT CAG C-5'; IL-2 sentido 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3', antisentido 3'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-5'.

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones con una edad comprendida entre las 8-12 semanas, con un peso medio de 20-25 gramos. Dichos animales fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon® (hembras y machos separadamente) sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal

(Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014, Harlan Ibérica, Barcelona), y agua esterilizada *ad libitum*.

Se emplearon ratones hembra Rag1^{-/-} en fondo C57BL6/J para el modelo de colitis por transferencia linfocitaria, suministrados por Jackson Laboratory® (Sacramento, CA, EE. UU.). Los ratones Rag1^{-/-} fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos específicos, en jaulas ventiladas individualmente con un sistema de entrada y salida de aire con doble filtro (prefiltro y filtro HEPA).

Los experimentos realizados han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.

2.2. Estimulación de células T *in vivo* mediante el anticuerpo anti-CD3 ϵ

Para la estimulación de las células T *in vivo*, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una única dosis de 50 μ g por ratón del anticuerpo anti-CD3 ϵ (clon 145-2C11) o del control de isotipo hamster IgG κ (ambos de BD Pharmingen®). La inyección de anti-CD3 ϵ hipotermia e hipoglucemia [469], por lo que la monitorización del estado de los animales fue llevada a cabo mediante la determinación de la temperatura y la glucemia al comienzo y final del experimento (6 horas después) [469].

Los ratones TNAP^{+/-} y sus controles WT fueron divididos en cuatro grupos: dos grupos inyectados con el anticuerpo anti-CD3 ϵ (n=6): WT aCD3 y TNAP^{+/-} aCD3; y dos grupos inyectados con el control de isotipo IgG, en caso de los controles (n=4): WT vehículo y TNAP^{+/-} vehículo. A las 6 horas los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre, para contador hematológico y obtención de plasma, y el bazo para la obtención de esplenocitos para su siembra y extracción de linfocitos para la secuenciación de ARN.

2.3. Inducción de colitis por transferencia linfocitaria

La inducción de la colitis se realizó mediante la transferencia de una subpoblación purificada de células T *naïve* (vírgenes) CD4⁺ CD62L⁺ a ratones C57BL6/J Rag1 KO (Rag1^{-/-}) (ratones que carecen de linfocitos T y B maduros) [470]. Las células T *naïve* CD4⁺ CD62L⁺ fueron obtenidas por separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) a partir de esplenocitos aislados de ratones hembra TNAP^{+/-} y WT C57BL6/J. Una vez obtenidos, estos

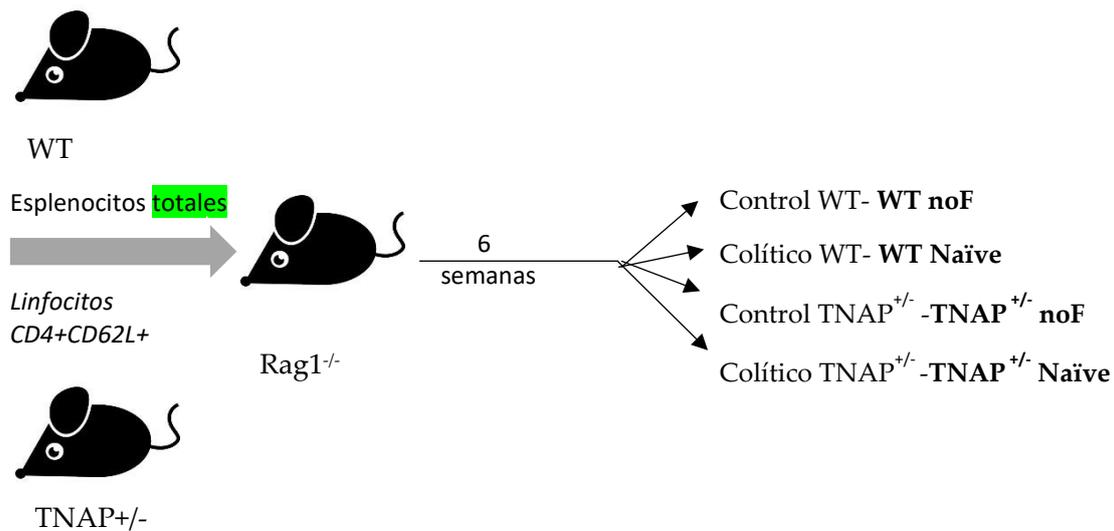
esplenocitos fueron filtrados mediante un filtro de 70 μM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350) con objeto de conseguir una suspensión celular homogénea con la que poder proceder a la separación. En un primer paso, tras lavar esta suspensión celular con tampón MACs (PBS 1X, 2% albúmina, 1 mM EDTA), se aislaron las células T CD4⁺ por selección magnética negativa mediante el marcaje de células no CD4⁺ con anticuerpos específicos (anti-CD8 α , anti-CD45R, anti-CD11b, anti-CD25, anti-CD49b, anti-TCR γ/δ y anti-Ter-119).

En un segundo paso, el marcaje específico de CD62L permitió el aislamiento de células T *naïve* CD4⁺ CD62L⁺ mediante selección positiva. Las células T *naïve* CD4⁺ CD62L⁺ purificadas fueron lavadas, resuspendidas en PBS frío y finalmente inyectadas intraperitonealmente con una cantidad de 1×10^6 de células en un volumen de 100 μl de PBS a ratones hembra Rag1^{-/-}. El grupo control no colítico recibió esplenocitos totales o no fraccionados (noF) de WT y TNAP^{+/-}.

Los animales se dividieron en cuatro grupos, los controles inyectados con esplenocitos no fraccionados: WT noF (n=5) y TNAP^{+/-} noF (n=5); y los colíticos inyectados con CD4⁺ CD62L⁺: WT *naïve* (n=10) y TNAP^{+/-} *naïve* (n=9) (esquema 1).

La transferencia de linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺ a ratones Rag1^{-/-} da lugar a un proceso colítico dependiente de la presencia de microbiota comensal [471], caracterizado por pérdida de peso corporal, diarrea y sangrado rectal. Por ello los ratones fueron monitorizados durante 6 semanas tras la transferencia, controlando semanalmente el peso corporal de cada uno de ellos. Los animales seleccionados para este estudio mostraron una ligera ganancia de peso inicial y un lento desarrollo de signos clínicos de colitis. Se evaluó el índice de actividad de la enfermedad utilizando los siguientes criterios: consistencia de las heces (0, normales; 1, algo blandas y/o prolapso rectal pero manteniendo estructura; 2, blandas y/o pérdida de estructura; 3, diarrea); sangre en heces (0, sin sangre; 1, sangre oculta; 2, sangre visible); incremento de peso corporal menor del 2% respecto a la semana anterior, +1.

Cuando los animales alcanzaron un índice de actividad de la enfermedad comprendido entre 2,5 y 3,5, se consideró instaurada una colitis clínicamente significativa y por tanto el momento óptimo para el sacrificio de los animales. Además pudimos comprobar el desarrollo de la enfermedad mediante imagen *in vivo* detectando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ver punto 2.2 de resultados).



Esquema 1. : Diseño experimental en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria de células T CD4⁺ CD62L⁺ a ratones Rag1^{-/-}.

Una vez instaurada la colitis, los animales fueron anestesiados con isoflurano, se les extrajo sangre de la bifurcación aorto-femoral y se sacrificaron por dislocación cervical. La necropsia posterior se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, permitiendo la obtención de los órganos objeto de estudio sin contaminación bacteriana externa. Se extrajo el colon; sangre, para contador hematológico y la obtención de plasma; los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) para marcaje de poblaciones por citometría, extracción de ARN y estudio bacteriológico; y el hígado para el estudio de translocación bacteriana. El bazo fue pesado para confirmar la esplenomegalia típica del modelo, además, un pequeño trozo fue guardado para extracción de ARN, en *RNA later* a -20 °C, y otro para la extracción de esplenocitos y linfocitos.

2.4. Evaluación patológica de los modelos *in vivo*

2.4.1. Estudio macroscópico y necropsia del colon

El órgano más afectado en la colitis por transferencia es con gran diferencia el colon, que presenta pancolitis. El colon fue fotografiado, lavado, pesado (bajo peso constante de 2g) y medido. Además, se realizó un estudio macroscópico centrado fundamentalmente en la observación de fibrosis e hiperemia (ver apartado 2.2 de Resultados).

De igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales situados aproximadamente a 1 cm del extremo distal para el estudio histológico (apartado 2.4.5. de Material y Métodos) y para la extracción de ARN (conservado a -20 °C en

RNA later). El resto del tejido fue picado y de forma homogénea dividido en distintos tubos. Las muestras de tejido colónico así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su uso.

2.4.2. Caracterización bacteriológica de los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs)

Con intención de caracterizar la integridad de la pared intestinal y la capacidad de ésta para contener la carga bacteriana en el lumen intestinal se analizó la presencia de bacterias en los MLN. Los ratones fueron sacrificados en el interior de una campana de flujo laminar para evitar que el órgano sufriera contaminación bacteriana externa. Los MLNs fueron extraídos del animal con material quirúrgico estéril, pesados manteniendo dicha esterilidad y homogenizados en 1 ml de Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) sin suplementación con ayuda de la parte posterior de una jeringa estéril de 5 ml. La caracterización bacteriológica de ese homogenado se realizó sembrando 50 µl del mismo en placas de Agar MacConkey y 100 µl en placas comerciales de Agar Brucella (*Brucella Blood agar with Hemin and VitK1*, Difco®), siendo el primero un medio específico para bacterias de la microbiota comensal por su contenido en sales biliares y el segundo, uno muy rico para facilitar el desarrollo de bacterias anaerobias. Finalmente estas placas fueron incubadas a 37 °C, durante 24 horas en aerobiosis en el primer caso, mientras que lo fueron durante 48 horas y en condiciones de anaerobiosis generadas con Anaerogen® (2,5 L por segundo). Los resultados son expresados como log (UFC)*10³/g tejido, (UFC, Unidades Formadoras de Colonias).

2.4.3. Cuantificación de LPS en hígado

Evaluamos la presencia de antígenos altamente conservados de bacterias en hígado destacando el LPS. El procedimiento seguido es una adaptación del desarrollado por Sonnenberg y col. [472]. En resumen, el hígado fue extraído en condiciones de esterilidad, pesado y un lóbulo completo homogenizado (1/3 p/v) en PBS estéril comercial (GIBCO®) preservando en todo caso las condiciones de esterilidad y de ausencia de pirógenos.

Por otro lado, el homogenado de hígado restante fue expuesto a ultrasonidos durante 45 minutos en un baño preparado para tal efecto. Con este paso aseguramos la lisis completa de las bacterias presentes. A continuación, el homogenado fue centrifugado a 10000 rpm/10 minutos/4 °C y el sobrenadante recogido en un tubo estéril y libre de pirógenos.

En este sobrenadante se procede a la determinación de LPS mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se hace una dilución 1/7,5 de la muestra en agua libre de pirógenos (Lonza®), conteniendo ésta a su vez una dilución 1/200 de Pyrospense® (Lonza®). Dicha dilución es sometida a un calentamiento de 15 minutos a 70 °C, paso tras el cual la muestra está lista para ser sometida a la determinación de LPS mediante el kit *Lymulus Amebocyte Lysate* (LAL) (QCL-1000) (Lonza®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como Unidades de Endotoxina (UE)/g de tejido.

2.4.4. Estudio *in vivo* del estado inflamatorio general por imagen

Los ratones recibieron vía intraperitoneal 25 mg/kg del reactivo L-012 (120-04891) (8-amino-5-cloro-7-fenilpirido (3,4-d) piridazina-1,4-(2H, 3H) diona) (Wako®, Osaka, Japón) utilizando como vehículo 100 µl de agua destilada estéril [473, 474]. Inmediatamente después, fueron anestesiados con isoflurano y colocados en el interior de un IVIS Spectrum Caliper® LifeSciences. A continuación, se adquirieron imágenes durante los siguientes 10-15 minutos, tiempo tras el cual comienza a decaer la señal lumínica asociada a la presencia de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con las que reacciona el reactivo administrado generando quimioluminiscencia.

2.4.5. Estudio histológico

Una de las secciones transversales de colon obtenidas tras el sacrificio fue conservada sumergiéndola en formaldehído al 4% (p/v). A continuación estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de 5 µm empleando un microtomo. Los cortes realizados fueron montados en portas y sometidos a una tinción de rutina con hematoxilina-eosina, que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio.

Se utilizó el siguiente baremo para obtener un índice histológico que indicase el estado de las muestras: infiltración leucocitaria (0-3), pérdida de células caliciformes (0-3) y pérdida de estructura de las criptas (0-3), longitud de las criptas (0-3), engrosamiento de la muscular (0-3) e infiltración de la submucosa (0-3). Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos y su valoración fue realizada de forma independiente y objetiva siguiendo un esquema de doble ciego. Este estudio se aplicó en el modelo de transferencia linfocitaria.

2.4.6. Análisis sanguíneo general

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI/ml). Con objeto de evaluar diferentes parámetros de interés en sangre, tales como hemoglobina, hematocrito, células rojas, plaquetas, células blancas en general, linfocitos, monocitos y neutrófilos, una muestra de 30 µl de ésta fue analizada en un contador hematológico (Mythic® 22CTC2 Diagnostics).

2.4.7. Obtención del plasma sanguíneo

El resto de sangre obtenida fue sometida a una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su posterior uso.

2.4.8. Determinación de glucosa en sangre

El seguimiento glucémico en la estimulación *in vivo* de anti-CD3ε, se llevó a cabo utilizando de reactivas y un glucómetro (Accu-Chek®, Aviva) tomando una pequeña muestra de sangre del extremo distal de la cola del animal, realizando para ello una pequeña incisión.

2.4.9. Determinación de la temperatura

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

3. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

3.1. Diseño experimental *ex vivo*

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

3.2. Cultivos primarios de células mononucleares

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo que fue dispuesto en medio de cultivo DMEM, suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0,1 mg/ml] y anfotericina B [2,5 µg/ml]). Se obtuvieron cultivos primarios de esplenocitos. Una vez eliminada la grasa adherida

al órgano, los bazos fueron presionados mecánicamente con la parte posterior del émbolo de una jeringa de 5 ml estéril, con objeto de desorganizar su estructura y obtener una suspensión celular. A continuación, la suspensión celular fue centrifugada a 1300 rpm/5 minutos/4 °C y el botón de células fue sometido a lisis de eritrocitos, realizada durante 30 segundos a temperatura ambiente resuspendiendo las células en un tampón de lisis comercial. Posteriormente las células fueron rápidamente lavadas para evitar daño celular alguno y filtradas para obtener una suspensión monocelular y eliminar restos del órganos de procedencia utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350). Las células mononucleares aisladas se dispusieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomicina [0,1 mg/ml] y anfotericina B [2,5 µg/ml]) y 50 µM de β-mercaptoetanol.

A continuación, se procedió al conteo celular mediante el empleo de una solución de azul tripán al 0,4% (p/v). Seguidamente, 0,5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos, siempre a una densidad celular de 1 millón de células/ml. El cultivo se realizó durante 24 o 48 horas en una atmósfera de CO₂ (5 %) y a 37 °C, empleándose como estímulos LPS (1 µg/ml) y la lectina concanavalina A (ConA) (5 µg/ml), respectivamente. Las muestras de medio de cultivo obtenidas fueron centrifugadas a 10000 rpm/5 min/4 °C y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Las células fueron recogidas en Tri Reagen® (Anbion™) para su posterior extracción de ARN.

3.3. Purificación celular magnética

Para la obtención de poblaciones purificadas de linfocitos T totales, se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania). Una vez obtenida la suspensión heterogénea de células de bazo a separar siguiendo el procedimiento anteriormente detallado, esta suspensión fue filtrada utilizando un filtro de 70 µM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión celular homogénea con la que poder proceder a la separación.

Se utilizó el kit Pan T cell Isolation Kit II (130-095-130, Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante, mediante el cual se realiza una purificación negativa de estas células en la medida que el resto de componentes celulares son marcados (CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b

(DX5), CD105, anti-MHC de clase II, and Ter-119.) y (130-042-401) usadas en este caso, obteniéndose la población de linfocitos T purificados la fracción no retenida en la columna. La pureza de la población obtenida fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EE.UU.). Estas fueron marcadas con el anticuerpo PE-CD4 (1/200, BD Biosciences®) y con FITC-CD45 (1/50, Miltenyi Biotec®)(marcador común en leucocitos). La pureza obtenida fue de alrededor del 90%.

Los linfocitos fueron cultivados a una densidad celular de 1 millón de células/ml. El cultivo se realizó durante 24 horas en una atmósfera de CO₂ (5 %) y a 37 °C, empleándose como estímulos Con A (5 µg/ml) 48 horas o anti-CD3ε (2,5 µg/ml)/anti-CD28 (2 µg/ml) 24 horas. En caso de los estudios de inhibición de la TNAP en linfocitos WT, los linfocitos se incubaron en medio de cultivo RPMI completo con los inhibidores; levamisol (1mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1mM); a 37 °C en agitación 2 horas antes de su siembra y estimulación. Las muestras de medio de cultivo obtenidas fueron centrifugadas a 10000 rpm/5 min/4°C y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su posterior utilización para la determinación de citoquinas por ELISA o Multiplex®. Las células fueron recogidas por raspado mediante 55 µl de tampón de homogeneización para la determinación de actividad AP (Tris Base [50 mM] y HTAB [bromuro de hexametiltrimetilamonio] al 0,5% [p/v]).

3.4. Ensayo de diferenciación de linfocitos T CD4 *naïve* hacia Th0, Th1, Th2 y Th17

Para la realización de este ensayo, células T *naïve* CD4⁺ CD62⁺ fueron aisladas del bazo de ratones WT y TNAP^{+/-} mediante el kit de Miltenyi® CD4⁺ CD62⁺ *T Cell Isolation Kit II*. Las células T *naïve* purificadas fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI suplementado con L-glutamina (2mM), antibióticos (1% v/v: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0,1 mg/ml], anfotericina B [2,5 µg/ml]), 10% FBS y 50 µM 2-mercaptoetanol, a 37 °C y 5% de CO₂ atmosférico en placas de 96 pocillos y a una densidad de 1 x 10⁵ células/ml. Las células fueron cultivadas con anticuerpo anti-CD3ε adherido a la placa (5 µg/ml) y anti-CD28 (1 µg/ml) (eBioscience), para inducir su activación y proliferación. Además, las células fueron estimuladas con distintos cócteles de citoquinas y anticuerpos para su diferenciación a las distintas poblaciones: Th0, Th1, Th2 y Th17 (tabla 1) durante 5 días. El linaje de las células T se verificó mediante producción intracelular de citoquinas propias (en porcentaje de células productoras) IFN-γ, IL-4 e IL-17A, respectivamente, mediante citometría de flujo.

Tabla 1. Citoquinas y anticuerpos necesarios para la diferenciación de linfocitos T naïve hacia Th 0,Th1, Th2y Th17

	Th0	Th1	Th2	Th17
anti-CD3	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
anti-CD28	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
IL-2	20 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml	20 ng/ml
IL-4			100 ng/ml	
IL-6				100 ng/ml
IL-12		20 ng/ml		
TGF-β1				1 ng/ml
anti-IL-4		10 ng/ml		10 ng/ml
anti-IFN-γ			10 ng/ml	10 ng/ml
anti-IL-12			10 ng/ml	

3.5. Ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada

Las células mononucleares fueron dispuestas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 1 millón de células por ml y un total de 0,5 ml. En caso de los estudios de inhibición de la TNAP en linfocitos WT, los inhibidores; levamisol (1mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1mM); se incubaron a 37 °C en agitación durante 2 horas antes de su siembra y estimulación. Las células fueron estimuladas con ConA (5µg/ml) o anti-CD3ε (5µg/ml) adherido a la placa y anti-CD28 (1µg/ml) soluble,y fueron expuestas a [³H]-timidina (1 µCi/ml; GE Healthcare, España) durante 24 o 48 horas, respectivamente. Tras dicho periodo de incubación, las células fueron recolectadas y sometidas a varios lavados con PBS y una solución de ácido tricloroacético al 10% (v/v). Seguidamente, se realizó la lisis celular mediante una solución 1 N de NaOH que contiene SDS al 1% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron dispuestas en viales adecuados a los que se les añadió 3 ml de líquido de centelleo (Beckman Coulter, Madrid, España). La radioactividad contenida en el vial y debida a la incorporación de la timidina tritiada en las células fue cuantificada mediante un analizador de

centelleo líquido Beckman LS-6000 (Madrid, España). Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm).

4. TÉCNICAS GENERALES

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

Para la caracterización de los ratones heterocigotos para TNAP, distintos tejidos fueron extraídos y homogeneizados mecánicamente (utilizando un sistema de bolitas que golpean y homogeneizan las muestra, Bullet Blender®), o en el caso de células recogidas por raspado, en un tampón compuesto por Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5% (p/v) y sometidas a sonicación. Una vez centrifugado el homogenado o las células, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividad enzimática en los distintos tejidos, así como en plasma y linfocitos (basales y estimulados con anti-CD3 ϵ /anti-CD28). La actividad fosfatasa alcalina (AP) fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sánchez de Medina y col. en el cual el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el *p*-nitrofenilfosfato sódico en tampón glicina 50 mM con MgCl₂ 0,5 mM (pH 10,5) [14]. Los resultados se expresan como mU/mg de proteína.

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en colon, utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de *o*-dianisidina en presencia de H₂O₂ [475]. Los resultados fueron expresados como mU/mg de proteína.

4.2. Ensayo de toxicidad por lactato deshidrogenasa (LDH)

La medida de lactato deshidrogenasa (LDH) es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima se encuentra en el citoplasma de células vivas, siendo liberado al medio de cultivo celular al dañarse la membrana plasmática celular o con la muerte de la célula.

Este ensayo fue utilizado para la determinación de la toxicidad de los linfocitos a los inhibidores de TNAP: levamisol (1mM), fenilalanina (5 mM) y teofilina (1mM). El ensayo fue realizado en el sobrenadante del cultivo de las células tras 24 horas, en condiciones basales y en estímulo con anti-CD3 ϵ /anti-CD28, mediante un kit de detección de LDH, *Pierce LDH cytotoxicity assay kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). La cuantificación de la LDH se lleva a cabo mediante una reacción enzimática acoplada en la que la LDH cataliza la conversión de lactato a

piruvato via reducción de NAD^+ a NADH . Las células fueron cultivadas en RPMI completo sin rojo fenol, ya que la detección de LDH genera un producto rojo formazán. La reacción se desarrolla con 50 μl de sobrenadante de las células y 50 μl de mezcla de reacción durante 30 minutos y la absorbancia se mide a 490 nm y 680 nm.

4.2. Determinación de la secreción de citoquinas en sobrenadante de cultivo celular, en plasma y en homogenado de colon mediante ELISA y Multiplex®

Tras el cultivo de los distintos tipos celulares, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos y a 4 °C para eliminar los restos celulares y conservado a -80 °C hasta su utilización. Para la detección de citoquinas de ratón mediante ELISA los kits para determinar IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e IL-17A fueron suministrados por eBioscience (San Diego, California, EE. UU.), mientras que el kit IL-10 fue suministrado por R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.).

Se estudió la concentración de citoquinas en un fragmento de colon del experimento de transferencia, homogeneizado el tejido 1:5 en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) conteniendo Tritón X-100 1% (v/v) y un cóctel de inhibidores de proteasas en proporción 1/200 (Sigma-Aldrich, P8340), así como en los sobrenadantes de linfocitos estimulados con anti-CD3 ϵ /anti-CD28 de ratones WT y TNAP^{+/-} o WT incubados con inhibidores de TNAP mediante ELISA y multidetección por inmunoensayo (Multiplex®), detectando $\text{TNF-}\alpha$, IL-17A, IL-10 e IL-4 mediante un kit de ratón ProcartaPlex®. En el último caso, la lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation). En general, los resultados se expresan como pg/ml.

4.3. Extracción de ARN de linfocitos y secuenciación

El ARN total de las distintas muestras fue obtenido usando *RNease Mini Kit* (Qiagen). La cantidad y calidad del ARN fue evaluada mediante *Qubit dsDNA Assay Kit* (LifeTechnologies, Cat.#32855) y *Agilent RNA Nano Chips* (AgilentTechnologies, Cat.#5067-1511), respectivamente. A partir de 500 ng de ARN total, el ARNm fue purificado, fragmentado y preparado para la síntesis de ADNc. La primera hebra de ADNc fue sintetizada mediante *Super Script-II Reverse Transcriptase* (LifeTechnologies, Cat.#18064-014) durante 10min a 25 °C, 15 min a 42 °C, 15 min a 72 °C. La segunda hebra de ADNc fue sintetizada con los reactivos de Illumina a 16 °C durante 1 hora. Seguidamente, se añadió una cola de poli-A así como la mezcla de ligadura. Finalmente, se consiguió mediante PCR un

enriquecimiento de librerías (30seg a 98 °C; 15 ciclos: 10seg a 98 °C, 30seg a 60 °C y 30seg a 72 °C; 5min a 72 °C).

Más tarde, las bibliotecas fueron visualizadas mediante *Agilent 2100 Bioanalyzer* con el kit *Agilent High Sensitivity DNA kit* (Agilent Technologies, Cat.#G2938-90320) y cuantificadas mediante una qPCR con el kit *Kapa Library Quantification Kit* (Master Mix and DNA Standards, KAPA–Biosystems Cat.#KK4824) y *Qubitds DNA HS DNA Kit* (LifeTechnologies, Cat.#32851). La secuenciación de lectura simple de 50 nucleótidos se llevó a cabo mediante HiScanSQ platform (IlluminaInc.). Todas las librerías se dividieron en 2 grupos, cada uno de los cuales fue secuenciado en dos vías (lanes) de lectura a una concentración final de 4 pM (con la intención de secuenciar cada librería con 0,495 pM por vía (lane)).

4.4. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción

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

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

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando SYBR® Green como fluoróforo (GoTaq® qPCR Supermix, Promega, Francia) para el análisis de la expresión de diversos genes. El gen de referencia elegido fue la subunidad 18 S del ARN ribosómico (*18s*). Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la Tabla 2, teniendo en cuenta que en todos los casos la especie de interés fue el ratón.

4.6. Citometría de flujo

Para el análisis de la expresión de determinados marcadores celulares y por tanto el estudio de la abundancia relativa de diferentes subpoblaciones celulares de carácter inmunológico, se hizo uso de un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EE. UU.). Las células fueron marcadas y preparadas para

su análisis de la siguiente manera. Tras su obtención, fueron lavadas con tampón de marcaje para citometría de flujo (PBS, BSA 2 % (m/v), EDTA 10 mM, Azida 0,1% (m/v)). Seguidamente se les realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos, todos ellos suministrados por BD Biosciences® (California, EE. UU.). Se utilizaron diluciones que oscilan entre 1/100 y 1/200, excepto el anti-mouse CD45-FITC (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Alemania) que fue usado a una dilución de 1/50. En la misma solución de marcaje se incluye mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 (eBiosciences®, San Diego, CA, EE. UU.) a una dilución de 1/500. Transcurridos 30 minutos de exposición a anticuerpos superficiales a 4 °C, las células fueron lavadas y fijadas en PBS-paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a 4 °C, lavadas una vez y finalmente resuspendidas en tampón de marcaje hasta su adquisición.

En el caso de los marcajes intracitoplásmicos (INF- γ , IL-4 e IL-17A) las células fueron estimuladas durante 4 horas en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) con forbol-12-miristate-13-acetato (PMA) (50 ng/ml) e ionomicina (250 ng/ml) con bloqueo concomitante del aparato de Golgi mediante brefeldina A (660 ng/ml), con el kit *BD GolgiPlug*™. Esto permitió la producción y después el acúmulo de las citoquinas en el aparato de Golgi. Tras la incubación se realizó el marcaje superficial de CD4. Tras el lavado de las células, éstas fueron permeabilizadas usando el kit *BD Cytofix/Cytoperm*™ *Fixation/Permeabilization Solution Kit* durante 30 min. Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos (BD Biosciences®, California, EE. UU.) para el marcaje intracelular a una dilución 1/100 en tampón de permeabilización durante toda la noche a 4 °C.

En el caso del marcaje de *forkhead box p-3* (Foxp3) de localización nuclear, una vez realizado el marcaje de moléculas superficiales, las células fueron permeabilizadas usando el kit específico de permeabilización nuclear (*Foxp3 transcription factor fixation/permeabilization*, eBiosciences®, San Diego, CA, EE. UU.), marcadas usando el anticuerpo Foxp3-PerCP (eBiosciences®, San Diego, CA, EE. UU.) a una dilución de 1/150 e incubados durante toda la noche a 4 °C.

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

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). Los valores obtenidos representan el valor medio entre

hembras y machos. Para determinar la significación estadística, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). En caso de comparación de muestras apareadas se utilizó el análisis t-student. La significación estadística se consideró para un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática GraphPad Prism 6. (GraphPad Software Inc, California, EE. UU.).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Gen	Hebra sentido 5'-3'	Hebra antisentido 3'-5'
<i>18s</i>	ACACGGACAGGATTGACAGATTG	GCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG
<i>Alpl</i>	ATTCCCACTATGTCTGGAAC	CTCAAAGAGACCTAAGAGGTAG
<i>Cd11b</i>	AAGATCTTTGCAATTGAGGG	CTCTGGTTGTGTTGATGAAG
<i>Cd40</i>	ATAATGAGATCTTACCCCCTG	CTCTCTTACCATCCTCCTG
<i>Cxcl9</i>	GAGGAACCCTAGTGATAAGG	GTTTGATCTCCGTTCTTCAG
<i>Emr1</i>	TTTCAAATGGATCCAGAAGG	CAGAAGGAAGCATAACCAAG
<i>Foxp3</i>	AATAGTTCCTTCCCAGAGTTC	GGTAGATTTTCATTGAGTGTCC
<i>Gata3</i>	TATTAACAGACCCCTGACT	CACCTTTTTIGCACTTTTTTCG
<i>IFNγ</i>	TGAGTATTGCCAAGTTTGAG	CTTATTGGGACAATCTCTTCC
<i>Il10</i>	CAGGACTTTAAGGGTACTTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
<i>Il17a</i>	ACGTTTCTCAGCAAACCTAG	CCCCTTACACCTTCTTTTC
<i>Il22</i>	ATCAGTGCTACCTGATGAAG	CATTCTTCTGGATGTTCTGG
<i>Il4</i>	CTGGATTCATCGATAAGCTG	TTTGCATGATGCTCTTTAGG-
<i>Il5</i>	AGACTTCAGAGTCATGAGAAG	GCTGGTGATTTTATGAGTAGG
<i>Il6</i>	AAGAAATGATGGATGCTACC	AGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
<i>Klf4</i>	CCCCTCTCTCCATTATCAAG	CTCTTGGTATAGGTTTGGCC
<i>S100a8</i>	GCCCTCTACAAGAATGACTTCAAG	ATCACCATCGCAAGGAACTCC
<i>Spib</i>	ACACTTAAGCTGTTTGATACC	TCTGAATCTGGGTAAGTGAAG
<i>Spp1</i>	GGATGAATCTGACGAATCTC	GCATCAGGATACTGTTTCATC
<i>Tbx21</i>	ACGTCTTTACTTTCCAAGAG	GTACATGGACTCAAAGTTC
<i>Tnf</i>	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN HETEROCITOGO PARA LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ALCALINA NO ESPECÍFICA DE TEJIDO

Con el objeto de estudiar la implicación de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) en el sistema inmunológico utilizamos ratones heterocigotos para la expresión de TNAP, ya que los KO homocigotos no son viables, consecuencia de una defectuosa mineralización ósea y del desarrollo de ataques epilépticos asociados a un metabolismo imperfecto de piridoxal 5'-fosfato (aumentando sus niveles en plasma y resultando en bajos niveles de GABA en el cerebro)[126]. El fenotipo de los ratones heterocigotos (TNAP^{+/-}) es totalmente normal, en apariencia y comportamiento general son indistinguibles de los ratones *wild type* (WT; TNAP^{+/+}), lo que hace necesario su genotipado.

Además, se determinó la expresión TNAP (ARNm de *Alpl* por qRT-PCR) y la actividad fosfatasa alcalina (del inglés AP) en diversos tejidos de ratones TNAP^{+/-}. Como era de esperar, la presencia de un único alelo de *Alpl* resultó en una disminución de los niveles de ARNm en aproximadamente el 50-60% en todos los tejidos analizados (figura 1A). Estos resultados se correlacionan con una disminución similar en la actividad enzimática de AP en riñón e íleon, no siendo así en otros órganos, donde no se aprecian cambios significativos. (figura 1B). El estudio de la inhibición específica de la isoforma TNAP por el inhibidor levamisol contribuyó a un mejor entendimiento de la expresión de la enzima en los ratones TNAP^{+/-}. Las isoformas ósea y renal de TNAP son muy sensibles a la inhibición por levamisol, mientras que la isoforma hepática y la fosfatasa alcalina intestinal (IAP) son resistentes, o incluso podrían tener una actividad AP potenciada por levamisol. Como se aprecia en la figura 1C, la actividad AP en los órganos de ratones TNAP^{+/-} muestra en general una menor inhibición por levamisol *in vitro*, y en los casos en que levamisol tuvo efecto estimulante (mostrado como valores negativos de inhibición, como en colon e hígado), hubo una tendencia al aumento de la estimulación AP en estos ratones.

De conformidad con estos resultados, la actividad AP plasmática no presentó diferencias (figura 2A), aunque la sensibilidad a la inhibición por levamisol *in vitro* fue mucho menor (50%) (figura 2B).

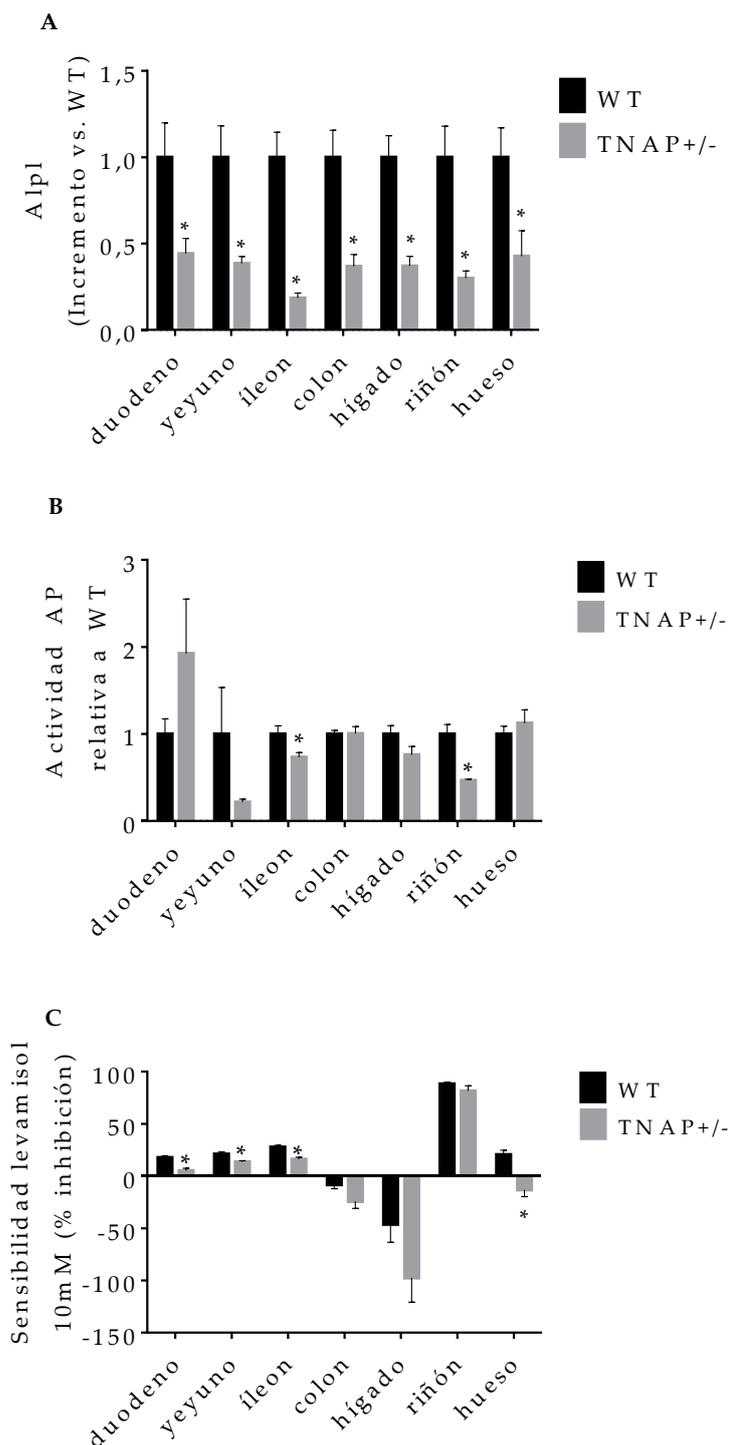


Figura 1. Expresión y actividad AP en el ratón TNAP^{+/-}.(A) Expresión génica de Alpl (TNAP) relativa a WT medida por qRT-PCR; (B) actividad AP relativa a WT (valores absolutos en tabla1); (C) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media \pm EEM (n=5-10). Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. * $p < 0,05$ frente a WT. Alpl= fosfatasa alcalina no específica de tejido.

Tabla1. Valores absolutos de actividad AP en diferentes tejidos. Datos expresados como media \pm EEM (n=5-10). Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. * $p < 0,05$ frente a WT.

	<i>Actividad AP (mU/mg proteína)</i>	
	WT	TNAP ^{+/-}
DUODENO	6776 \pm 1182	13045 \pm 4240
YEYUNO	5713 \pm 3044	1242 \pm 190,3
ÍLEON	142,6 \pm 13,3	104,7 \pm 7,6*
COLON	43,6 \pm 1,7	43,8 \pm 3,5
HIGADO	22,0 \pm 2,1	16,7 \pm 2,1
RIÑÓN	859,3 \pm 94,0	462,6 \pm 57,3*
HUESO	31,4 \pm 2,8	35,4 \pm 4,8

Estos datos sugieren que la falta de un alelo *Alpl* en el ratón heterocigoto conlleva relativamente pequeños cambios en los niveles de actividad enzimática, mientras que los cambios se aprecian a nivel de sensibilidad a levamisol, sugiriendo un cambio en la isoforma enzimática, presumiblemente unidos a diferencias en los patrones de glicosilación.

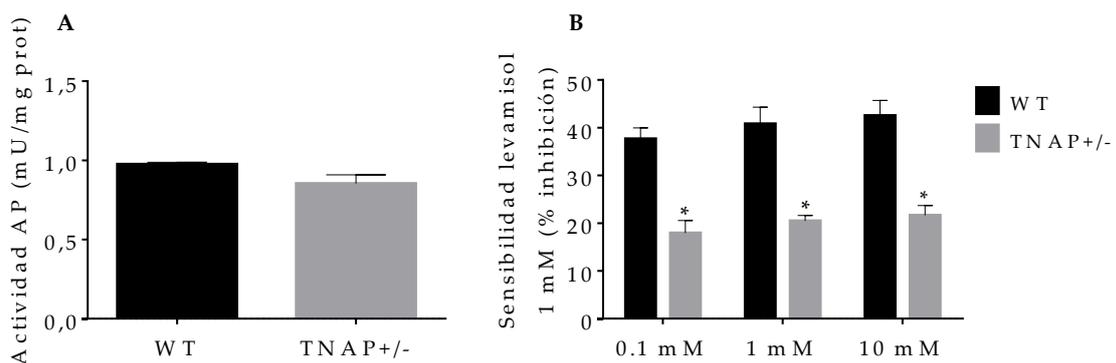


Figura 2. Actividad AP en plasma de ratones WT y TNAP^{+/-}. (A) Actividad AP; (B) sensibilidad de AP a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media \pm EEM (n=4). Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. * $p < 0,05$ frente a WT.

Una vez caracterizada la TNAP en distintos tejidos, estudiamos el papel de la TNAP en las células del sistema inmunológico. Estudios previos de nuestro grupo de investigación, sugerían que en modelos de inflamación intestinal en roedores se producía una inducción de la actividad AP a nivel colónico y un cambio de isoforma asociado, que presumiblemente está ligado a la infiltración leucocitaria asociada a la inflamación.

Lo primero que estudiamos fue la respuesta de esplenocitos de bazo de ratones WT y TNAP^{+/-} frente al lipopolisacárido bacteriano (LPS) *ex vivo*. La expresión de TNAP fue evaluada tras 24h de exposición a LPS. Los niveles de ARNm fueron muy bajos en condiciones basales, aunque tras la estimulación se incrementó varias veces la expresión en esplenocitos WT (figura 3A), incremento que fue notablemente inferior en células TNAP^{+/-}.

En términos de respuesta inmunológica, la activación de esplenocitos con LPS resultó en un incremento en la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α (la producción de citoquinas en estado basal fue insignificante o por debajo del nivel detectable con los kits de ELISA, y por ello los datos no son mostrados). La inducción en la producción de ambas citocinas fue menor en las células de los ratones TNAP^{+/-} que en las WT (un 37 y un 70% menor, respectivamente) (figura 3B).

De forma similar, la estimulación de células de bazo mediante concanavalina A (ConA) supuso una acentuada liberación de IFN- γ e IL-17A por parte de linfocitos T activados, que fue menor en células procedentes de ratones TNAP^{+/-} (20 y 50% menor, respectivamente) (figura 3C). Como en los casos anteriores, la producción de citoquinas en estado basal fue insignificante o por debajo del nivel detectable con los kits de ELISA, y por ello los datos no son mostrados.

Los datos mostrados, nos aportaron evidencias consistentes que apuntaban a que la depleción parcial de la TNAP estaba implicada en la respuesta de la población celular heterogénea del bazo cultivada *ex vivo* con LPS y ConA.

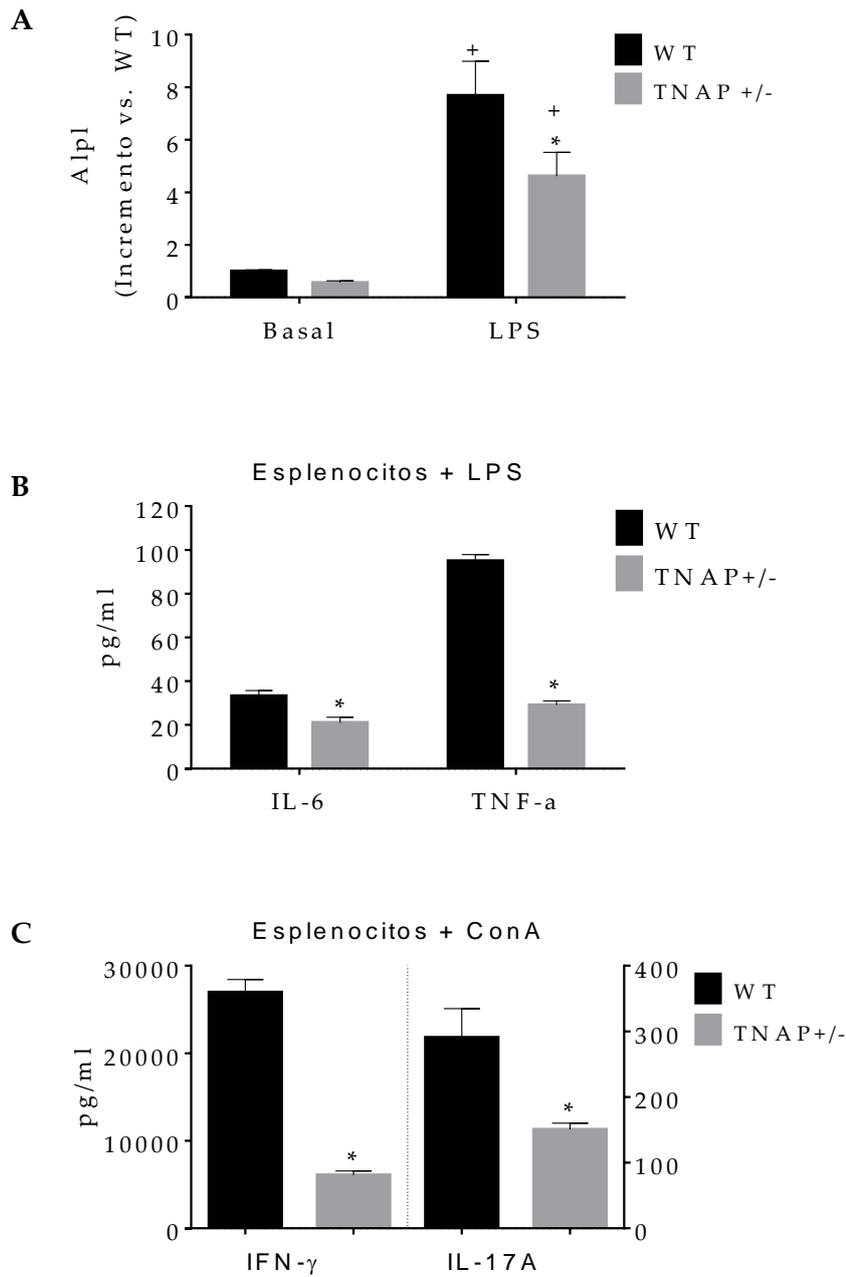


Figura 3. Respuesta de esplenocitos WT y TNAP^{+/-} a estímulos LPS y ConA. (A) Expresión de Alpl (TNAP) en esplenocitos cultivados *ex vivo* y estimulados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (n=6). Los resultados son expresados como incremento respecto al grupo WT basal. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. (B) Producción de IL-6 y TNF- α por esplenocitos estimulados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (WT n=5 y TNAP n=6). (C) Producción de IFN- γ e IL-17A por esplenocitos estimulados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de ConA (n=6). Los esplenocitos fueron cultivados *ex vivo*, el sobrenadante fue recogido a las 24h y analizado por ELISA. Los resultados son expresados en pg/ml como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test.* $p < 0,05$ frente a WT; + $p < 0,05$ frente a basal. Alpl= fosfatasa alcalina no específica de tejido.

Por tanto, el siguiente objetivo fue comprobar dichos resultados en la población purificada (> 90%) de linfocitos T del bazo de ratones WT y TNAP^{+/-} mediante separación magnética celular para evaluar el papel de la TNAP específicamente en este tipo celular. En primer lugar, las células T fueron estimuladas con ConA durante 24h y los niveles de producción de INF- γ fueron determinados en el sobrenadante (figura 4A). Al igual que en el caso de los esplenocitos, las células T procedentes de ratones heterocigotos exhibieron una acentuada reducción en la producción de esta citoquina (de aproximadamente el 90%, figura 4A). No se muestran los datos basales por no haber podido detectar la citoquina con la metodología utilizada.

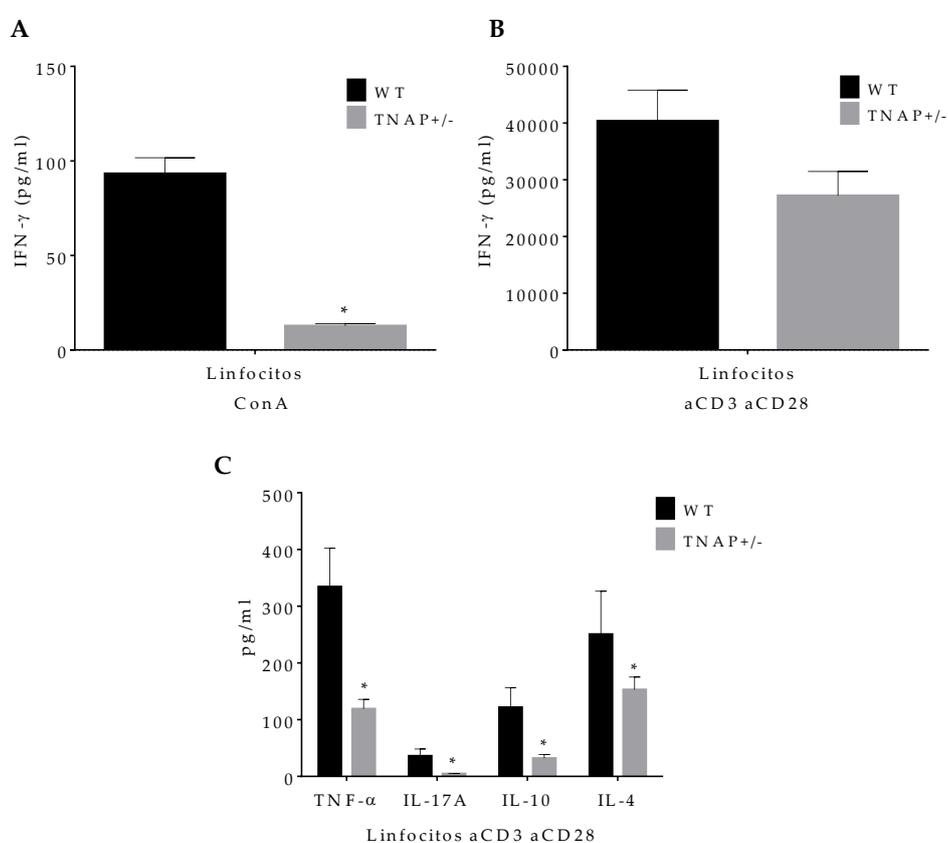


Figura 4. Producción de citoquinas por linfocitos T estimulados con ConA y anti-CD3/anti-CD28. Los linfocitos T de animales WT y TNAP^{+/-} fueron cultivados 24h *ex vivo* y se determinó por ELISA los niveles de INF- γ estando estimulados con (A) ConA o (B) anti-CD3/anti-CD28 (n=6). (C) Determinación de TNF- α , IL-17A, IL-10 e IL-4 por Multiplex® (WT n=8 y TNAP n=9). La producción de citoquinas fue insignificante en condiciones basales (datos no mostrados). Las concentraciones fueron expresadas como medias \pm EEM (pg/ml). Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. Los resultados fueron * $p < 0,05$ frente a WT.

Habiendo comprobado la baja estimulación de los linfocitos T de células TNAP^{+/-} por parte de la lectina ConA, propusimos una estimulación más específica y fisiológica de las células T de bazo, la activación mediante los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. Esta estimulación imita parcialmente la estimulación por APC, en el contexto de MHC. Los anticuerpos específicos para el complejo TCR-CD3 proporcionan una activación inicial que es potenciada con la coestimulación de la molécula de adhesión CD28. Como consecuencia de esta mejor activación, la producción de citoquinas estuvo aumentada en más de 400 veces respecto a la estimulación con ConA (en caso de WT).

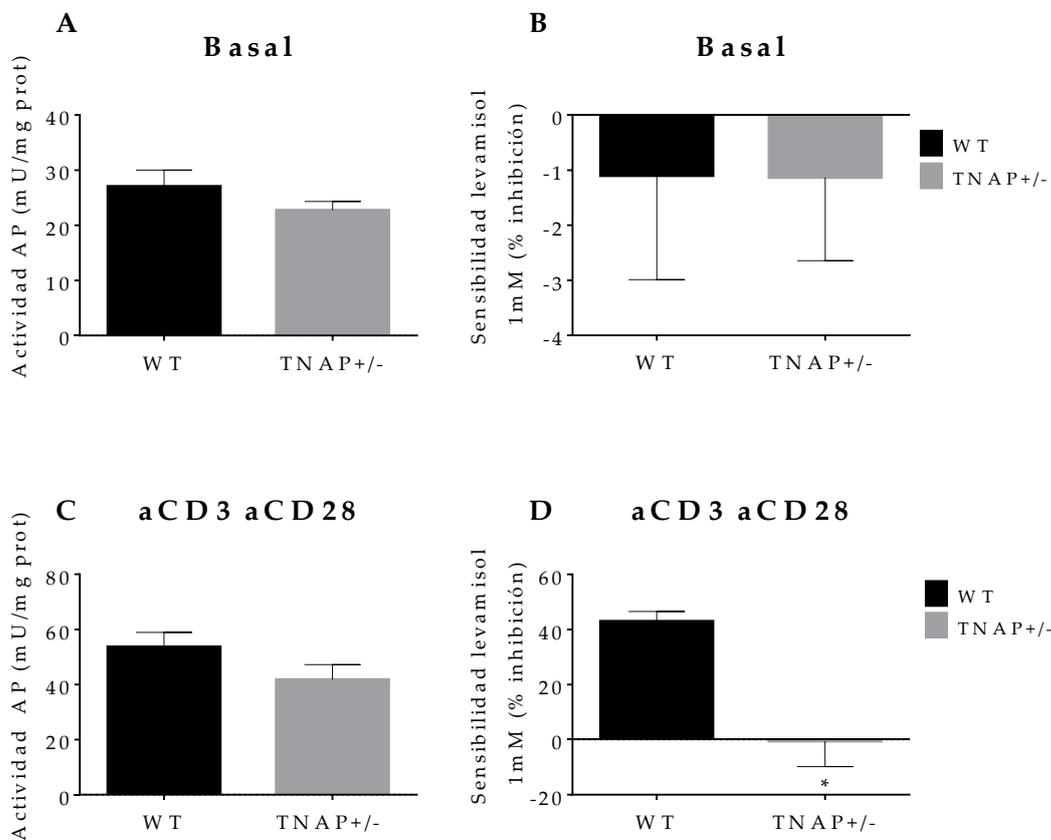


Figura 5. Actividad AP en linfocitos T de ratones WT y TNAP^{+/-} (A) La actividad AP y (B) la sensibilidad a levamisol (1 mM) en condiciones basales fue medida en 12x10⁶ de linfocitos WT y TNAP^{+/-} (n=4). (C) Para la medida de AP y (D) la sensibilidad a levamisol (1 mM), las células fueron estimuladas con anti-CD3 (2.5µg/ml)/anti-CD28 (2µg/ml) (n=6). Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. Los resultados fueron expresadas como media ± EEM; * *p* < 0,05 frente a WT.

Las células T procedentes de ratones TNAP^{+/-} volvieron a mostrar una caída en la producción de IFN- γ , aunque esta vez de forma menos pronunciada (aproximadamente del 30%, $p= 0,1$, figura 4B). A fin de caracterizar el perfil completo de citoquinas producidas por células T se determinaron, mediante Multiplex®, los niveles de TNF- α , IL-17A, IL-10 e IL-4, estando disminuidas significativamente la producción de todas ellas en los linfocitos procedentes de ratones TNAP^{+/-}.

En este último experimento de estimulación con anti-CD3/anti-CD28, y con el fin de correlacionar la menor estimulación de las células T de ratones heterocigotos anteriormente vista con la actividad AP, se determinó la actividad AP así como la sensibilidad al inhibidor levamisol (figura 5C-D). No se encontraron diferencias en actividad AP entre células WT y TNAP^{+/-}, aunque la actividad AP en linfocitos T fue claramente sensible a levamisol mientras que las células T de TNAP^{+/-} no lo fueron (figura 5D).

Con el fin de evaluar si en condiciones basales también se producían estas diferencias, se evaluó el perfil de actividad AP linfocitos T totales de ratones WT y TNAP^{+/-} en condiciones basales, así como la sensibilidad al inhibidor levamisol (figura 5A-B). Tanto la actividad AP como la sensibilidad a levamisol fueron comparables en células T en condiciones basales.

Con objeto de confirmar que los resultados anteriormente expuestos eran consecuencia de la depleción de un alelo de *Alpl* (y por tanto de la menor expresión de AP), y no por el desarrollo de alguna mutación en la generación del ratón knockout, donde se inactiva el gen en células madre embionarias vía recombinación homóloga [39], se realizó un experimento de inhibición exógena de la TNAP en linfocitos T de ratones WT.

Así, se estudió el efecto de la inhibición de TNAP en la función de células T estimulando linfocitos obtenidos de animales WT con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de los inhibidores incompetivos de TNAP levamisol, fenilalanina (Phe) y teofilina [92, 97, 476]. En comparación con otras isoformas de AP, la TNAP (subtipos hueso y riñón) es más sensibles a la inhibición por levamisol y teofilina, aunque hay que tener en cuenta que teofilina aumenta la concentración intracelular de AMPc [93], lo que desencadenará un efecto adicional sobre la activación y proliferación de células T pudiendo cambiar el perfil de inhibición [94]. Por otro lado, fenilalanina inhibe todas las isoformas de AP pero con una selectividad mayor hacia las APs placentaria e intestinal [96, 477]. Las células T fueron preincubadas con los

inhibidores de TNAP 2 horas antes del estímulo con anti-CD3/anti-CD28. Tras 24 horas de cultivo, el sobrenadante de las células fue analizado por ELISA y Multiplex® para el estudio de la producción de citoquinas, revelando una marcada reducción en los niveles de todas las citoquinas estudiadas cuando las células fueron expuestas a inhibidores de TNAP, siendo esta reducción comparable a la observada en las células T de animales heterocigotos para TNAP^{+/-} frente a las WT (figura 6).

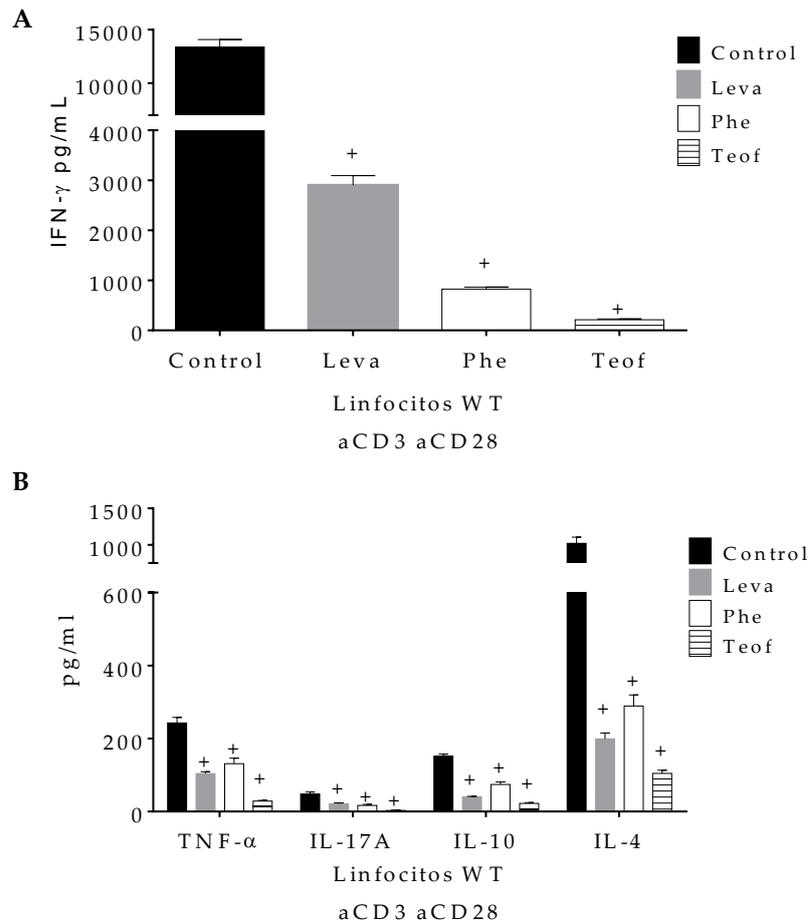


Figura 6. Caracterización de células T procedentes de animales WT expuestas a inhibidores TNAP. Los linfocitos fueron preincubados con levamisol (1 mM), fenilalanina (5 mM) o teofilina (1 mM) durante 2h. A continuación, las células T fueron estimuladas con anti-CD3ε(2.5 µg/ml)/anti-CD28(2 µg/ml) durante 24h. Se determinó la producción de (A) IFN-γ y (B) TNF-α, IL-17A, IL-10 e IL-4 en el sobrenadante, mediante ELISA (A) o Multiplex (B). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de una vía. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (pg/ml) (n=8); + $p < 0,05$ frente a control. Leva=levamisol, Phe=fenilalanina, Teof=teofilina.

Es importante indicar que antes de la realización de este experimento se estudió la ausencia de citotoxicidad de todos los inhibidores de TNAP sobre las células T a las concentraciones ensayadas mediante la detección de LDH en el sobrenadante de linfocitos tras 24 horas de exposición a los inhibidores, tanto en estado basal como estimulados con anti-CD3 ϵ /anti-CD28. Tan sólo en el caso de levamisol se observó un 10% de toxicidad en condiciones basales y un 5% al estimular con anti-CD3 ϵ /anti-CD28, valores que se aceptaron como no tóxicos (datos no mostrados).

2. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1 Implicación de la TNAP en la activación *in vivo* de linfocitos T

El siguiente paso fue comprobar si las diferencias en la producción de citoquinas por las células del bazo era reproducible en un modelo *in vivo*. Para ello utilizamos un modelo de activación sistémica de linfocitos mediante la administración intraperitoneal de 50 μ g/ratón de anti-CD3 ϵ . El modelo característicamente provoca una hipotermia corporal e hipoglucemia [478], que fue detectada en ratones WT y heterocigotos (figura 7A-B), así como un aumento de los niveles plasmáticos de IFN- γ y TNF- α por los linfocitos activados (figura 7C-D).

No se observaron diferencias en la temperatura corporal ni en los niveles de glucosa entre ambos grupos tratados WT y TNAP^{+/-}; sin embargo, sí se vieron reducidos los niveles plasmáticos de citoquinas en ratones heterocigotos tratados con anti-CD3 ϵ , siendo esta reducción frente a WT significativa en el caso de TNF- α (figura 7C). Esta menor estimulación *in vivo* por parte de los linfocitos T de ratones TNAP^{+/-} pudo observarse también en esplenocitos de bazo cultivados *ex vivo* en condiciones basales durante 24 h (figura 8). De hecho, se observó una menor producción de IFN- γ respecto al WT estimulado. Por otro lado, la producción de TNF- α por parte de estas células fue indetectable (datos no mostrados).

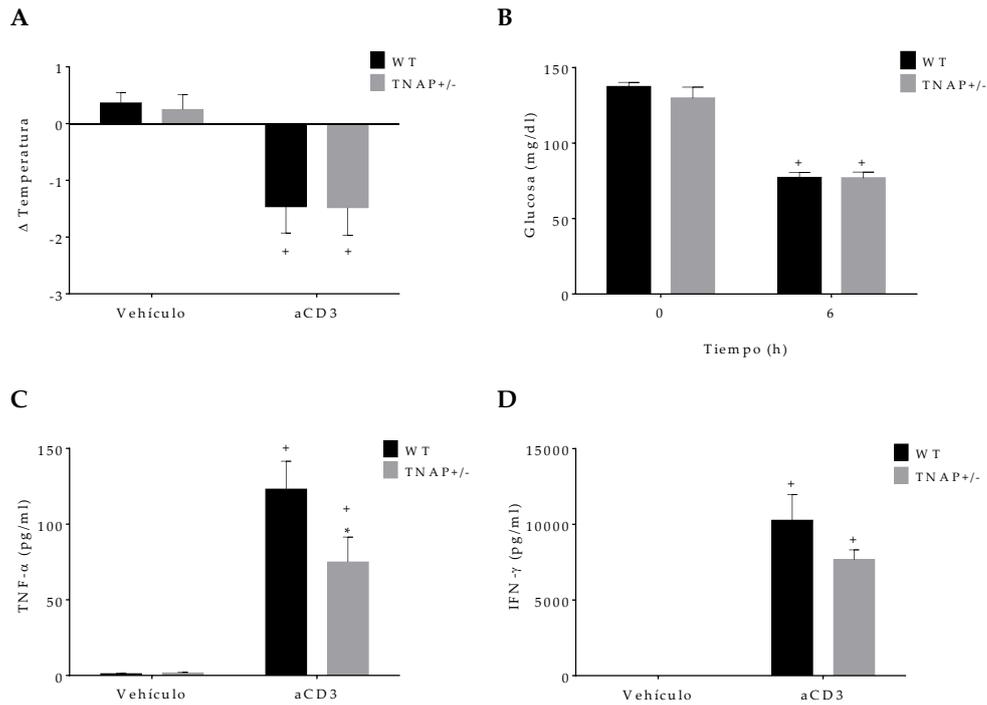


Figura 7. Estimulación de células T *in vivo* mediante anti-CD3ε. (A) Temperatura corporal y (B) niveles de glucosa en sangre y niveles plasmáticos de citocinas (Cy D) en ratones WT y heterocigotos para TNAP (TNAP+/-) controles (vehículo; n=4) y tratados con anti-CD3ε (aCD3; n=6). (C) TNF-α y (D) IFN-γ. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (mg/dl o pg/ml); * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente vehículo.

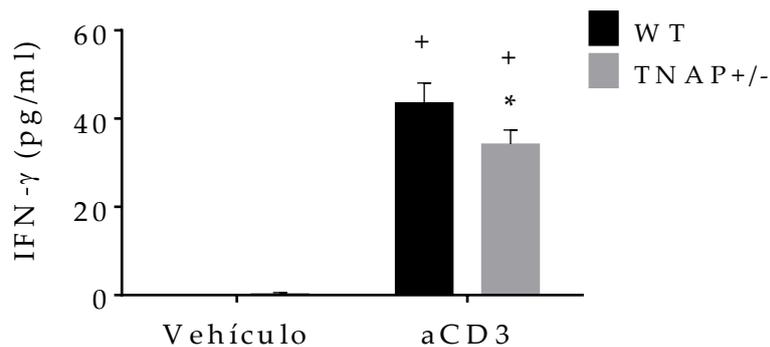


Figura 8. Producción de IFN-γ por esplenocitos *ex vivo* tras la administración de anti-CD3 *in vivo*. Los esplenocitos de ratones WT y heterocigotos para TNAP (TNAP+/-) controles (vehículo; n=8) y tratados con anti-CD3ε (aCD3; n=12) fueron cultivados durante 24 horas. Los sobrenadantes fueron recogidos y analizados mediante ELISA. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (pg/ml); * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente vehículo.

Con el fin de caracterizar mejor el fenotipo de las células T de ratones TNAP^{+/-}, además de cultivar los esplenocitos tras la activación *in vivo* con anti-CD3 ϵ (ver arriba), se purificaron, a partir de esplenocitos, linfocitos T totales mediante separación magnética celular (Miltenyi®). A continuación se obtuvo ARNm para su posterior secuenciación. Se utilizaron técnicas de secuenciación masiva con fines exploratorios, con el objetivo de detectar los genes con mayor variabilidad de regulación entre animales WT y heterocigotos para TNAP. En el estudio de secuenciación se observaron diferencias en la expresión de diversos genes relativos a la inflamación, así como otros relacionados con la activación, proliferación o función de linfocitos T. Esto nos permitió seleccionar genes para el análisis post-genómico mediante PCR cuantitativa a tiempo real los genes con mayores diferencias de expresión observados en la secuenciación (figura 9 y figura 10).

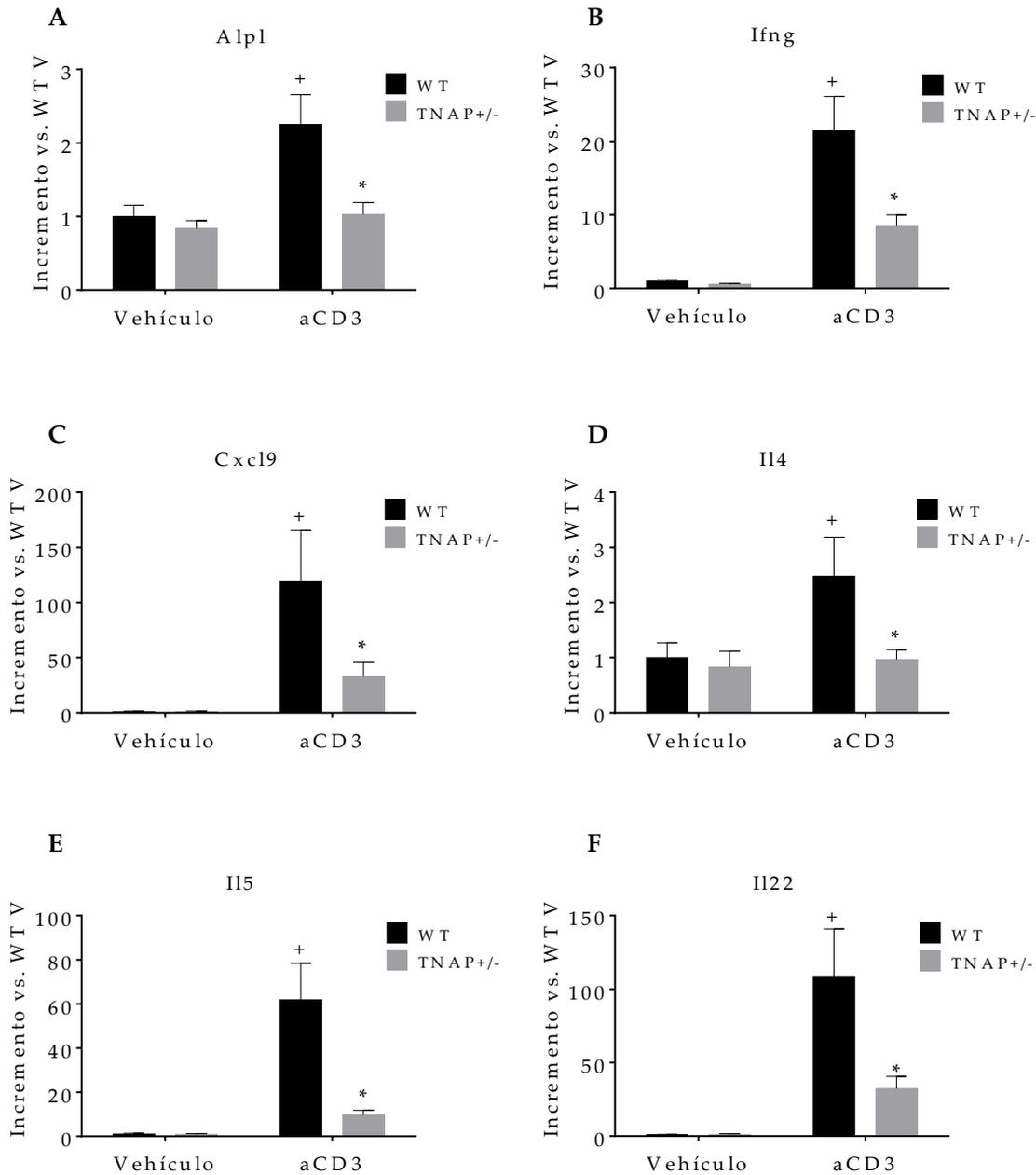


Figura 9. Expresión génica de marcadores inflamatorios en células T tras administración *in vivo* de anti-CD3ε. Niveles de ARNm estudiados mediante qRT-PCR en linfocitos T de ratones C57BL/6J WT y heterocigotos para TNAP (TNAP+/-) y tratados con anti-CD3ε (aCD3; n=6) o con el vehículo (n=4). (A) *Alpl*, (B) *Ifng*, (C) *Cxcl9*, (D) *Il4*, (E) *Il5*, (F) *Il22*. Los linfocitos T de bazo fueron aislados por separación magnética celular. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media ± EEM; * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente vehículo. *Alpl*= fosfatasa alcalina no específica de tejido; WT V= WT vehículo.

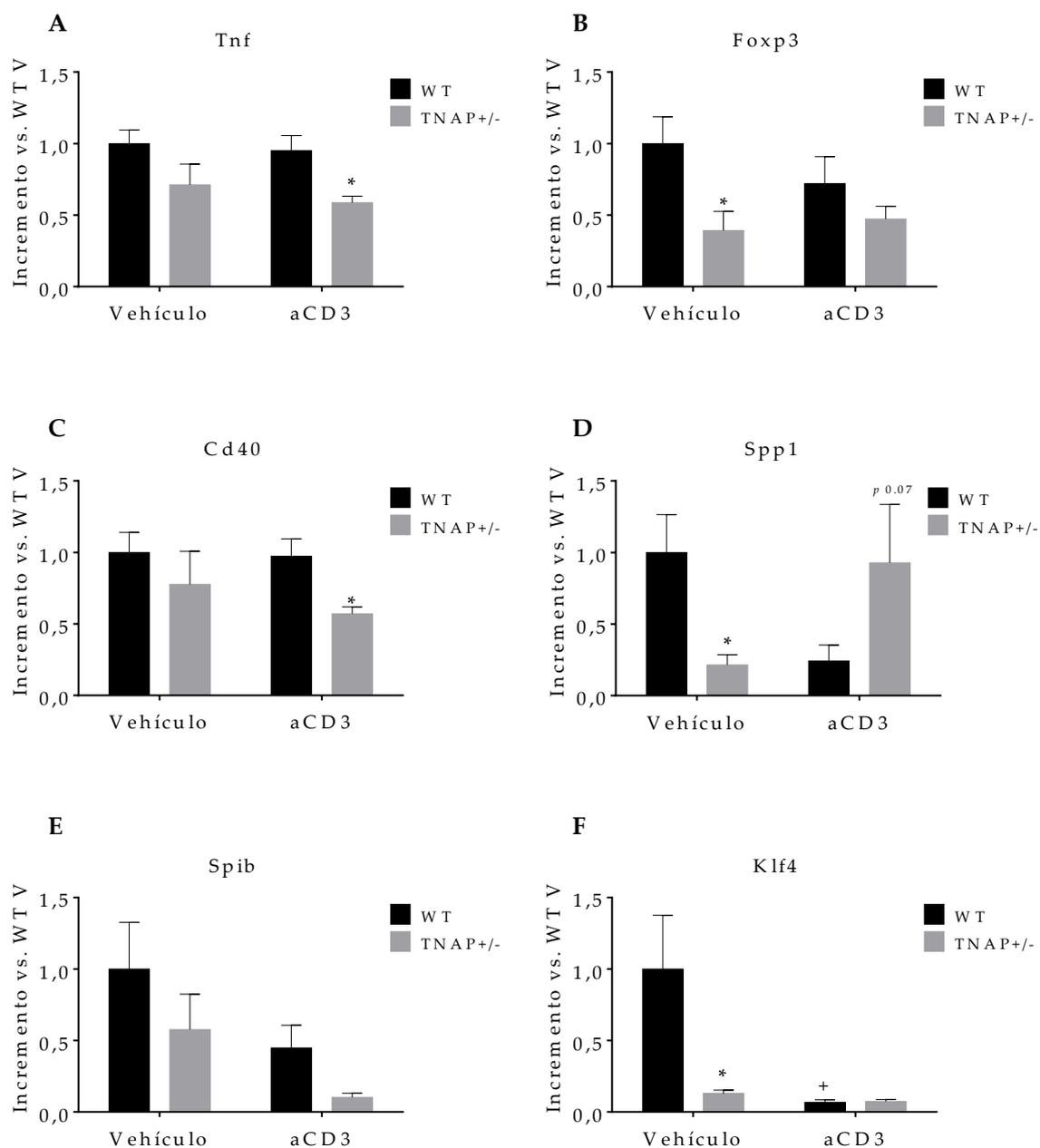


Figura 10. Expresión génica de marcadores inflamatorios en células T tras administración *in vivo* de anti-CD3. Niveles de ARNm estudiados mediante qRT-PCR en linfocitos T de ratones C57BL/6J WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) y tratados con anti-CD3 ϵ (aCD3; n=6) o con el vehículo (n=4). (A) *Tnf*, (B) *Foxp3*, (C) *Cd40*, (D) *Spp1*, (E) *Spib* y (F) *Klf4*. Los linfocitos T de bazo fueron aislados por separación magnética celular. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM; * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente vehículo. *Spp1*= Osteopontina; *Spib*= Spi-B transcription factor; *Klf4*= Kruppel-like factor 4; WT V= WT vehículo

La inducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación en linfocitos T, tras la administración *in vivo* de anti-CD3 ϵ fue menor en ratones heterocigotos para TNAP que en ratones WT; siendo algunos de los más afectados TNAP (*Alpl*), *Ifng*, *Cxcl9*, *Il4*, *Il5* e *Il22* (figura 9). Cabe señalar la inducción de la expresión de TNAP hallada en células activadas WT pero no en células TNAP^{+/-}, contrastando además con niveles comparables de ARNm en condiciones basales (figura 9A). Estos datos son comparables a los obtenidos previamente en la expresión de TNAP en esplenocitos estimulados con LPS (figura 3A).

Por otro lado, la expresión de otros genes relacionados con la inmunidad, *Foxp3*, *Cd40* y *Tnf*, mostraron el mismo patrón de reducción en la expresión en células TNAP^{+/-} frente a células WT, aunque en este caso sin alcanzar diferencias significativas (figura 10). Los genes implicados en proliferación y función de células T, *Spib* (*Spi-B transcription factor*) y *Klf4* (*Kruppel-like factor 4*), respectivamente, también se encontraron disminuidos en células TNAP^{+/-}. En cambio, el gen *Spp1*, que codifica la proteína osteopontina, relacionada con TNAP y comprometida con la respuesta inmunológica a diversos niveles, mostró una baja expresión en condiciones basales, exhibiendo un perfil contrario tras la activación linfocitaria con anti-CD3 ϵ *in vivo* (baja expresión de *Spp1* en ratones WT e inducción en los TNAP^{+/-}) (figura 10D-F).

Por último, es interesante destacar la disminución observada en el recuento de linfocitos tras la administración de anti-CD3 ϵ en ambos grupos (figura 11), consecuencia de una deficiente activación del receptor TCR al carecer de la coestimulación de anti-CD28 [21]. Aun así, la respuesta linfopénica está atenuada en caso de ratones heterocigotos administrados con anti-CD3 ϵ . Por el contrario, el número de monocitos en éstos se encuentra considerablemente reducido.

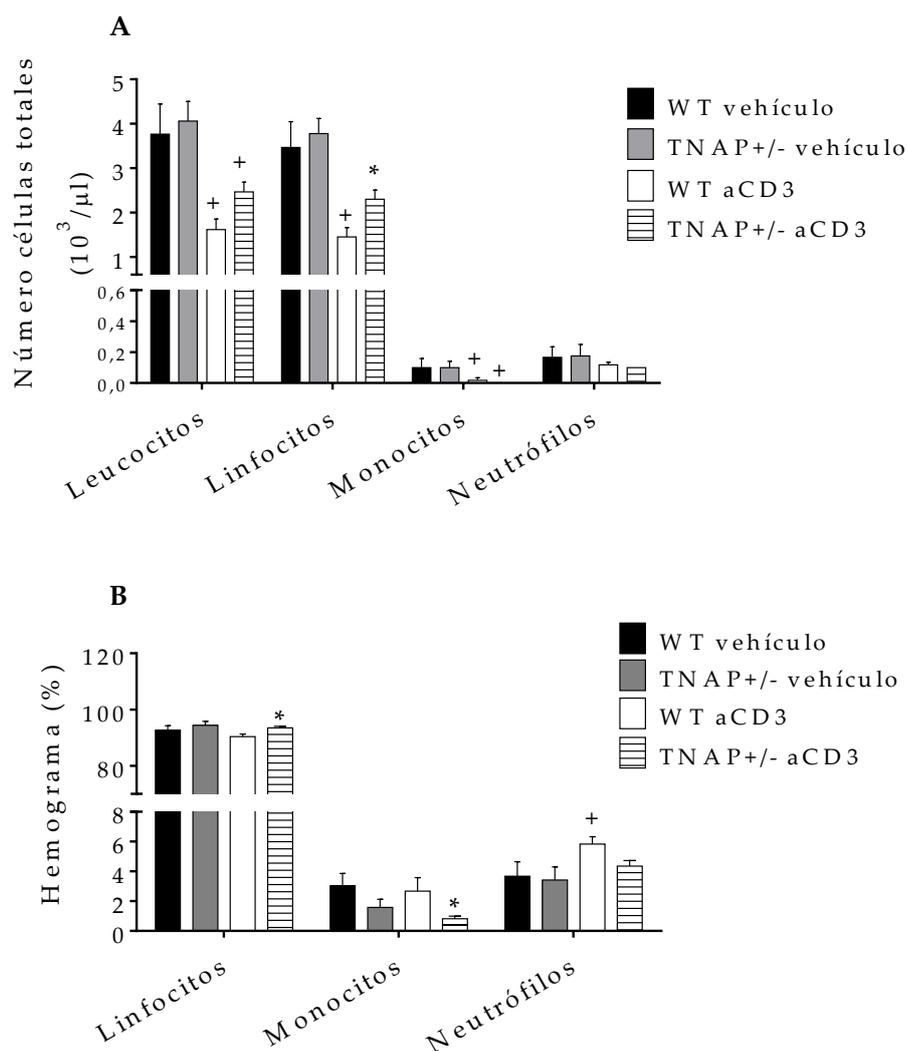


Figura 11. Estudio hematológico de ratones inyectados con anti-CD3 o vehículo. (A) Número de células totales en leucocitos de ratones C57BL/6J WT y heterocigotos para TNAP (TNAP+/-) y tratados con anti-CD3ε (aCD3; n=6) o con el vehículo (n=4). (B) Porcentaje de leucocitos. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM (10³ o %); * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente vehículo.

2.2 Importancia de la TNAP en el desarrollo de la colitis por transferencia linfocitaria.

Una vez puesto de manifiesto el menor grado de sensibilidad de activación y por tanto de producción de citoquinas, tanto *ex vivo* como *in vivo*, por parte de linfocitos TNAP^{+/-}, nos planteamos la hipótesis de que la fosfatasa alcalina no específica de tejido estuviese involucrada en la respuesta inflamatoria *in vivo*. Para ello desarrollamos un modelo de colitis por transferencia linfocitaria, donde la

inflamación intestinal es el resultado de la expansión de la población linfocitaria donante (destacando los linfocitos colaboradores/efectores sobre los reguladores). Además, éste es un modelo de colitis crónica muy cercano a la fisiopatología real de la enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, las isoformas de AP presentes en el intestino se ven modificadas en inflamación intestinal. Diversos autores han aportado datos en muestras intestinales humanas constatando un menor nivel de expresión (ARNm) de IAP en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn [134]. Por el contrario, se ha descrito que la TNAP y la actividad enzimática AP están aumentadas en inflamación intestinal [14].

En este experimento los grupos controles consisten en animales WT y TNAP^{+/-} transferidos con 1 millón de esplenocitos totales o no fraccionados (noF), denominados WT noF y TNAP^{+/-} noF. La presencia de linfocitos T reguladores, en el total de esplenocitos, evitará el desarrollo de colitis. Por otro lado, la transferencia de linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺, fracción de esplenocitos con linfocitos T *naïve* y sin linfocitos T reguladores (T CD4⁺ CD25⁺), a ratones Rag1^{-/-}, deficientes en linfocitos T y B maduros, da lugar a un proceso colítico dependiente de la presencia de microbiota comensal [471] caracterizada por pérdida de peso corporal, diarrea y sangrado rectal. Por ello los ratones fueron monitorizados durante 6 semanas tras la transferencia, controlando semanalmente estos tres parámetros. Los animales seleccionados para este estudio mostraron una ligera ganancia de peso inicial (figura 12A) y un lento desarrollo de signos clínicos de colitis. Además, un día antes del sacrificio de los ratones, se pudo constatar mediante imagen *in vivo* la instauración de la colitis, detectando especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno. Esta técnica permite observar una señal luminiscente directamente proporcional a la presencia de ROS típicamente asociados a los focos inflamatorios. En la figura 12B se puede observar que los ratones pertenecientes al grupo colítico (*naïve*) exhibieron una señal luminiscente mayor que el ratones control (noF). Curiosamente el ratón colítico TNAP^{+/-} mostró asimismo un notable incremento de la señal.

Una vez instaurada la colitis se procedió al sacrificio de los ratones en condiciones de esterilidad para el estudio posterior de la posible translocación de bacterias desde el intestino al interior del organismo y la presencia de lipopolisacárido (LPS) en hígado.

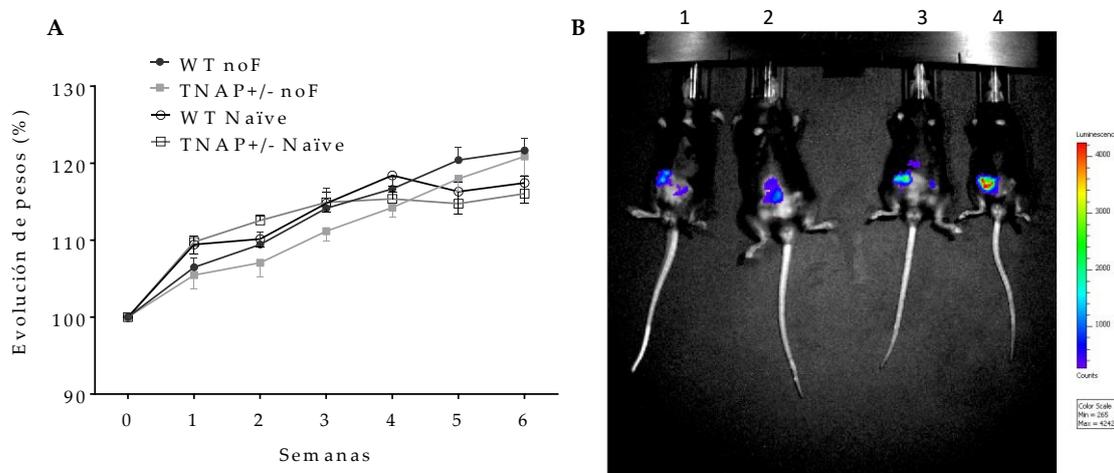


Figura 12. Desarrollo de la colitis en ratones WT y TNAP^{+/-}. (A) Evolución de pesos. (B) Imagen representativa del análisis del estadio inflamatorio mediante captura de imagen *in vivo*. Este estudio fue realizado el día previo al sacrificio de los animales en ratones WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colícticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los resultados fueron expresados como media \pm EEM. (1) WT noF; (2) TNAP^{+/-} noF; (3) WT *Naïve*; (4) TNAP^{+/-} *Naïve*.

El estudio hematológico no mostró diferencias entre grupos colícticos, mostrando una buena expansión de los linfocitos TNAP^{+/-} en el huésped. Sin embargo, el grupo control que recibió esplenocitos no fraccionados de animales TNAP^{+/-} mostró un fenotipo panleucopénico, a pesar de haber recibido inicialmente igual número de células (figura 13A). Por otro lado, también se determinó el hematocrito (HTC), la concentración de hemoglobina (Hb) y en el número de eritrocitos circulantes (RBC) con el fin de determinar cambios secundarios al sangrado rectal durante la colitis. En estos tres parámetros se observó una tendencia a la disminución en el grupo WT colíctico frente al WT control, mientras que las plaquetas tuvieron una tendencia contraria en grupos colícticos respecto a sus controles (Figura 13B), aumento típico en modelos animales [479] y pacientes [480, 481] con EII.

El examen macroscópico mostró un colon más engrosado, acortado e hiperémico en los ratones transferidos respecto a los controles no fraccionados.

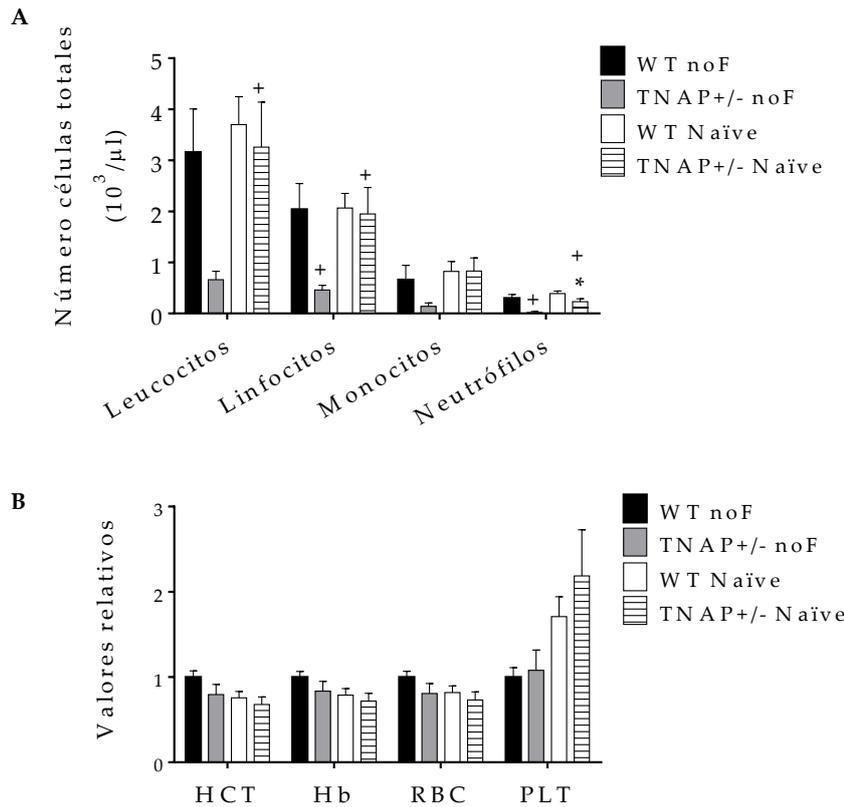


Figura 13. Estudio hematológico de ratones WT y TNAP^{+/-} del experimento por transferencia linfocitaria. (A) Recuento de leucocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos (10⁶/μl). (B) Resultados expresados en relación al grupo control. Los valores medios y EEM para el grupo WT noF fueron: hematocrito (HCT) 40,82 % ± 2,94; hemoglobina (Hb) 1,64 g/dl ± 0,90; eritrocitos (RBC) 9,01 · 10⁶/μl ± 0,07 y plaquetas (PLT) 212,4 · 10³/μl ± 23,54. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (Naïve: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media ± EEM (10³/μl). * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control). noF= no fraccionado.

Además, los ratones transferidos con células T CD4⁺ CD62L⁺ de TNAP^{+/-} presentaron una mucosa colónica con menor fibrosis e hiperemia que los ratones WT transferidos, como puede verse en la figura 14A. Esta reducción fue significativa al determinar el índice de daño macroscópico (1.95 vs. 1.35, $p < 0,05$) (figura 14B). El acortamiento del colon fue también inferior en estos ratones, alcanzando una ratio peso/longitud un 16% menor (figura 14C), aunque no fue significativa. Por otro lado, la relación peso bazo/peso ratón estuvo incrementada como consecuencia del estadio inflamatorio, aunque tampoco se observaron diferencias entre animales WT y TNAP^{+/-} (figura 14D).

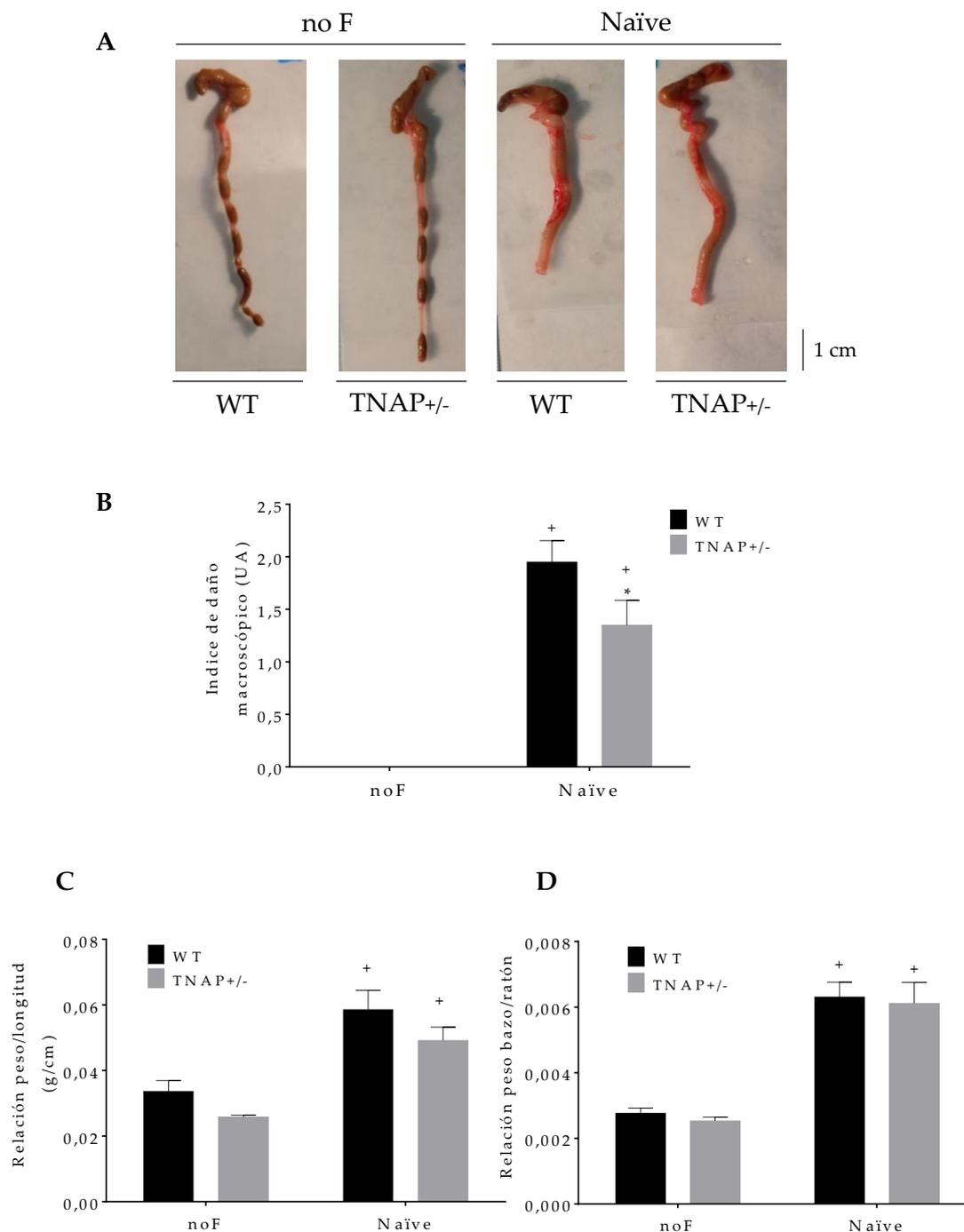


Figura 14. Marcadores inflamatorios de tipo macroscópico. (A) Imágenes representativas del colon durante la necropsia. (B) Índice de daño macroscópico: fibrosis e hiperemia (UA). (C) Relación peso/longitud colónica (g/cm) y (D) relación peso bazo/peso ratón. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (Naïve: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. Los resultados fueron expresados como media ± EEM; * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control). UA= Unidades Arbitrarias; noF= no fraccionado

El análisis histológico de secciones transversales de tejido colónico, evaluado mediante tinción con hematoxilina & eosina, reveló una potente inflamación intestinal típica del desarrollo del modelo experimental de colitis, destacando la gran infiltración leucocitaria, la pérdida de células caliciformes y la hiperplasia de células epiteliales (figura 15). Tras analizar conjuntamente todos los parámetros considerados (infiltración leucocitaria, pérdida de células caliciformes y de estructura de las criptas, longitud de las criptas, engrosamiento de la muscular e infiltración de la submucosa) no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos colíticos, WT y TNAP^{+/-} *naïve* (figura 15B).

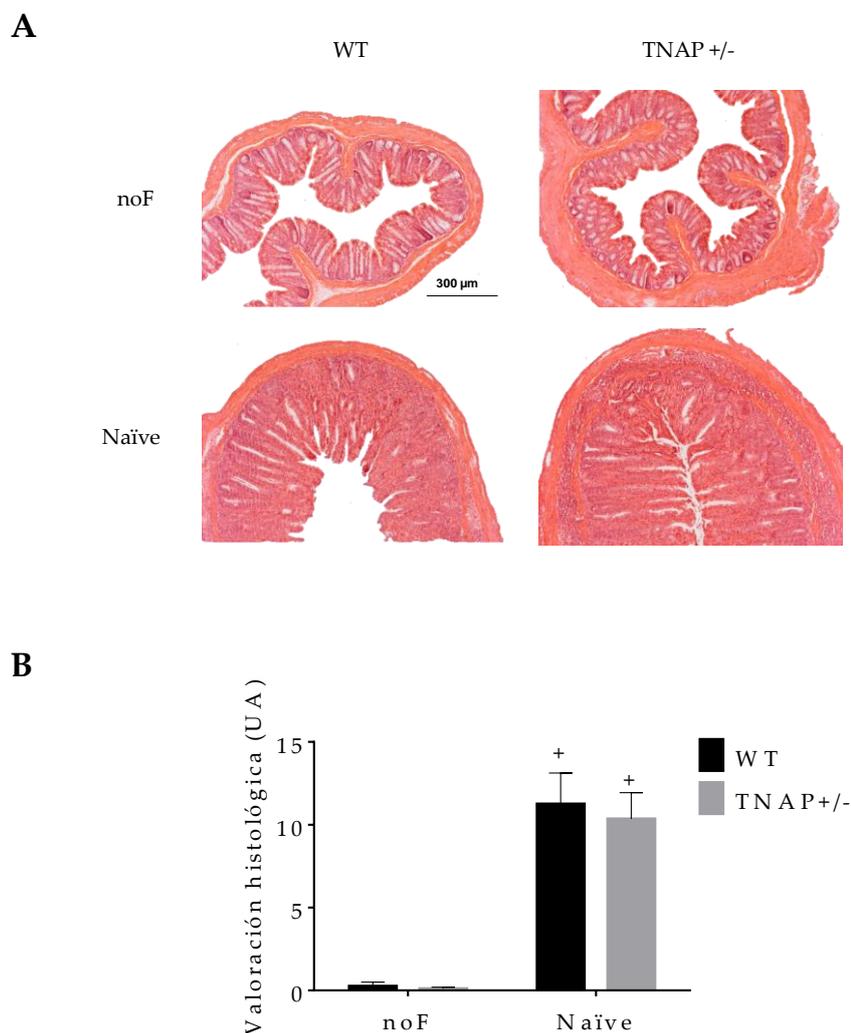


Figura 15. Estudio histológico del colon. (A) Imágenes histológicas (10X) de secciones transversales de tejido colónico sometidas a la tinción con hematoxilina & eosina. (B) Valoración histológica objetiva expresada como \pm EEM. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías; * $p < 0,05$ frente noF (control).

Con el propósito de evaluar la función barrera intestinal en los ratones heterocigotos frente a los WT en este modelo de colitis, se examinó la translocación de bacterias luminales viables a tejidos extraintestinales adyacentes, los ganglios mesentéricos (MLN). Éstos fueron homogenizados en PBS libre de pirógenos y sembrados para la detección de bacterias aerobias (Agar MacConkey) así como de bacterias anaerobias (Agar Brucella). La presencia de bacterias anaerobias estuvo incrementada en caso de MLN procedentes de ratones colíticos, estando ligeramente aumentada en caso de ratones WT (figura 16), sin embargo, en el caso de la detección de bacterias aerobias, tan sólo se detectó alguna colonia aislada en 3 ratones del grupo colítico WT. El resto de animales presentó ausencia de colonias en medio Agar MacConkey (datos no mostrados).

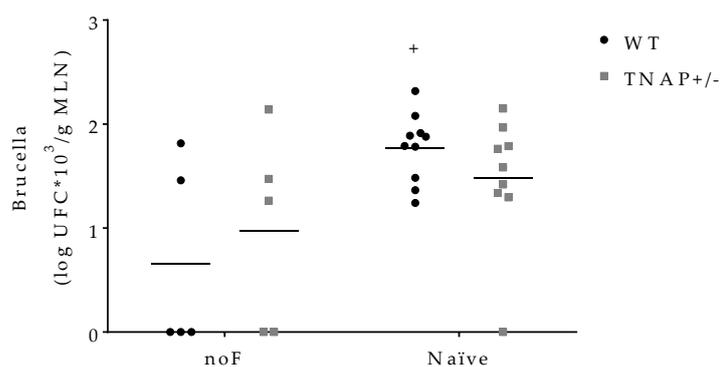


Figura 16. Estudio de la presencia de bacterias viables anaerobias en MLN. Homogenado de MLN cultivado en medio agar sangre comercial enriquecido denominado Brucella (log UFC*10³/g MLN). Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los resultados son representados como la media de cada grupo, apareciendo asimismo representado el valor individual de cada animal. + $p < 0,05$ frente noF (control). UFC = Unidades Formadoras de Colonias

Además, se cuantificó la presencia de LPS en hígado mediante el método estandarizado LAL (*lymulus ameobocyte lysate*) obteniendo nuevamente un aumento en la translocación bacteriana de ratones transferidos, y de forma más extensa en los que recibieron células WT, aunque sin alcanzar diferencias significativas (figura 17).

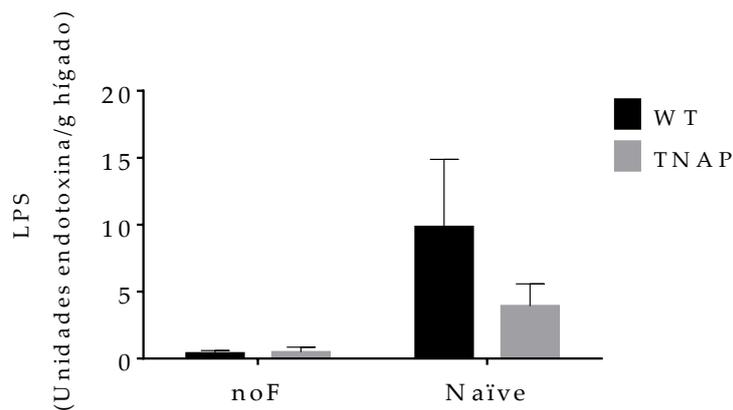


Figura 17. Cuantificación del LPS presente en hígado. Los resultados están expresados como unidades de endotoxina/g de hígado y en forma de media \pm EEM. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colícticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías.

Además de lo anteriormente expuesto, se realizó la determinación de las actividades enzimáticas mieloperoxidasa (MPO) y AP en tejido colónico observándose unos incrementos no muy pronunciados, presumiblemente debido al desarrollo de una colitis moderada en este experimento, de los animales inflamados respecto a los controles y que no lograron alcanzar significación. Así, el reclutamiento neutrofílico en la mucosa colónica de los animales colícticos produjo un marcado aumento de MPO sin diferencias entre grupos colícticos, no siendo así en caso de la actividad AP, donde sí se encontraron diferencias significativas. (Figura 18A-B). Por otro lado, la sensibilidad de la actividad AP al inhibidor levamisol ensayada *in vitro* reflejó un aumento significativo respecto a animales no inflamados y siendo menor en caso del grupo TNAP^{+/-} *naïve* (figura 18C).

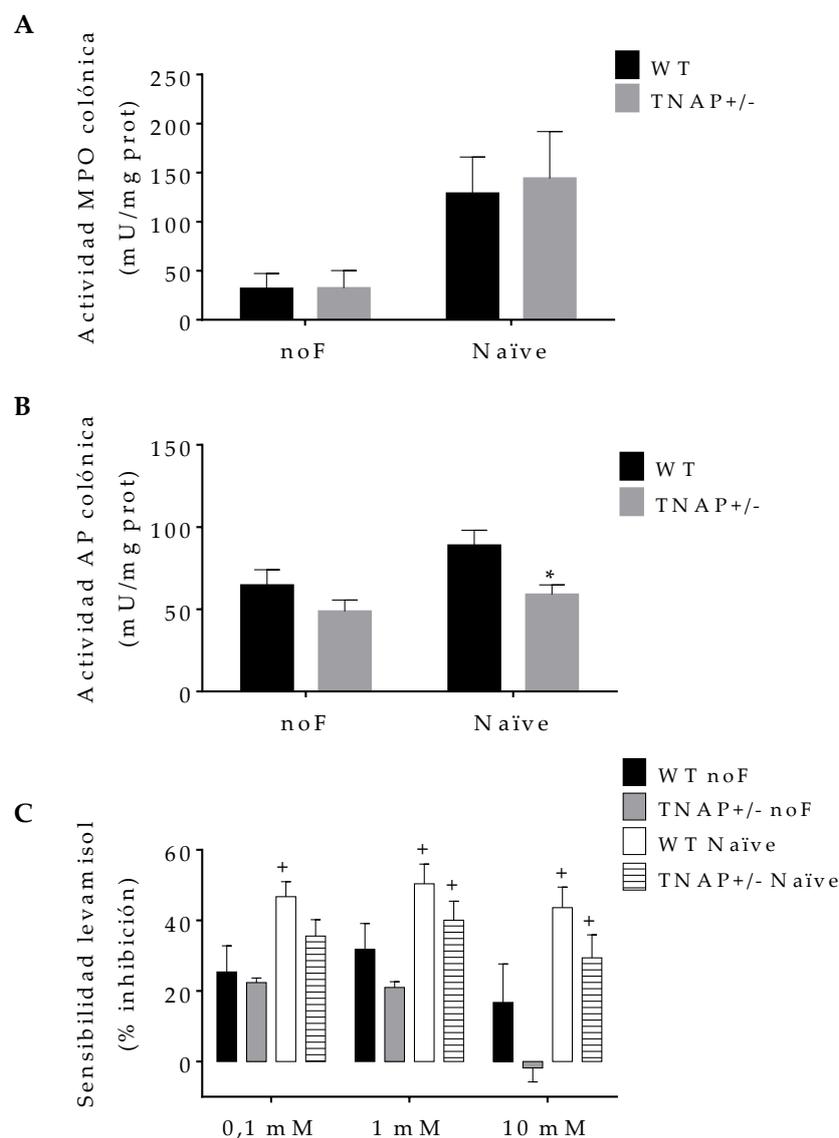


Figura 18. Determinación de actividades enzimáticas en el tejido colónico. (A) MPO; (B) AP; (C) sensibilidad a levamisol (% de inhibición de la actividad AP). Los datos se expresan como media \pm EEM (mU/mg prot o %). Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colícticos (Naïve: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control).

Una buena parte del incremento en la actividad AP observado en el tejido colónico de animales inflamados es el resultado de la infiltración masiva de leucocitos que expresan Alpl en la zona inflamada. Consistente con esto, observamos un mayor nivel de expresión (ARNm) de TNAP en animales WT naïve frente al control no fraccionado, sin alcanzar significación ($p = 0,08$) (figura 19). Sin

embargo, esta tendencia no fue vista en el caso de animales $TNAP^{+/-}$ *naïve*, probablemente debido a una menor llegada de leucocitos (o menor activación).

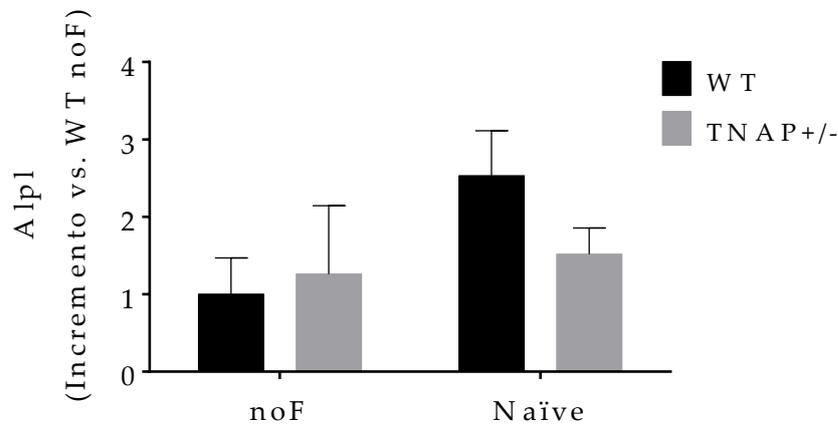


Figura 19. Expresión génica de TNAP en tejido colónico medida por PCR a tiempo real. Los datos se expresan como media \pm EEM. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP ($TNAP^{+/-}$) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y $TNAP^{+/-}$ n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. *Alpl*= fosfatasa alcalina no específica de tejido; noF= no fraccionado (control).

Se estudió la inflamación en el tejido colónico mediante la detección en colon de citoquinas y mediante el análisis por PCR a tiempo real de la expresión génica de marcadores de inflamación intestinal.

El estudio de citoquinas presentes en el homogenado de colon reveló en general una mayor cantidad de citoquinas en animales colíticos respecto a controles. Se observaron en general menores concentraciones de $TNF-\alpha$, IL-10, IL-4, IL-6 e $IFN-\gamma$, en ratones transferidos con linfocitos *naïve* procedentes de ratones $TNAP^{+/-}$ cuando se compararon con ratones WT, aunque sólo la diferencia en $IFN-\gamma$ fue significativa (figura 20). Por otra parte, los niveles de IL-1 β e IL-17A se vieron incrementados en los ratones transferidos con linfocitos *naïve* procedentes de animales $TNAP^{+/-}$ en comparación con los transferidos con linfocitos de ratones WT, siendo la diferencia significativa sólo en el caso de la IL17A (WT *vs* $TNAP^{+/-}$). Este dato es interesante, puesto que está descrito que en el modelo de colitis por transferencia linfocitaria, la presencia de IL-17A proporciona protección en el desarrollo de la enfermedad [482]. La polarización hacia Th1 de células $IL17a^{-/-}$ $CD45RB^{hi}$ *in vitro* conlleva un aumento de la expresión de $IFN-\gamma$ y del factor de

transcripción de Th1 T-bet. Además, la transferencia de células procedente de animales *Il17ra*^{-/-} implica un desarrollo más agresivo y acelerado de la enfermedad.

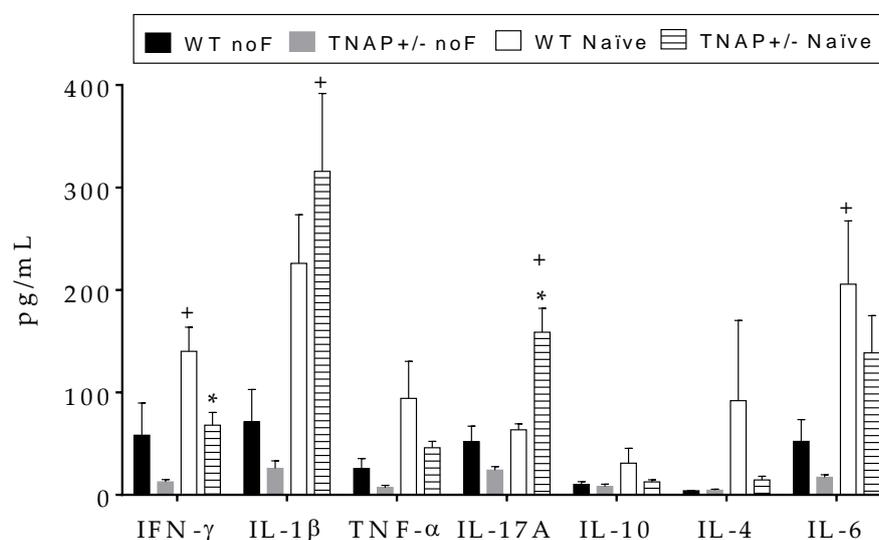


Figura 20. Perfil de citoquinas en homogenado de colon de animales WT y TNAP^{+/-} durante la transferencia linfocitaria. Detección de IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-17A, IL-10, IL-4 e IL-6 en homogenado de colon total mediante Multiplex. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media \pm EEM (pg/ml). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control).

El estudio de los niveles de ARNm mediante PCR a tiempo real, al igual que los obtenidos mediante Multiplex, indicaron la existencia de inflamación en los ratones que recibieron linfocitos *naïve*, independientemente de su procedencia. Así, como se muestra en la figura 21A, se observó un aumento en los grupos colíticos de todos los marcadores proinflamatorios (INF- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-17A, TGF- β , IL-6, iNOS y S100A8) frente al control no fraccionado. Sin embargo, tan solo en el caso de IFN- γ e IL-1 β hubo diferencia significativa entre los grupos colíticos, siendo menor la expresión en el grupo TNAP^{+/-} *naïve*.

Además se hizo un estudio de la expresión (ARNm) de marcadores específicos del linaje de células T: T-bet, GATA-3, ROR γ t y Foxp-3, correspondientes a células Th1, Th2, Th17 y Treg, respectivamente (figura 21B). La única que no mostró tendencia a la regulación negativa en el grupo TNAP^{+/-} *naïve* respecto de WT *naïve* fue ROR γ t (en concordancia con los niveles de IL-17A obtenidos en el homogenado de colon). Tan solo se alcanzó significación estadística en la reducción de la expresión del factor de transcripción T-bet, controlador de diferenciación hacia Th1.

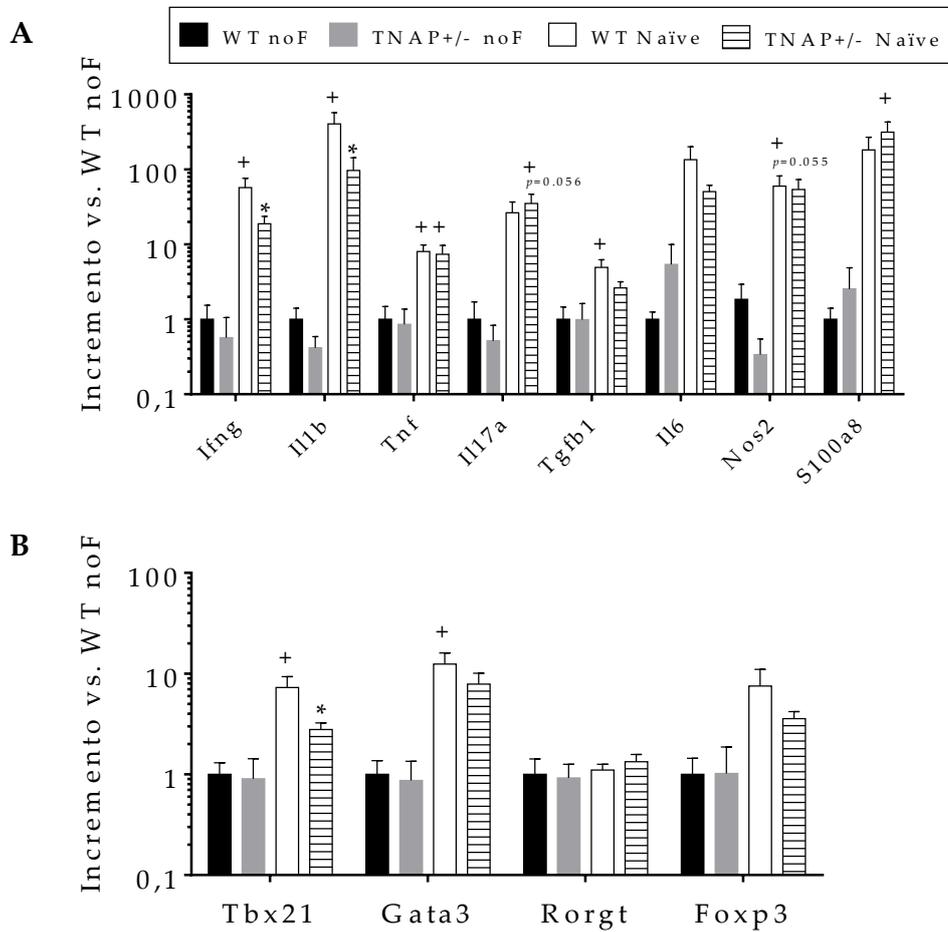


Figura 21. Perfil de expresión génica en tejido colónico completo mediante qRT-PCR. (A) Marcadores inflamatorios *Ifng*, *Il1b*, *Tnf*, *Il17a*, *Tgfb1*, *Il6*, *Nos2* y *S100a8*. (B) Linaje celular *Tbx21* (Th1), *Gata3* (Th2), *Rorgt* (Th17) y *Foxp3* (Treg). El eje Y representa el logaritmo decimal de dicho cambio relativo, con objeto de incluir todos estos genes en la misma figura. No se empleó el valor logarítmico para el tratamiento estadístico de los datos. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (Naive: transferidos con células T naive; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control). *Alpl*= fosfatasa alcalina no específica de tejido; *Nos2*= oxido nítrico sintasa 2; *Tbx21*= T-bet.

Por último, se determinó la expresión colónica de *Spp1*, que codifica para la proteína osteopontina (OPN), cuyo aumento plasmático y de expresión colónica está asociado con la EII. La OPN está íntimamente relacionada con la respuesta inmune tipo Th1 asociada a la EC [483-486] y con la patogénesis de la CU [487-489]. Como se puede observar en la figura 22, no se detectó expresión de *Spp1* en animales controles WT ni en heterocigotos (TNAP^{+/-}), pero sí en colíticos, donde la expresión fue mucho menor en el grupo TNAP^{+/-} naïve respecto al WT naïve, aunque sin llegar a ser significativo ($p=0,07$).

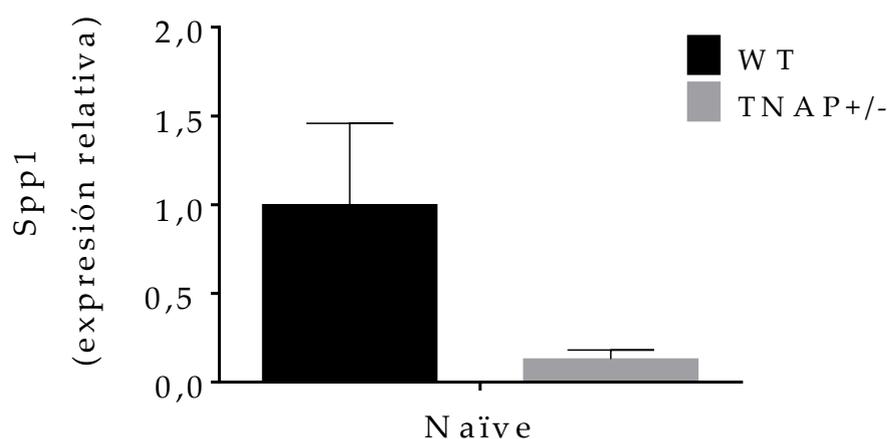


Figura 22. Expresión génica de *Spp1* en colon en colitis por transferencia linfocitaria. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) colíticos (*Naïve*: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante t-test. *Spp1* = osteopontina.

Además de la afectación colónica, en el modelo de colitis inducida por transferencia linfocitaria se produce una elevación de citoquinas Th1 a nivel sistémico. Por ello, se cuantificó IFN- γ y TNF- α en plasma (figura 23). Como era de esperar, el nivel de citoquinas en plasma estuvo incrementado en los animales colíticos frente a los controles, sin embargo el grupo TNAP^{+/-} naïve mostró una menor producción de IFN- γ y TNF- α (del 58 y 17% respectivamente), siendo sólo estadísticamente significativo el primero.

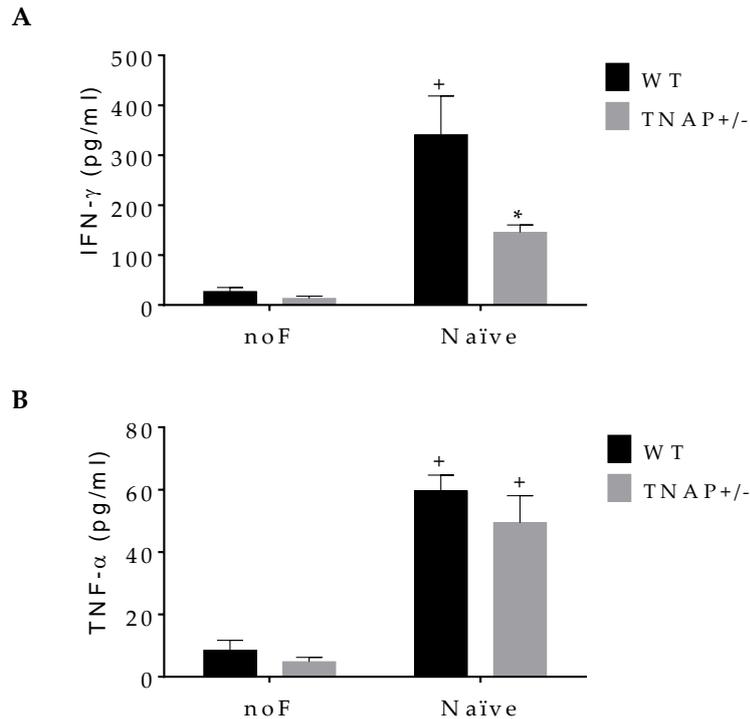


Figura 23. Cuantificación de citoquinas en plasma en colitis por transferencia linfocitaria mediante ELISA. (A) IFN- γ y (B) TNF- α . Los resultados son expresados en pg/ml como media \pm EEM. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (Naïve: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías.* $p < 0,05$ frente a WT; + $p < 0,05$ frente noF (control).

Un resultado similar fue obtenido al medir estas mismas citoquinas, TNF- α e IFN- γ , en el sobrenadante de células mononucleares obtenidas del bazo, cultivadas *ex vivo* y estimuladas con LPS (1 μ g/ml) y ConA (5 μ g/ml) (figura 24). La producción de TNF- α estuvo disminuida de forma significativa en el grupo TNAP^{+/-} naïve frente al grupo WT naïve en un 31%, al estimular las células con LPS, y en un 40% al estimular las células con ConA (figura 24A-B). Por otro lado, la producción de IFN- γ no estuvo disminuida de forma significativa entre los grupos colíticos, aunque se observó una cierta tendencia a disminuir en esplenocitos estimulados con LPS (57%) (figura 24C), y no tanto estimulando con ConA (13%) (figura 24D). Además, se determinó la producción de citoquinas de otros subtipos de linfocitos T, IL-17A e IL-4 bajo la estimulación de ConA, la producción basal fue indetectable, sin encontrar diferencias significativas (figura 24E).

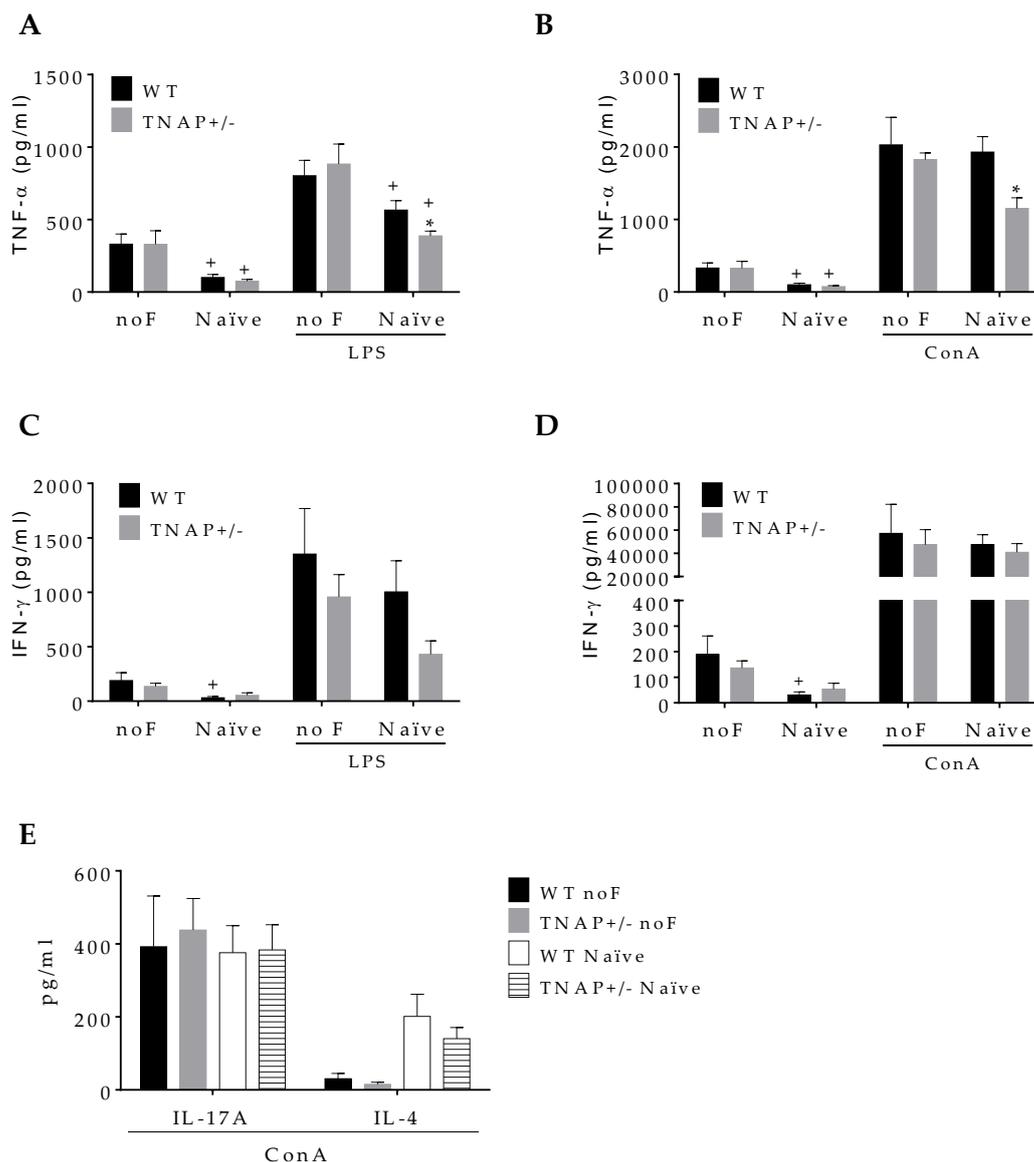


Figura 24. Producción de citoquinas en cultivos *ex vivo* de células obtenidas de bazo en la colitis por transferencia linfocitaria. Niveles de (A) IFN- γ y (B) TNF- α en esplenocitos estimulados con LPS (1 μ g/ml). Niveles de (C) IFN- γ , (D) TNF- α (E) IL-17A e IL-4 en esplenocitos estimulados con ConA (5 μ g/ml). Los esplenocitos fueron cultivados *ex vivo*, el sobrenadante fue recogido a las 24h y analizados por ELISA. Los resultados son expresados en pg/ml como media \pm EEM. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naive*: transferidos con células T *naive*; WT n=20 y TNAP^{+/-} n=18). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías.* $p < 0,05$ frente a WT; ⁺ $p < 0,05$ frente noF (control).

Estos resultados fueron respaldados además por el análisis de la expresión génica en el bazo por PCR a tiempo real. En la figura 25A puede observarse el mismo perfil en expresión génica de las citoquinas IFN- γ , IL-10 y TNF- α , casi alcanzando significación en caso de TNF- α ($p = 0,06$). Por el contrario IL-17A mostró un perfil contrario nuevamente (al igual que en colon, figura 20A).

También estudiamos la expresión de marcadores específicos del linaje de células T, concretamente *Tbx21* (T-bet), *Gata-3* y *Foxp3*, que se corresponden con células Th1, Th2 y Treg, respectivamente. De los 3, tan solo la expresión de T-bet mostró una tendencia a la regulación negativa, no significativa, en el grupo TNAP^{+/-} naïve frente a WT naïve, y mostrando una misma tendencia Gata-3. De manera interesante el marcador de monocitos/macrófagos CD11b (*Itgam*) se encontró menos expresado en animales TNAP^{+/-} frente a los WT, en ambos grupos control y colítico, y alcanzando significación otro marcador de macrófagos, F4/80 (*Adgre1*), entre los grupos control (WT noF vs. TNAP^{+/-} noF).

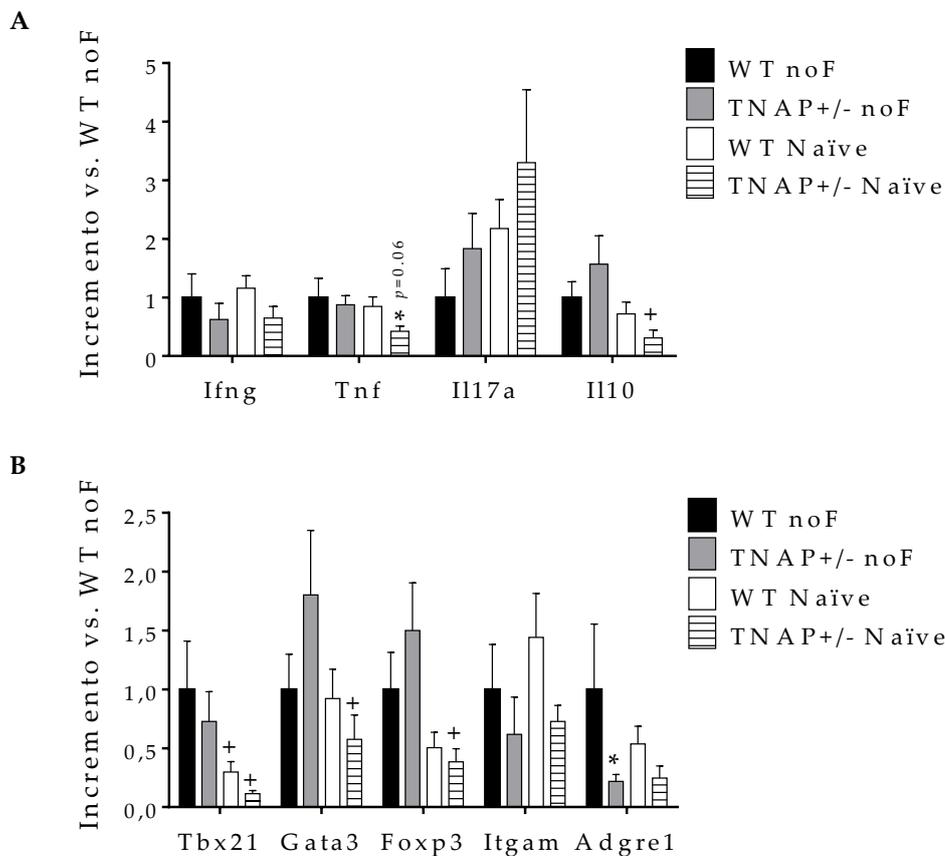


Figura 25. Perfil de expresión génica en bazo de transferencia linfocitaria analizado por qRT-PCR. (A) Perfil de citoquinas *Ifng*, *Tnf*, *Il17a* e *Il10*. (B) Linaje celular *Tbx21* (Th1), *Gata3* (Th2), *Foxp3* (Treg), *Itgam* (macrófagos Cd11b+) y *Adgre1* (macrófagos F4/80+). Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (Naïve: transferidos con células T naïve; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control). *Tbx21*= T-bet; *Itgam*= CD11b; *Adgre1*= F4/80.

Este modelo de transferencia linfocitaria la inflamación está mediada por una

respuesta mixta tipo Th1 y Th17 donde las células T CD4⁺ de bazo, lámina propia colónica y ganglios mesentéricos de animales colíticos son productoras de IFN- γ e IL-17A. Por ello también estudiamos la población linfocitaria a nivel de ganglios mesentéricos (MLN), analizando por citometría de flujo la proporción de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ . Como era de esperar, la producción de IFN- γ aumentó en los grupos colíticos, en el grupo WT *naïve* de hasta 10 veces más (figura 26). Sin embargo, en el grupo TNAP^{+/-} *naïve* aumentó tan sólo 4,5 veces, reflejando una diferencia significativa entre ambos grupos colíticos, y siendo consistente con los niveles de IFN- γ plasmáticos (figura 23A).

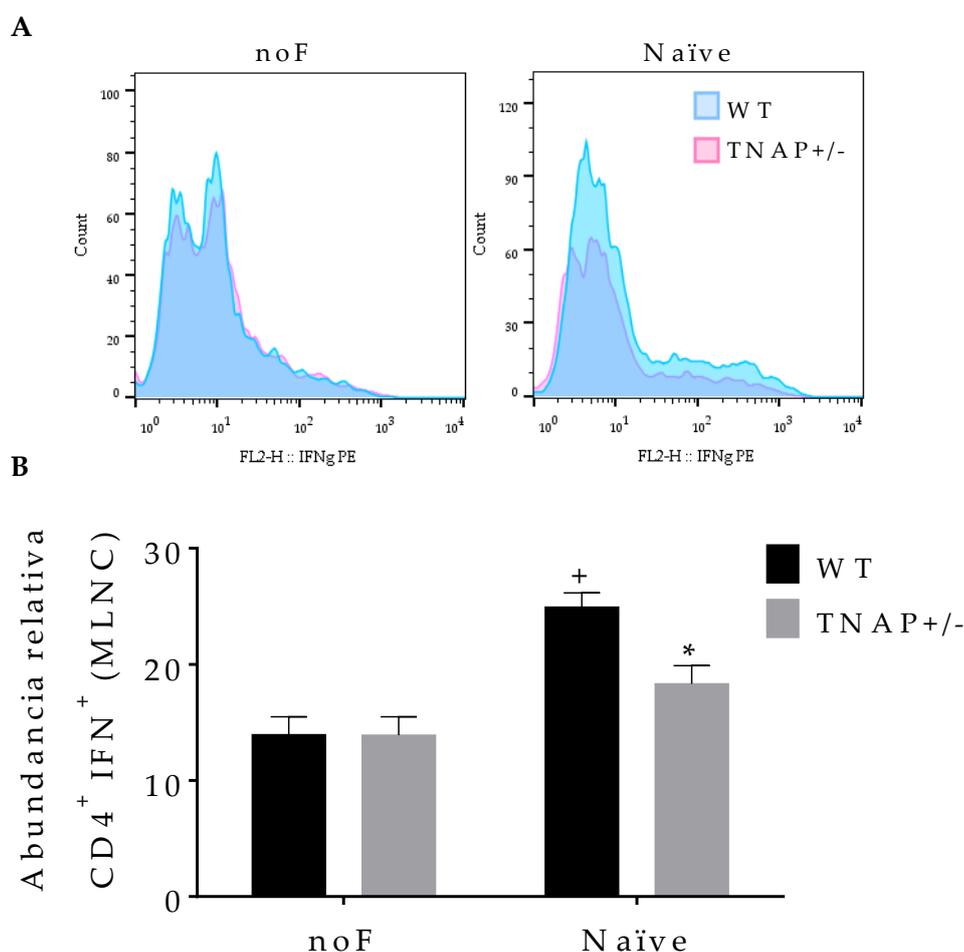


Figura 26. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ en las células extraídas de los MLN. (A) Histogramas representativos del porcentaje de IFN- γ en el gate de linfocitos. (B) Gráfica del % de CD4⁺ IFN- γ ⁺ del total de células extraídas del MLN. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media \pm EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control).

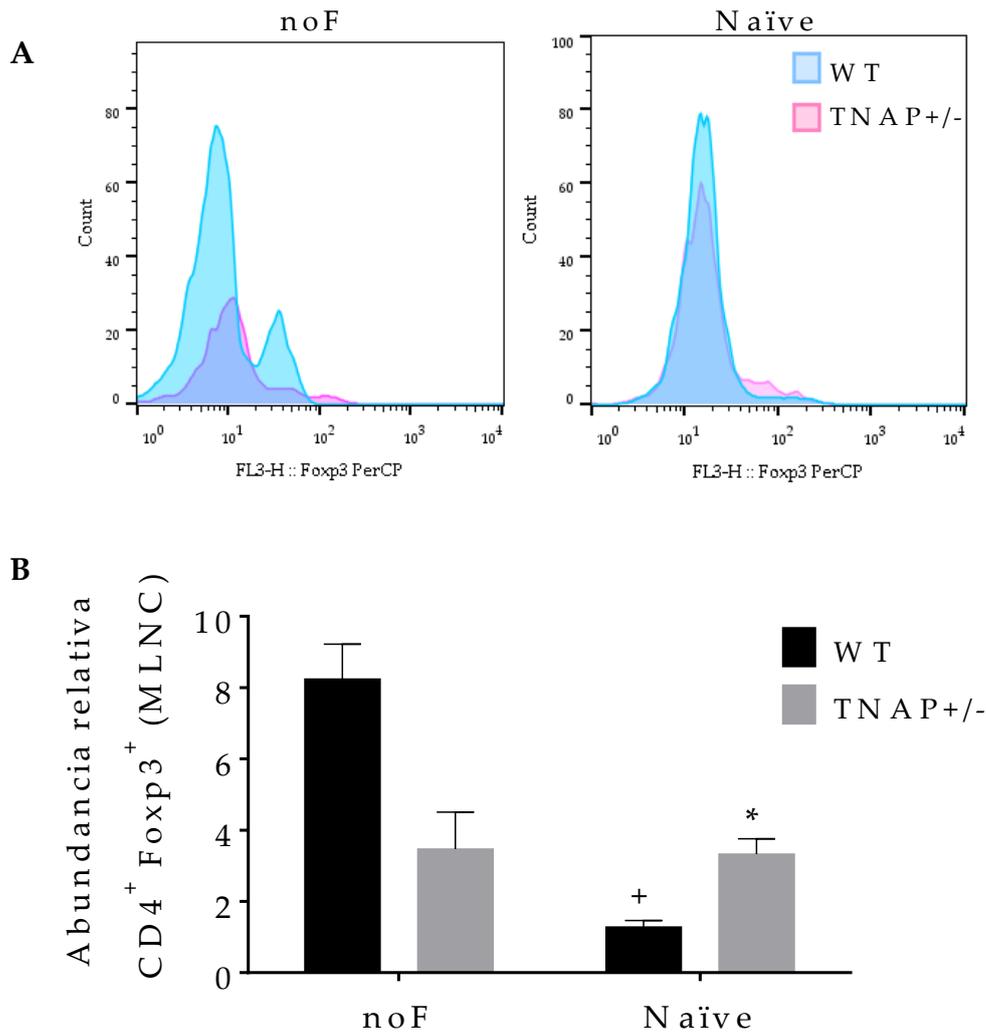


Figura 27. Análisis mediante citometría de flujo de la presencia relativa de células T CD4⁺ productoras de Foxp3 en células extraídas de MLN.(A) Histogramas representativos del porcentaje CD4⁺ Foxp3⁺ en el gate de células CD4⁺. (B) Gráfica del % de células CD4⁺ Foxp3⁺ del total de células extraídas del MLN. Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naïve*: transferidos con células T *naïve*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente noF (control).

Además, se estudio la población de linfocitos reguladores (Treg) marcando la expresión del factor de transcripción Foxp3 en la población T CD4⁺. La expansión de estos linfocitos Treg supondría una mejora. La colitis por transferencia linfocitaria CD4⁺ CD62L⁺ (población de mayoría CD4⁺ CD45RB^{hi}) es revertida con cotransferencia de CD4⁺ CD45RB^{lo} [460, 461], población con CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg) [490]. Así, el análisis de Foxp3 por citometría de flujo en gánglios mesentéricos reveló un porcentaje más bajo de linfocitos Treg en el grupo WT colítico respecto a

su control, no habiendo diferencias entre los grupos TNAP^{+/-}. Además, el porcentaje de CD4⁺ Foxp3⁺ estuvo incrementado en el grupo TNAP^{+/-} colítico respecto al WT colítico control (figura 27).

Este resultado concuerda con la expresión de *Foxp3* y de *Il10* en gánglios mesentéricos (figura 28).

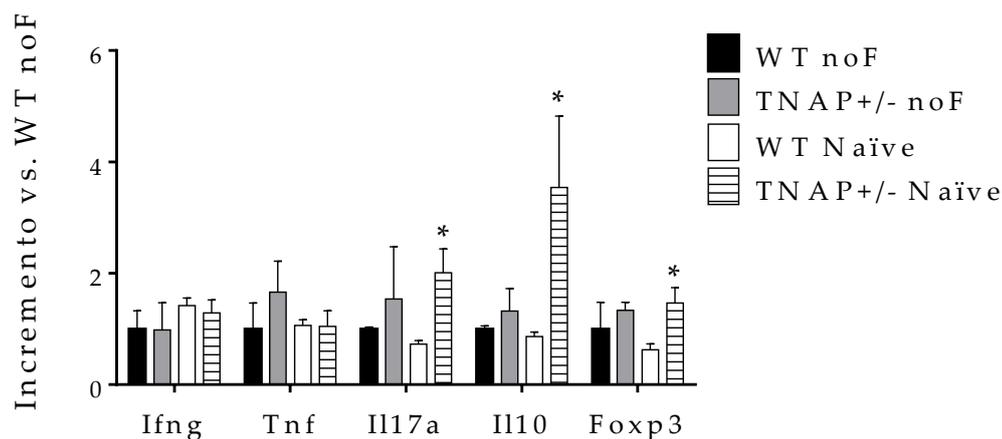


Figura 28. Perfil de expresión génica en MLN de transferencia linfocitaria analizado por qRT-PCR. Perfil de citoquinas *Ifng*, *Tnf*, *Il17a*, *Il10* y *Foxp3*). Grupos: WT y heterocigotos para TNAP (TNAP^{+/-}) controles (noF: transferidos con esplenocitos no fraccionados; n=5) y colíticos (*Naive*: transferidos con células T *naive*; WT n=10 y TNAP^{+/-} n=9). Los datos se expresan como media ± EEM. Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías. * p < 0,05 frente a WT, + p < 0,05 frente noF (control).

3. ESTUDIOS *EX VIVO*

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* y *ex vivo* revelaron una menor producción de citoquinas, así como una menor expresión (ARNm) de genes relacionados con el linaje de Th1 (IFN- γ y TNF- α), Th2 (IL-4 e IL-5), Th17 (IL-17A e IL-22) en los animales TNAP^{+/-} respecto a los WT tras la estimulación de linfocitos T, ya fuese por la lectina ConA o con el activador del TCR anti-CD3 ϵ . Nos planteamos a continuación estudiar si las alteraciones observadas eran debidas a influencias de la TNAP en la diferenciación o en la proliferación de linfocitos T como respuesta a la activación.

3.1 Estudio de la diferenciación de linfocitos T en células TNAP^{+/-}.

Para comenzar, realizamos un experimento de polarización de células T *naïve* hacia fenotipos Th1, Th2 y Th17. Para ello aislamos las células T *naïve* de animales WT y TNAP^{+/-} mediante separación magnética en dos pasos, primero eliminando de forma indirecta, marcando con anticuerpos, las células no Th: macrófagos (CD11b), dendríticas (CD11c), linfocitos B (CD19 y CD45R), células APC (HMC de clase II), células NK (CD49b), células T reguladoras (CD25), células endoteliales (CD105) y hematíes (Ter-115); además de linfocitos T CD8 (CD8a) y linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$). Posteriormente, de la fracción enriquecida en CD4⁺ obtenida, la población CD4⁺ CD62L⁺ es seleccionada positivamente con el anticuerpo CD62L (L-selectina). Una vez obtenida la población linfocitaria vírgen se procedió a estimular las células con anti-CD3 ϵ /anti-CD28, así como a añadir citoquinas y anticuerpos bloqueantes de citoquinas de forma específica para la polarización hacia las distintas poblaciones de linfocitos Th (ver apartado 3.4 de material y métodos). El empleo de anticuerpos neutralizantes de citoquinas propias de otros subtipos de linfocitos Th es necesario ya que las células Th1, Th2 y Th17 tienen funciones supresoras de las otras respuestas, es decir, que son mutuamente antagónicas. Así, células T CD4 *naïve* pueden diferenciarse hacia Th1 *in vitro* si en el medio de cultivo hay presente IL-12 y se neutraliza IL-4 (responsable de la diferenciación de éstas hacia células Th2 productoras de IL-4) y por el contrario, las células T CD4 *naïve* se diferenciarán hacia Th2 con la presencia de IL-4 e IL-2 y la ausencia (neutralización) de IFN- γ (citoquina distintiva de Th1).

Pasados 5 días, las células fueron permeabilizadas para estudiar la producción de IFN- γ (Th1), IL-4 (Th2) e IL-17A (Th17) mediante citometría de flujo. Los análisis de citometría de flujo no revelaron diferencias entre linfocitos procedente de animales WT o TNAP^{+/-} en ninguna de las poblaciones polarizadas

(figura 29 y figura 30). Por tanto, la diferencia en la producción de citoquinas por los linfocitos TNAP^{+/-} no parece ser achacable a una respuesta debida a polarización.

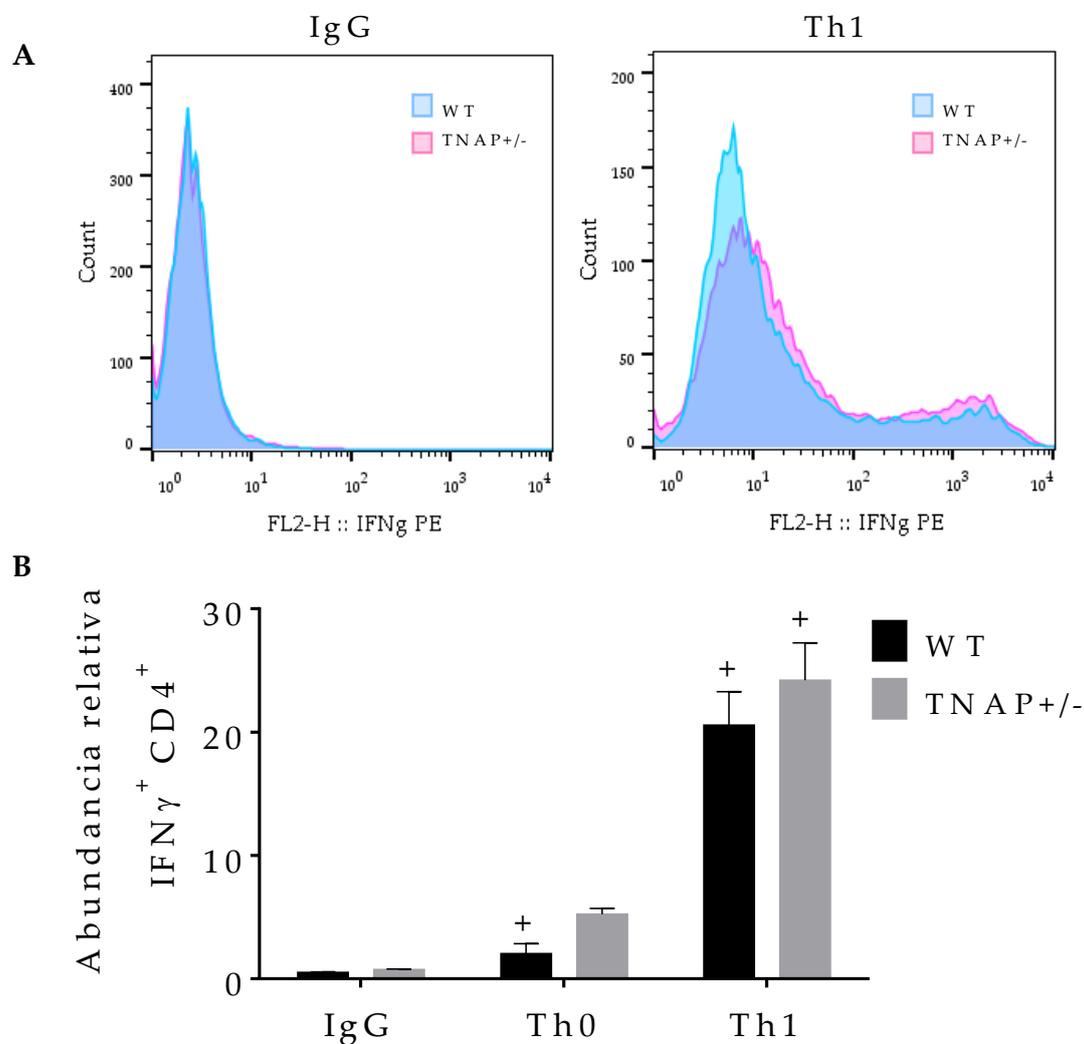


Figura 29. Polarización de linfocitos T *naïve* hacia linfocitos Th1 en ratones WT y TNAP^{+/-}. Análisis por citometría de flujo de la presencia relativa de linfocitos productores de IFN- γ (población Th1) del total de células *naïve* sembradas en presencia de citoquinas y anticuerpos para su polarización. Los datos se expresan como media \pm EEM (IgG y Th0 n=3; Th1 n=8). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías; ⁺ $p < 0,05$ frente control.

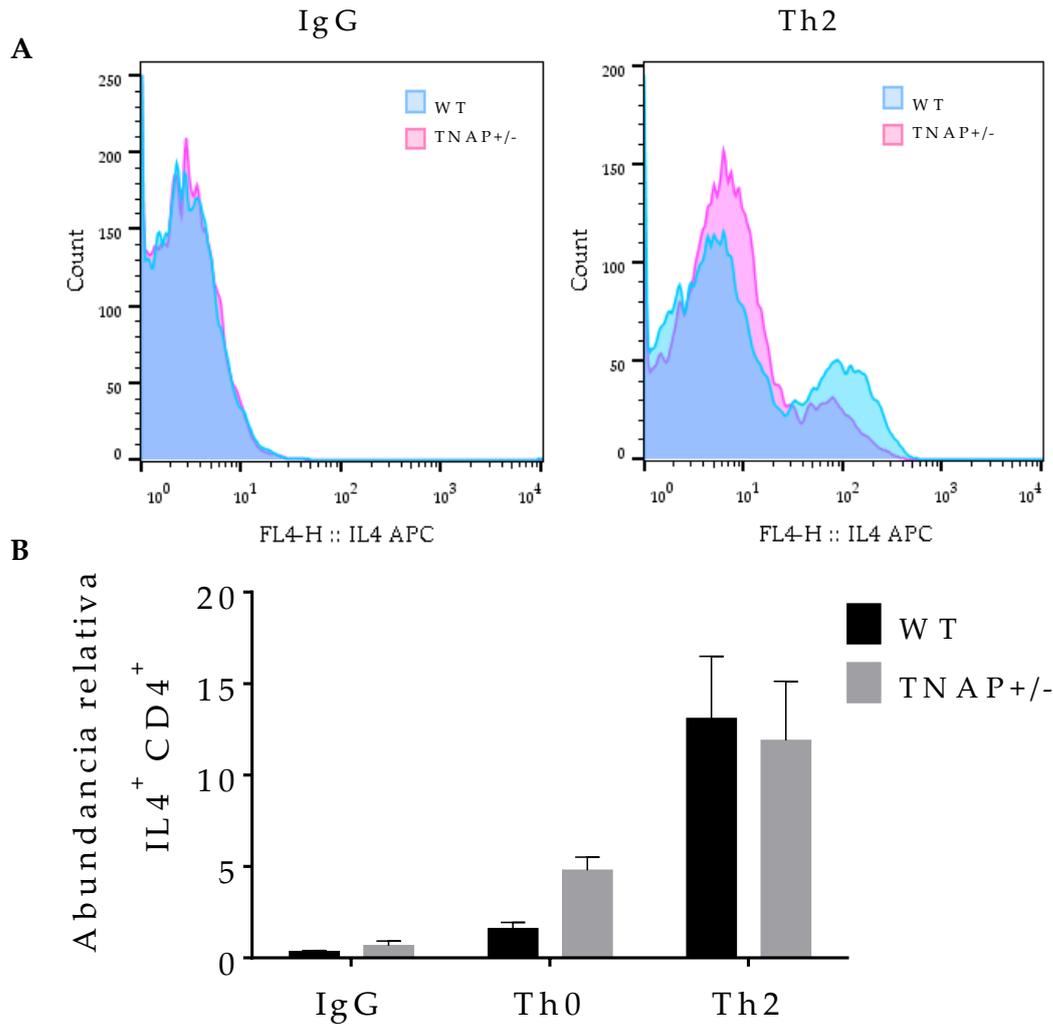


Figura 30. Polarización de linfocitos T *naïve* hacia linfocitos Th2 en ratones WT y TNAP^{+/-}. Análisis por citometría de flujo de la presencia relativa de linfocitos productores de IL-4 (población Th2) del total de células *naïve* sembradas en presencia de citoquinas y anticuerpos para su polarización. Los datos se expresan como media \pm EEM (IgG y Th0 n=2; Th2 n=8). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías.

3.2 Estudio de la TNAP en la proliferación de linfocitos T

No habiendo encontrado diferencias en el patrón de polarización de los linfocitos T hacia ninguna de las estirpes Th1, Th2 o Th17, procedimos a la realización de experimentos de proliferación por incorporación de timidina-^[3H] (n=6 por grupo). En primer lugar llevamos a cabo un experimento de proliferación mediante la estimulación de linfocitos T totales, obtenidos mediante separación magnética de animales WT y TNAP^{+/-}, con ConA (5 μ g/ml) (figura 31A).

Se apreció el aumento de los niveles de proliferación entre grupos control y estimulados con ConA, sin embargo, no se encuentran diferencias de proliferación entre los grupos estimulados de animales WT y TNAP^{+/-}. Procedimos entonces a estimular los linfocitos con anti-CD3 (5µg/ml)/anti-CD28 (1µg/ml), estímulo más fisiológico, y se observó un mayor incremento de proliferación que al estimular con ConA (figura 31B). En este caso sí se apreció una menor proliferación de linfocitos T procedentes de animales TNAP^{+/-} frente a los de WT (casi un 50% menos), siendo la diferencia significativa ($p=0,009$).

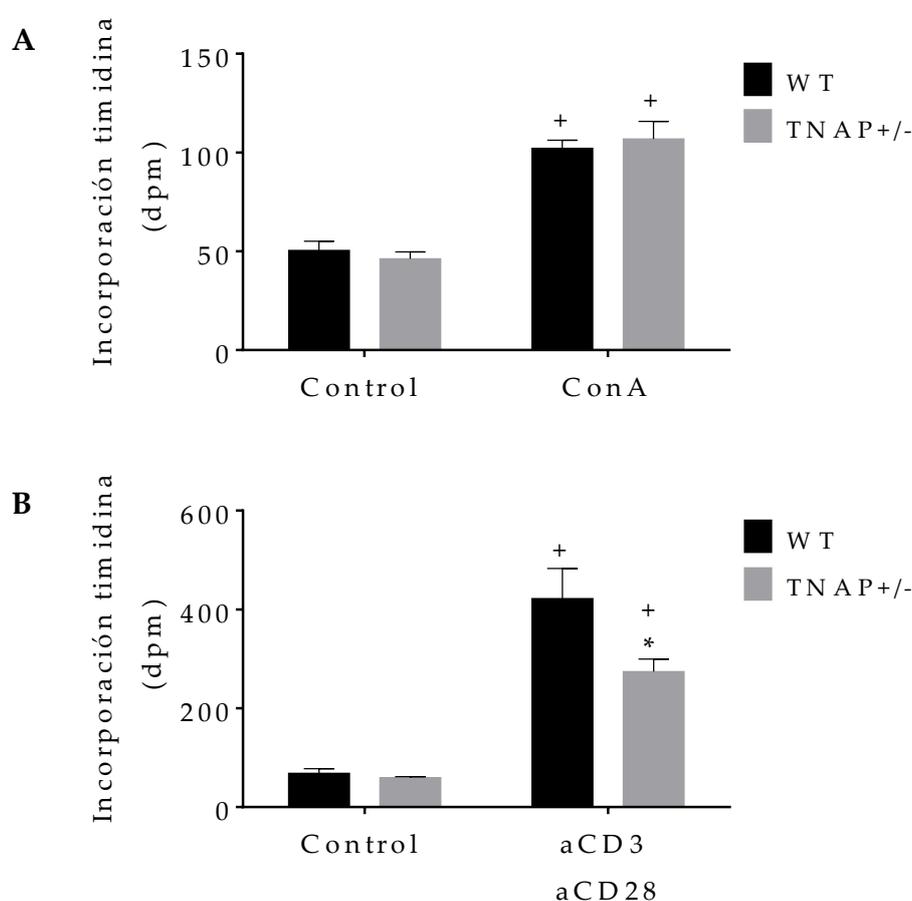


Figura 31. Ensayo de proliferación en células T de animales TNAP^{+/-} y WT mediante incorporación de timidina-[³H] Células T de animales WT y TNAP^{+/-} estimuladas con ConA (5µg/ml) (A) y con anti-CD3 (5µg/ml)/anti-CD28 (1µg/ml) (B). 1 µCi de timidina-[³H] fue incorporado. Los datos se expresan como media ± EEM (n=6). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de dos vías.* $p < 0,05$ frente a WT, + $p < 0,05$ frente Control.

Por último se comprobó si en linfocitos procedentes de animales WT tratados con inhibidores de TNAP (levamisol, fenilalanina y teofilina) se producía una menor proliferación al estimularlos con anti-CD3/anti-CD28, respecto a los no tratados con inhibidores, pudiendo afirmar así que la TNAP es necesaria para la activación y proliferación completa de las células T. Se observó una disminución en los niveles de proliferación en los tres grupos de linfocitos T tratados con inhibidores de TNAP, levamisol, fenilalanina y teofilina. Además, la disminución de la proliferación en las células tratadas con fenilalanina fue menor que en los grupos tratados con levamisol y teofilina, acorde con la menor afinidad de fenilalanina por la TNAP que levamisol y teofilina.

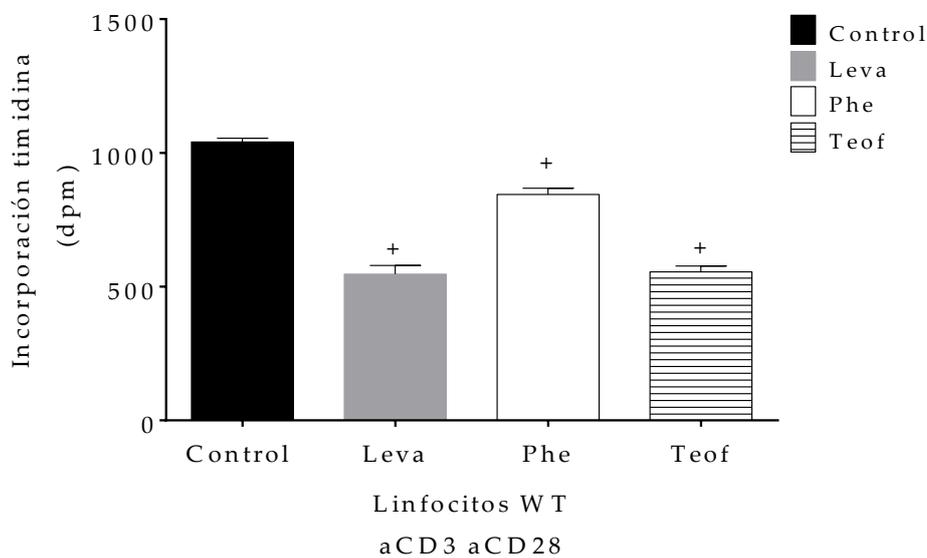


Figura 32. Ensayo de proliferación en células T WT con inhibidores TNAP mediante incorporación de timidina-³H]. Células T preincubadas 2h con inhibidores de TNAP: Levamisol (1 mM), Fenilalanina (5 mM) y Teofilina (1 mM) y estimuladas 24h con anti-CD3 (5 µg/ml)/anti-CD28 (1 µg/ml). 1 µCi de timidina-³H] fue incorporado. Los datos se expresan como media ± EEM (n=6). Se estudió la significación estadística de los datos mediante ANOVA de una vía. + *p* < 0,05 frente a control. . Leva=levamisol, Phe=fenilalanina, Teof=teofilina.

∴

DISCUSIÓN

La AP, y más concretamente su isoforma intestinal, ha cobrado importancia en los últimos años como molécula de interés terapéutico en enfermedades que cursan con alteraciones en la microbiota [14, 134, 136, 491]. Este hecho es el resultado de distintos estudios, incluyendo uno de nuestro grupo de investigación [15], que han demostrado que el LPS es una de sus dianas, que la IAP regula la permeabilidad intestinal y que, como consecuencia, su administración es beneficiosa en modelos animales de inflamación intestinal o de síndrome metabólico [9, 134, 492, 493]. Es más, ya existen ensayos clínicos destinados al estudio de su posible utilidad en estas enfermedades [11, 111, 137]. Como su nombre indica, la IAP se expresa en el intestino, preferentemente en el intestino delgado, mientras que en el colon la isoforma preponderante es la isoforma TNAP, que es además la isoforma predominante en modelos preclínicos de colitis. En el colon de enfermos con EII se ha descrito que la expresión IAP no se encuentra incrementada (de hecho, sus niveles de ARNm están disminuidos), pero que sí hay un aumento de actividad AP [73, 134]. En anteriores trabajos, nosotros hemos propuesto que el incremento de actividad puede deberse a la TNAP [494], y estamos actualmente intentando demostrarlo en humanos. El incremento de actividad AP ha sido demostrado por nuestro grupo en varios modelos de inflamación intestinal, incluyendo el modelo de colitis por TNBS, por DSS, colitis espontánea en ratas transgénicas HLA-B27, y colitis por transferencia linfocitaria [13, 14, 462]. En cualquier caso, el LPS es también un sustrato de la TNAP [10] y nuestro interés en los últimos años se ha centrado en estudiar el papel de la TNAP en la inflamación y, más concretamente, en la inflamación intestinal. De hecho, en trabajos anteriores describimos como el estrés oxidativo incrementa la actividad TNAP en enterocitos al inducir alteraciones en la glicosilación, sin alterar la expresión génica [15]. En ese estudio observamos además que otros componentes de la respuesta inflamatoria, como citoquinas o LPS, no reproducían este efecto, que es independiente de la activación de vías de transducción de señal mediadas por MAPK, NF- κ B, calcio o cAMP [15].

El estudio de la TNAP, en comparación con la IAP, se ve dificultado por varios factores, incluyendo la existencia de 3 isoformas que no varían en su secuencia nucleotídica o de aminoácidos, pero sí en su glicosilación, actividad y sensibilidad a inhibidores [1, 33]. Otro factor que dificulta el estudio de la TNAP es que sus isoformas son expresadas no sólo en células del epitelio intestinal, sino también en células del sistema inmunológico [16-19]. Por último, y éste es un factor común para todas las isoformas de AP, es necesario indicar que no existen anticuerpos comerciales con suficiente calidad de ninguna de las isoformas, lo que sin duda dificulta el estudio de estas enzimas.

Con el fin de estudiar el papel de la TNAP en la inflamación intestinal, y puesto que los ratones *knockout* homocigotos no son viables y mueren poco después del nacimiento [126], decidimos utilizar ratones haplodeficientes, es decir, ratones *knockout* heterocigotos para *Alpl* (TNAP^{+/-}), considerando que la ausencia de uno de los alelos podría traducirse en cambios biológicamente relevantes de expresión de la enzima. Nuestro primer objetivo fue por tanto caracterizar la expresión y la actividad de la fosfatasa alcalina en distintos tejidos, así como en el plasma. Nuestros resultados indican que, como era de esperar, la expresión de mRNA de *Alpl* en los ratones heterocigotos desciende a la mitad cuando se compara con la de ratones WT. No obstante, ese descenso de expresión no está asociado a un descenso comparable de la actividad, que se mantiene en todos los tejidos, excepto en riñón e íleon. Estos datos sugieren que, contrariamente a nuestras expectativas, la actividad AP no depende en general de la “dosis génica” de *Alpl*. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la sensibilidad de la actividad AP al levamisol, un inhibidor específico de TNAP, entre animales WT y TNAP^{+/-}, en casi todos los tejidos examinados. Las distintas isoformas de TNAP (renal, ósea y hepática) se diferencian, como se ha indicado, exclusivamente por su perfil de glicosilación. Los cambios a este nivel se traducen en diferencias en la actividad enzimática y en la sensibilidad a los inhibidores de la enzima, incluyendo el levamisol [14, 15]. Así pues, los resultados observados en la actividad, expresión y sensibilidad a levamisol indican que posiblemente en los ratones TNAP^{+/-} se producen cambios en el patrón de glicosilación, modificándose la actividad de la enzima (medida mediante p-nitrofenilfosfato). A su vez, la glicosilación de proteínas puede estar afectada por el recambio proteico, que es una posible consecuencia de la ausencia de uno de los alelos de *Alpl*, aunque la demostración directa requerirá en el futuro la caracterización de la glicosilación en ambos tipos de ratones (TNAP^{+/-} y WT). Estos resultados coinciden con otros previamente descritos por nosotros y por otros grupos de investigación [14, 81]. De hecho, en la colitis experimental tanto la actividad AP como la sensibilidad al inhibidor levamisol están aumentadas, en el tejido completo, así como en células epiteliales, y en éste último caso los cambios se han asociado a alteraciones a nivel post-translacional [15]. De manera similar, en estudios con adipocitos se ha descrito que la supresión casi completa del RNA de la TNAP (85-97%), como consecuencia del silenciamiento del gen *Alpl*, tan solo da lugar a una reducción de la actividad AP del 15-47%, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación post-traduccionales [7]. Aunque se trate de un extremo apenas estudiado, las diferencias en el perfil de glicosilación podrían afectar a la capacidad enzimática frente a distintos sustratos. De ser así, la actividad fosfatasa

en los ratones TNAP^{+/-} podría permanecer inalterada con respecto al p-nitrofenilfosfato, pero no para otros sustratos, incluyendo potencialmente los sustratos endógenos. Este hecho, que precisa confirmación experimental, reviste gran importancia a la hora de explicar el fenotipo inmunológico de estos animales (ver más adelante).

Como hemos indicado, en trabajos anteriores centramos nuestra atención sobre todo en el estudio de TNAP en células del epitelio intestinal, debido en parte a que el epitelio tiene un papel protagonista en la inactivación de LPS y otras moléculas procedentes de la microbiota luminal con el concurso de la propia IAP. Además, experimentos anteriores de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que los enterocitos en la colitis experimental presentan un aumento de la actividad fosfatasa alcalina, y ésta se incrementa asimismo en las heces, lo que sugiere una conexión mecánica [13, 14]. Nuestra hipótesis es que las células epiteliales sometidas a estrés en el contexto de la inflamación se “cargan” de TNAP y posteriormente ésta pasa al lumen intestinal cuando las células se descaman de forma natural. Sin embargo, los resultados obtenidos en ratones TNAP^{+/-} apuntaron prontamente a un papel regulador importante de esta enzima en la función de las células del sistema inmune, lo que resultaba indudablemente relevante en nuestra línea de investigación. Por tanto, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado el estudio de la función de la TNAP en células del sistema inmune. Inicialmente estudiamos el comportamiento de las células de bazo (esplenocitos) a modo de aproximación, y posteriormente realizamos una caracterización más en profundidad de los linfocitos T. El análisis del perfil de expresión génica y la determinación de la sensibilidad a inhibidores de la AP, como el levamisol, indicaron que estos tipos celulares expresan TNAP (es decir, el gen *Alpl*), pero no expresan ninguna forma de IAP (*Akp3* o *Akp6*) (datos no mostrados). Una de las funciones biológicas fundamentales de las distintas APs es la desfosforilación (y por tanto inactivación) de LPS, y es bien sabido que éste y otros componentes bacterianos modulan la respuesta inmunológica mediante la regulación de la expresión génica tras la interacción con distintos receptores. Por tanto, es plausible que los genes que codifican APs puedan ser a su vez regulados por el LPS. Así, estudios previos en peces cebra han puesto de manifiesto que el establecimiento de la microbiota induce la expresión de AP (IAP) en el intestino [113]. No obstante, estudios de nuestro grupo de investigación indicaron que en líneas celulares de epitelio intestinal el LPS no regula la expresión o la actividad AP. Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral muestran que la incubación de esplenocitos con LPS aumenta los niveles de mRNA de TNAP, tanto en células obtenidas de animales

WT como de heterocigotos. De estos resultados se deduce que la regulación por LPS de la expresión de AP es dependiente del tipo celular y que en esplenocitos *Alpl* es uno de los genes regulados por LPS. Así, en estas células la estimulación con LPS aparentemente aumenta la expresión de TNAP, y presumiblemente su actividad (no se ha medido en estas condiciones), y por tanto la capacidad de inactivación del propio LPS (y de otros sustratos), lo que tiene sentido desde el punto de vista fisiológico, y podría contribuir a la defensa. Es interesante considerar, en este sentido, que en el modelo de endotoxemia inducido por administración de LPS los ratones TNAP^{+/-} presentan una mayor inducción de genes de respuesta a la endotoxina, como *Tlr4* o *Lbp*, lo que cabe achacar a las mismas razones expuestas anteriormente (datos no mostrados). Alternativamente, la inducción de TNAP puede tener otras consecuencias, como la desfosforilación de sustratos como el ATP o la osteopontina. El LPS es una molécula asociada al daño por patógenos (PAMP) y el ATP es una molécula asociada al peligro o al daño (DAMP). La diferencia entre ambas es el origen; mientras que las DAMPs son producidas por el hospedador, las PAMPs son producidas por microorganismos. Sea como fuere, ambos tipos de moléculas median reacciones inflamatorias. Por ejemplo, el estrés y el daño tisular inducen la liberación al medio extracelular de ATP, que se comporta como un potente agente proinflamatorio. Siendo el ATP y el LPS sustratos de la TNAP, es lógico pensar que su expresión sea inducida en células del sistema inmune como parte del sistema de defensa. Actualmente estamos caracterizando la actividad enzimática en estas células con objeto de determinar si existe una correspondencia con los cambios observados en la expresión génica, así como determinando la actividad específica de sustrato, por las razones anteriormente mencionadas. Existe la posibilidad además de que la inducción de TNAP dependa del tipo de estímulo, en la medida en que nuestros datos actuales no confirman esta respuesta en linfocitos T WT estimulados con ConA, aunque sí en el caso de los linfocitos TNAP^{+/-} (datos no mostrados, pendientes de confirmación). El estudio de la relación *Alpl*/LPS, de la posibilidad de que otros antígenos bacterianos o lectinas puedan regular la expresión/actividad de TNAP en distintos tipos celulares, y el conocimiento de las vías de transducción de señal implicadas, son objetivos actuales del grupo de investigación.

Por otra parte, nuestros resultados muestran claramente que la TNAP regula la expresión de citoquinas en esplenocitos. Así, los perfiles de producción de citoquinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL17A) y de expresión de *Alpl* fueron similares, observándose una menor producción/expresión en esplenocitos procedentes de ratones heterocigotos que en los procedentes de ratones WT, en condiciones basales

y tras la estimulación con LPS o ConA. Por tanto, no se trata sólo de que la TNAP se induzca como parte de la respuesta de activación de los esplenocitos (al menos cuando se utiliza LPS como estímulo), sino también de que, cuando se modula su actividad por la ausencia de uno de los alelos *Alpl*, se produce una hiporrespuesta. Como es bien conocido, el LPS actúa como ligando de TLR4 en las células que expresan el receptor, en este caso fundamentalmente monocitos/macrófagos y células dendríticas, aunque los linfocitos B y T también presentan el receptor en su superficie, mientras que la ConA es una lectina que actúa como activador inespecífico (es decir, independiente de antígeno) del receptor de células T. Ambos estímulos inducen la proliferación y la diferenciación de células del sistema inmune, e inducen la expresión de distintas citoquinas como parte del espectro de acciones biológicas que forman parte de la activación celular. En consecuencia, la disminución de los niveles de citoquinas es indicativa de un menor grado de activación, proliferación y/o diferenciación de los distintos tipos celulares del bazo que entran a formar parte de la mezcla heterogénea que son los esplenocitos. Efectivamente, éstos contienen principalmente macrófagos y linfocitos T, siendo estos últimos los encargados de la respuesta inmunológica adaptativa, así como células dendríticas, linfocitos B y otros tipos celulares.

Como se ha señalado anteriormente, la TNAP está sobreexpresada en la inflamación intestinal, en parte debido a la infiltración de neutrófilos y más tarde de linfocitos. Basándonos en nuestros resultados con células de bazo y en resultados anteriores que indicaban un incremento de la TNAP en colon en modelos preclínicos de colitis, planteamos la hipótesis de trabajo de que la expresión de TNAP en células T es esencial para la función de estas células y el desarrollo de la colitis. Con el fin de explorar esta hipótesis utilizamos tres aproximaciones distintas. Por una parte, utilizamos los ratones heterocigotos para TNAP para estudiar el papel de la misma en linfocitos T aislados de bazo, tanto en condiciones basales como tras la estimulación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 o con ConA. Además, estimulamos *in vivo* linfocitos T de estos ratones utilizando anticuerpos anti-CD3. Por último, estudiamos el efecto de la transferencia de linfocitos procedentes de ratones heterocigotos en la inducción de colitis.

En cuanto a la caracterización del fenotipo de los linfocitos *in vitro*, cuando se aislaron células T de ratones WT y TNAP^{+/-} se puso de manifiesto que la liberación de citoquinas proinflamatorias está disminuida en éstas últimas, en consonancia con lo ya observado en células de bazo no fraccionadas (esplenocitos). Además, se observó que tanto los niveles de ARNm (Figura 9) como la actividad enzimática,

incluyendo la sensibilidad al inhibidor levamisol (Figura 5), fueron comparables en condiciones basales en ambos grupos, contrariamente a lo que se produce en la mayor parte de los tejidos examinados, y de forma similar a lo observado en el colon. No obstante, encontramos una respuesta sustancialmente distinta tras la estimulación *in vivo* con anti-CD3, ya que la expresión de *Alpl* fue inducida de forma significativa en las células T procedentes de ratones WT, pero no en las procedentes de ratones TNAP^{+/-} (Figura 9). Estos datos concuerdan con los obtenidos con LPS en esplenocitos, indicando que cuando se estimulan linfocitos *in vivo*, se induce expresión *Alpl*, pero al mismo tiempo indican que la ausencia de uno de los alelos impide esta respuesta, tal vez por reducir de forma general la activación celular.

Este fenotipo de hipoactivación se observa asimismo *in vivo*, utilizando un modelo clásico de estimulación de linfocitos T. La administración de anticuerpos monoclonales anti-CD3 tiene importantes consecuencias, que incluyen la estimulación de células T a corto plazo, con aumento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, una rápida reducción de linfocitos T circulantes, y un efecto inmunodepresor mantenido en el tiempo [21, 22]. Además y como consecuencia de estos cambios, la estimulación de linfocitos T produce descenso de temperatura e hipoglucemia [478]. De acuerdo con lo anterior, en nuestro experimento se produjo la esperada bajada de temperatura, acompañada de hipoglucemia e incremento de los niveles plasmáticos de IFN- γ y TNF- α . Además, en ratones WT se produjo linfopenia y una pronunciada sobreexpresión de *Ifng*, *Il4*, *Il5* y otras citoquinas en las células T. Estos efectos fueron atenuados por la falta del alelo en los ratones TNAP^{+/-}, con excepción del descenso en temperatura corporal y en la glucemia. Por tanto, nuestros resultados muestran que en ratones heterocigotos la inducción de células T con anticuerpos anti-CD3 es menor en los ratones TNAP^{+/-}, pudiendo este efecto ser consistente con una menor activación y/o proliferación de células T. De forma predecible, esta menor activación se observó asimismo en esplenocitos aislados de ratones TNAP^{+/-} frente a sus correspondientes controles WT.

Uno de los interrogantes que resultan de estos datos es si el incremento en la expresión de *Alpl* produce a su vez un incremento en la expresión proteica y, en consecuencia, una mayor actividad enzimática. Cuando se estudió la estimulación de linfocitos T WT y TNAP^{+/-} con anti-CD3/anti-CD28 *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en la actividad AP, aunque sí una cierta tendencia a presentar niveles menores en las células heterocigóticas ($p = 0,1$). Por su parte, la sensibilidad a la inhibición por levamisol *in vitro* quedó significativamente disminuida en los linfocitos TNAP^{+/-} (figura 5). Así, la actividad AP en linfocitos WT

fue claramente sensible a la inhibición con levamisol, mientras que la de linfocitos TNAP^{+/-} no lo fue; este resultado es comparable a los obtenidos en casi todos los tejidos estudiados, lo que nuevamente sugiere cambios en el patrón de glicosilación de TNAP en los linfocitos T heterocigóticos. No disponemos actualmente de datos de actividad en células estimuladas con ConA. La expresión de TNAP en linfocitos T ya había sido descrita anteriormente por otros autores [19], y su actividad enzimática ha sido considerada comparable a la del hígado, es decir, relativamente baja y resistente a la inhibición por levamisol (de hecho induce la actividad enzimática ligeramente a concentraciones altas de levamisol). Por el contrario, este grupo no constató un aumento de expresión del gen *Alpl* o de la actividad TNAP en células T murinas tras la estimulación con ConA *in vitro*. Por tanto, los resultados de Latheef y colaboradores coinciden con los nuestros en cuanto a la expresión de TNAP por parte de los linfocitos T, pero no en cuanto a su modulación por estímulos celulares [19]. Se desconoce la razón de esta discrepancia, aunque podría ser debida a que la estimulación de linfocitos T con ConA es relativamente baja si la comparamos con la estimulación obtenida con anti-CD3/anti-CD28 (comparar Figura 4 A y B), o bien, como se ha indicado anteriormente, a que la respuesta inductora de TNAP dependa del tipo de estímulo utilizado. Dada la magnitud del efecto inhibitor, y su relación con la expresión génica, actualmente estamos estudiando si el incremento de la expresión de *Alpl* en linfocitos estimulados con LPS o *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 induce también cambios en la actividad/glicosilación de la enzima en sentido contrario.

Los resultados anteriores demuestran que los linfocitos TNAP^{+/-} presentan un fenotipo de hiporrespuesta a estímulos celulares, el cual se manifiesta utilizando modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En ambos casos se trata de modelos agudos y un tanto alejados del modo fisiológico de estimulación inmunológica. Con el fin de confirmar la importancia de la TNAP linfocitaria decidimos estudiar la influencia de la misma en el desarrollo de la colitis dependiente de células T, empleando el modelo de colitis por transferencia linfocitaria. Este modelo es considerado ideal para el estudio de la función de linfocitos en la colitis y ha sido de hecho utilizado en la descripción de la función de linfocitos T reguladores [460, 495]. Además, el modo de estimulación de los linfocitos T es indudablemente más fisiológico, y tiene carácter crónico. El modelo está basado en la administración de células T CD4⁺ *naïve* de ratones sanos a ratones deficientes en células T y B. Los linfocitos transferidos presentan un desequilibrio inmunológico de partida por la falta de linfocitos reguladores, y la expansión linfocitaria de la población transferida con el tiempo produce una reacción inflamatoria intestinal dirigida a la microbiota, con pancolitis

y afectación variable del intestino delgado, en 5-8 semanas. A nivel histopatológico se produce una inflamación transmural con hiperplasia epitelial e infiltración leucocitaria, que afecta no sólo al colon sino también a zonas del intestino delgado. Esta inflamación es por tanto similar a la que se observa en la enfermedad de Crohn. En consonancia con la capacidad reducida de activación anteriormente descrita, la transferencia de células T CD4⁺ *naïve* de ratones TNAP^{+/-} (sanos) a ratones receptores inmunodeficientes Rag1^{-/-}, los cuales carecen de linfocitos T y B, desencadenó una colitis de intensidad reducida en comparación con la derivada de células WT, con base en la mayor longitud del colon, menor índice de daño macroscópico, disminución de IFN- γ e incremento de la producción de IL-10 por células de ganglios mesentéricos, entre otros parámetros. Los animales transferidos con células TNAP^{+/-} presentan niveles reducidos del marcador de células Th1 Tbet (*Tbx21*) en el colon, menores niveles plasmáticos y tisulares de IFN- γ , y una disminución del número de células CD4⁺ IFN- γ ⁺ en ganglios mesentéricos, lo que indica una inhibición global de la respuesta Th1. Por el contrario, la producción colónica de IL17A estaba aumentada, sin cambios en la expresión del marcador ROR γ t. A pesar de que los niveles de IL-10 fueron en general menores, había más células Treg (CD4⁺ FOXP3⁺) en los ganglios mesentéricos. Estos datos sugieren una modulación compleja de la respuesta inflamatoria más que una inhibición simple de la activación de los linfocitos.

Este experimento cuenta con sendos grupos control en los que se transfirió la población linfocitaria de origen de ratones WT o TNAP^{+/-} sin fraccionamiento, es decir, sin la retirada de los linfocitos reguladores. En estos casos no llega a producirse respuesta inflamatoria, o bien se induce una respuesta mínima (cita). En este caso fue efectivamente así, pero se puso de manifiesto una bajada drástica del número de linfocitos, monocitos y neutrófilos en la sangre de ratones Rag1^{-/-} transferidos con esplenocitos TNAP^{+/-} no fraccionados. Este descenso se registró de hecho no sólo con respecto al grupo WT no fraccionado, sino también con respecto a ambos grupos colíticos. Puesto que los ratones Rag1^{-/-} carecen de linfocitos T y B maduros, normalmente presentan un número de linfocitos circulantes reducido, por lo que los linfocitos medidos en el hemograma corresponde principalmente a la expansión de las células transferidas [496]. Por lo tanto, nuestros resultados indican que las células T no fraccionadas procedentes de ratones TNAP^{+/-} no logran expandirse y colonizar eficientemente el ratón Rag1^{-/-}, mientras que en el caso de la transferencia de células TNAP^{+/-} *naïve*, sí se produce la expansión, presumiblemente gracias a la reactividad de los linfocitos hacia la microbiota y la consiguiente colitis. Este resultado sugiere a su vez que la capacidad proliferativa de los linfocitos T

TNAP^{+/-} está disminuida, extremo que efectivamente se confirma mediante los experimentos realizados *in vitro*, y que muestran una menor incorporación de timidina en los linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28. El mecanismo responsable de la inhibición de la respuesta proliferativa se desconoce, pero podría estar relacionado con la modulación de los productos de los genes *Klf4* y *Spib*, involucrados en la proliferación de linfocitos T, los cuales presentan niveles de expresión reducidos en los linfocitos T TNAP^{+/-} (si bien las diferencias no son significativas). En cualquier caso, la TNAP ha sido implicada previamente en la proliferación celular [3] y en la expresión de adipocinas [7] en cultivos celulares neuronales y adiposo, respectivamente. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos adicionales para caracterizar el papel de la TNAP en la inducción de la función de células T y la colitis dependiente de células T.

Pese a la aparente modulación diferencial de linfocitos T en la colitis por transferencia linfocitaria en los ratones que recibían linfocitos WT o TNAP^{+/-} (Th1/Th17/Treg), los experimentos de polarización *in vitro* no mostraron ninguna tendencia particular en estas células, lo que significa que el efecto predominante de la ausencia de un alelo *Alpl* es la menor activación y proliferación, y que las alteraciones observadas *in vivo* son en buena medida consecuencia de las características del propio modelo.

Desde el punto de vista farmacológico/terapéutico, la posibilidad de modulación del sistema inmunológico mediante la interferencia con la TNAP resulta evidente, a la luz de los resultados obtenidos. Nuestros datos indican que tanto los cambios en la glicosilación y por tanto en la isoforma, así como el propio nivel de expresión y actividad enzimática, afectan a la funcionalidad del linfocito T. El segundo factor es susceptible de intervención, ya que disponemos de varios inhibidores de la fosfatasa alcalina del tipo TNAP. Por tanto, teníamos interés en dilucidar si de esta forma se reproducen los efectos de la ausencia de uno de los alelos *Alpl* y, efectivamente, los 3 inhibidores ensayados inhiben la respuesta proliferativa a anti-CD3/anti-CD28. Paradójicamente el levamisol es considerado un fármaco inmunoestimulante en humanos, debido en parte a sus efectos sobre linfocitos T y B, aunque el mecanismo no ha sido caracterizado. En todo caso, el tratamiento con levamisol mejora la colitis experimental en ratas, según datos de nuestro grupo de investigación de hace varios años [14].

Nuestros resultados parecen indicar que las células T activadas sufren un cambio en la expresión de TNAP, que implica un incremento en la actividad enzimática y una mayor sensibilidad al inhibidor levamisol, y que la ausencia de un

alelo en las células TNAP^{+/-} hace que este cambio no se produzca. Es más, el hecho de que el tratamiento de las células T WT con tres inhibidores distintos de AP reproduzca las características observadas en linfocitos T TNAP^{+/-}, es decir, una menor producción de citoquinas y una menor respuesta proliferativa, sugiere una relación directa entre la actividad enzimática y este fenotipo. Al igual que en otros órganos del ratón TNAP^{+/-}, en los linfocitos T activados pueden estar produciéndose diferencias en el patrón de glicosilación de la enzima. El efecto de los inhibidores y el hecho de que la actividad AP en linfocitos T TNAP^{+/-} sea resistente al levamisol sugieren que la forma expresada por estas células sea la isoforma hepática. No obstante, se necesitan estudios adicionales para confirmar esta hipótesis. En particular, no hemos analizado la expresión de otras isoformas de AP, que podrían estar afectando la actividad AP, así como la sensibilidad a levamisol.

Nuestros resultados no nos permiten establecer el mecanismo responsable del fenotipo de los linfocitos T TNAP^{+/-}, aunque una posibilidad es la desfosforilación de mediadores de señalización relevantes, como la osteopontina o nucleótidos que regulan la señalización por receptores de purinas [3]. En este sentido, es cuanto menos interesante constatar la existencia de niveles de ARNm del gen *Spp1*, que codifica la osteopontina, notablemente diferentes entre células T WT y TNAP^{+/-}. De hecho, la expresión de osteopontina es menor en linfocitos T obtenidos de ratones TNAP^{+/-} que de WT en condiciones basales, pero al estimularlos con anticuerpos anti-CD3 *in vivo* se produce una inversión completa del perfil de expresión, la cual disminuye en linfocitos T WT y aumenta en linfocitos T TNAP^{+/-}. Se ha descrito que la AP incrementa la expresión génica de osteopontina, incrementando la concentración de fosfato libre en osteoblastos [497]. Además, la osteopontina es una diana fisiológica de la TNAP y su actividad, que incluye efectos inmunomoduladores, está regulada por fosforilación [498-501]. Entre las células T, la expresión basal de *Spp1* parece ser baja, excepto en el caso de células memoria [502]. La osteopontina secretada tiene efectos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, aunque parecen predominar los primeros [500]. Teniendo en cuenta la actividad relativa de las formas fosforilada y no fosforilada de la osteopontina, el efecto de la desfosforilación (por la TNAP, en este caso) no es coherente con la menor activación celular observada, en principio. En cualquier caso, como se ha comentado anteriormente, es necesario considerar también el posible efecto de los cambios en la glicosilación a nivel de la especificidad/afinidad por los distintos sustratos, lo que podría hacer variar considerablemente nuestra interpretación de estos resultados. No obstante, se trata de una hipótesis meramente especulativa, que deberá ser explorada en experimentos futuros.

En definitiva, nuestros resultados demuestran que la TNAP modula la función de linfocitos T murinos *in vitro* e *in vivo*, y específicamente el desarrollo de la colitis dependiente de linfocitos T. Las células T activadas presentan un aumento de la actividad TNAP y una mayor sensibilidad de la misma al inhibidor específico levamisol, lo que indica un cambio en el patrón de glicosilación de la enzima de forma asociada al aumento de la transcripción. Las células T presentan un fenotipo con respuesta atenuada a estímulos activadores si expresan la isoforma TNAP resistente a levamisol (células T TNAP^{+/-}), en cuyo caso la propia inducción de la TNAP anteriormente descrita no se produce de forma normal, o bien si son tratadas con inhibidores de TNAP. La inhibición de la respuesta a estímulos de los linfocitos T se caracteriza por una menor secreción de citoquinas proinflamatorias y una menor capacidad proliferativa, sin cambios en la capacidad de polarización. Se trata de una vía de señalización de interés no sólo académico, sino potencialmente también terapéutico, ya que abre la posibilidad de intervención farmacológica en enfermedades dependientes de linfocitos T mediante la utilización de inhibidores específicos. En este sentido, será necesario establecer la eficacia y seguridad de inhibidores distintos a los empleados; por ejemplo, el levamisol es neurotóxico a dosis elevadas y puede tener, como se ha comentado, acciones farmacológicas adicionales, mientras que la teofilina es conocida por sus propiedades como inhibidor de fosfodiesterasas y modulador de la acetilación de histonas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La falta de un alelo de *Alpl* no altera en general la actividad AP en distintos tejidos (medida utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato), pero sí altera la sensibilidad enzimática *in vitro* al inhibidor específico levamisol, lo que sugiere cambios en el patrón de glicosilación de la enzima.
2. La TNAP modula la función de los linfocitos T, siendo necesaria para su completa activación. Tanto en células T de ratones heterocigotos para *Alpl*, activadas por anticuerpos anti-CD3 ϵ /anti-CD28, como en células T tratadas con inhibidores específicos de la enzima hemos descrito una disminución de la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y la reducción de la respuesta proliferativa. La importancia de la TNAP en la función de los linfocitos T ha sido puesta de manifiesto asimismo *in vivo*, incluyendo una respuesta inflamatoria atenuada en el modelo de colitis crónica por transferencia linfocitaria.
3. Hemos relacionado las alteraciones en la activación de células T con la regulación de la TNAP mediante modificaciones transcripcionales y postrcripcionales (cambios en la glicosilación de la enzima), lo que introducen nuevas posibilidades en el manejo de la inflamación.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. The lack of one Alpl allele does not alter in general AP activity in the different tissues, as measured using p-nitrophenylphosphate as substrate, but it affects enzyme sensitivity to the specific inhibitor levamisole, suggesting changes in glycosylation
2. TNAP modulates T lymphocyte function, being essential for its complete activation. We have shown an impaired production and release of proinflammatory cytokines, and a hampered proliferative response, both in anti-CD3/anti-CD28 activated TNAP^{+/-} T cells and in T cells treated with AP specific inhibitors. TNAP dependent T cell function occurs also in vivo, including a milder T cell transfer colitis
3. We have described alterations in T cell activation related to TNAP regulation through transcriptional and postranscriptional (changes in enzyme glycosylation) modifications that open up possible new strategies to modulate inflammation.

ANEXOS

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
AG	Ácidos grasos
ALPI	Fosfatasa alcalina intestinal
ALPL	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
Alpl	Fosfatasa alcalina no específica de tejido
ALPP	Fosfatasa alcalina placentaria
ALPPL2	Fosfatasa alcalina de células germinales
ANKH	proteína homóloga del responsable de anquilosis progresiva; <i>progressive ankylosis protein homolog</i>
AOM	Azoximetano
AP	Fosfatasa alcalina; <i>Alkaline Phosphatase</i>
APC	Célula presentadora de antígenos; <i>Antigen Presenting Cell</i>
ARNm	ARN mensajero
Ci	Curio
ConA	Concanavalina A
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CU	Colitis Ulcerosa
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
dIAP	Fosfatasa alcalina intestinal tipo duodenal
dNTP	Desoxinucleótidos
DSS	Sulfato de dextrano sódico
EAP	Fosfatasa alcalina embrionaria
EC	Enfermedad de Crohn
ECAP	Fosfatasa alcalina de <i>Escherichia coli</i>
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FBI	Función Barrera Intestinal
FKHR	<i>forkhead box O1</i>
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino; <i>Gut-Associated lymphoid Tissue</i>
GCAP	Fosfatasa alcalina de células germinales
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
gIAP	Fosfatasa alcalina intestinal tipo global
GPI	proteína de anclaje glicosil-fosfatidil-inositol
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i>
Gy	Gray
H&E	Hematoxilina y Eosina

Hb	Hemoglobina
HCT	Hematocrito
HPP	Hipofosfatasa
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HTAB	Bromuro de hexametiltrimetilamonio
IAP	Fosfatasa alcalina intestinal
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IEC	Células intestinales epiteliales; <i>Intestinal Epithelial Cell</i>
IFN	Interferon
IL-	Interleuquina-
ILC	Células linfoides innatas; <i>Innate Lymphoid Cells</i>
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KLF-	<i>Kruppel-like factor 4</i>
KO	<i>Knockout</i>
LAL	<i>Lymulus Amebocyte Lysate</i>
L-hArg	L-homoarginina
L-Phe	L-fenilalanina
LPS	lipopolisacárido bacteriano
MDP	Muramildipéptido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MLNC	Células de ganglios linfáticos mesentéricos; <i>Mesenteric Lymph Node Cell</i>
MPO	Mieloperoxidasa
NEC	Enterocolitis necrotizante
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NF-κB	factor nuclear κB
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptores tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
NOD	dominio de oligomerización por unión de nucleótidos; <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
Notch	<i>neurogenic locus notch homolog protein</i>
OPN	osteopontina
PAMP	patrón molecular asociado a patógeno; <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PHOSPHO1	fosfatasa huérfana 1; <i>Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase</i>
Pi	Fosfato inorgánico

PL	Piridoxal
PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria
PLP	Piridoxal fosfato
PLT	Plaquetas
PPi	Pirofosfato inorgánico
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RANTES	<i>CCL-5</i>
RBC	Hematíes
RelA	NF- κ Bp65
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNC	Sistema nervioso central
TLR	Receptores tipo Toll; <i>Toll Like Receptor</i>
TNAP	Fosfatasa alcalina no específica de tejido; <i>Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase</i>
TNBS	Ácido trinitrobenceno sulfónico
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSLP	<i>thymic stromal lymphopietin</i>
VCAM	molécula de adhesión vascular 1; <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF-A y col.	factotr de crecimiento endotelial vascular; <i>vascular endothelial growth factor</i> y colaboradores

II. ÍNDICE DE TABLAS

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

III. ÍNDICE DE ESQUEMAS

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Millan, J.L., *Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 335-41.
2. Hanics, J., et al., *Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(2): p. 459-71.
3. Kermer, V., et al., *Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation*. Neurosci Lett, 2010. **485**(3): p. 208-11.
4. Diez-Zaera, M., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(7): p. 1014-24.
5. Street, S.E., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord*. J Neurosci, 2013. **33**(27): p. 11314-22.
6. Diaz-Hernandez, M., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32539-48.
7. Hernandez-Mosqueira, C., C. Velez-delValle, and W. Kuri-Harcuch, *Tissue alkaline phosphatase is involved in lipid metabolism and gene expression and secretion of adipokines in adipocytes*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(12): p. 2485-96.
8. Goldberg, R.F., et al., *Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3551-6.
9. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota*. Gut, 2010. **59**(11): p. 1476-84.
10. Poelstra, K., et al., *Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1163-9.
11. Lukas, M., et al., *Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(7): p. 1180-6.
12. Torres, M.I., et al., *A new approach using tissue alkaline phosphatase histochemistry to identify Crohn's disease*. Pathol Res Pract, 2007. **203**(6): p. 485-7.
13. Martinez-Moya, P., et al., *Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 144-53.
14. Sanchez de Medina, F., et al., *Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2317-26.
15. Lopez-Posadas, R., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is activated in enterocytes by oxidative stress via changes in glycosylation*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(2): p. 543-56.
16. Borregaard, N., et al., *Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(1): p. 80-7.
17. Marquez, C., et al., *Expression of alkaline phosphatase in murine B lymphocytes. Correlation with B cell differentiation into Ig secretion*. J Immunol, 1989. **142**(9): p. 3187-92.
18. Bauer, J. and V. Kachel, *The increase of electrophoretic mobility and alkaline phosphatase activity are parallel events during B-cell maturation*. Immunol Invest, 1990. **19**(1): p. 57-68.

19. Latheef, S.A., et al., *Differential expression of alkaline phosphatase gene in proliferating primary lymphocytes and malignant lymphoid cell lines*. Immunol Lett, 2016. **170**: p. 37-41.
20. Narisawa, S., M.C. Yadav, and J.L. Millan, *In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(7): p. 1587-98.
21. Kohm, A.P., et al., *Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4525-34.
22. Hirsch, R., et al., *Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. I. Immunosuppression of transplantation responses*. J Immunol, 1988. **140**(11): p. 3766-72.
23. Hoylaerts, M.F., T. Manes, and J.L. Millan, *Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase*. Biochem J, 1992. **286 (Pt 1)**: p. 23-30.
24. Henthorn, P.S., et al., *Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1234-8.
25. Knoll, B.J., K.N. Rothblum, and M. Longley, *Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. Evolution of the 5' flanking region by deletion/substitution*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 12020-7.
26. Millan, J.L. and T. Manes, *Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(9): p. 3024-8.
27. Griffin, C.A., et al., *Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37*. Am J Hum Genet, 1987. **41**(6): p. 1025-34.
28. Martin, D., et al., *The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37*. Ann Hum Genet, 1987. **51**(Pt 2): p. 145-52.
29. Kishi, F., S. Matsuura, and T. Kajii, *Nucleotide sequence of the human liver-type alkaline phosphatase cDNA*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(5): p. 2129.
30. Weiss, M.J., et al., *Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7182-6.
31. Matsuura, S., F. Kishi, and T. Kajii, *Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **168**(3): p. 993-1000.
32. Studer, M., et al., *Characterization of a second promoter for the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene: cell and tissue specific expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(3): p. 1352-60.
33. Millán, J.L., *Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology*. Gene Structure. 2006.
34. Terao, M., et al., *Mapping of gene encoding mouse placental alkaline phosphatase to chromosome 4*. Somat Cell Mol Genet, 1988. **14**(2): p. 211-5.
35. Manes, T., et al., *Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes*. Genomics, 1990. **8**(3): p. 541-54.
36. Narisawa, S., et al., *A novel phosphatase upregulated in Akp3 knockout mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(5): p. G1068-77.

37. Komoda, T., et al., *Ontogenic and phylogenic studies of intestinal, hepatic, and placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development.* Gastroenterology, 1986. **91**(2): p. 277-86.
38. Merchant-Larios, H., F. Mendlovic, and A. Alvarez-Buylla, *Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse.* Differentiation, 1985. **29**(2): p. 145-51.
39. MacGregor, G.R., B.P. Zambrowicz, and P. Soriano, *Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells.* Development, 1995. **121**(5): p. 1487-96.
40. Narisawa, S., et al., *Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse.* Dev Dyn, 1994. **201**(3): p. 227-35.
41. Hoshi, K., et al., *Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice.* Histochem Cell Biol, 1997. **107**(3): p. 183-91.
42. Fonta, C., et al., *Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission.* Cereb Cortex, 2004. **14**(6): p. 595-609.
43. Langer, D., et al., *Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited.* Cell Tissue Res, 2008. **334**(2): p. 199-217.
44. Brun-Heath, I., et al., *Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues.* Cell Tissue Res, 2011. **343**(3): p. 521-36.
45. Eliakim, R., et al., *Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon.* Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. G425-34.
46. Shao, J.S., et al., *Effect of tissue non-specific alkaline phosphatase in maintenance of structure of murine colon and stomach.* Microsc Res Tech, 2000. **51**(2): p. 121-8.
47. Sato, N., Y. Takahashi, and S. Asano, *Preferential usage of the bone-type leader sequence for the transcripts of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in neutrophilic granulocytes.* Blood, 1994. **83**(4): p. 1093-101.
48. Heath, J.K., et al., *Retinoic acid stimulates transcriptional activity from the alkaline phosphatase promoter in the immortalized rat calvarial cell line, RCT-1.* Mol Endocrinol, 1992. **6**(4): p. 636-46.
49. Scheibe, R.J., I. Moeller-Runge, and W.H. Mueller, *Retinoic acid induces the expression of alkaline phosphatase in P19 teratocarcinoma cells.* J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21300-5.
50. Escalante-Alcalde, D., et al., *Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-specific alkaline phosphatase gene expression.* Mech Dev, 1996. **57**(1): p. 21-32.
51. Zernik, J., B. Kream, and K. Twarog, *Tissue-specific and dexamethasone-inducible expression of alkaline phosphatase from alternative promoters of the rat bone/liver/kidney/placenta gene.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **176**(3): p. 1149-56.
52. Gianni, M., et al., *Retinoic acid and cyclic AMP synergistically induce the expression of liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene in L929 fibroblastic cells.* Biochem J, 1993. **296** (Pt 1): p. 67-77.
53. Orimo, H. and T. Shimada, *Regulation of the human tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression by all-trans-retinoic acid in SaOS-2 osteosarcoma cell line.* Bone, 2005. **36**(5): p. 866-76.

54. Hatta, M., et al., *Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR*. Int J Mol Med, 2002. **9**(2): p. 147-52.
55. Yusa, N., et al., *Transcription factor Sp3 activates the liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase promoter in hematopoietic cells*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(5): p. 772-7.
56. Sowa, H., et al., *Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36024-31.
57. Sowa, H., et al., *Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(7): p. 1190-9.
58. Hahnel, A.C., et al., *Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo*. Development, 1990. **110**(2): p. 555-64.
59. Hustin, J., J. Collette, and P. Franchimont, *Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumours*. Int J Androl, 1987. **10**(1): p. 29-35.
60. Chang, C.H., D. Angellis, and W.H. Fishman, *Presence of the rare D-variant heat-stable, placental-type alkaline phosphatase in normal human testis*. Cancer Res, 1980. **40**(5): p. 1506-10.
61. Goldstein, D.J., C. Rogers, and H. Harris, *A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus*. Clin Chim Acta, 1982. **125**(1): p. 63-75.
62. Fishman, L., et al., *Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzymes of human placenta and their occurrence in human cancer*. Cancer Res, 1976. **36**(7 pt 1): p. 2268-73.
63. Beckman, G., et al., *Placental alkaline phosphatase types and transplacental IgG transport*. Hum Hered, 1995. **45**(1): p. 1-5.
64. Fishman, W.H., *Immunology and biochemistry of the Regan isoenzyme*. Prostate, 1980. **1**(4): p. 399-410.
65. Prakash, U.N. and K. Srinivasan, *Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats*. Br J Nutr, 2010. **104**(1): p. 31-9.
66. Martin, L., et al., *Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc*. Arch Anim Nutr, 2013. **67**(3): p. 248-61.
67. Sogabe, N., et al., *Enhancement effects of vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) on intestinal alkaline phosphatase activity in rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2007. **53**(3): p. 219-24.
68. Mineo, H., et al., *Ingestion of potato starch containing esterified phosphorus increases alkaline phosphatase activity in the small intestine in rats*. Nutr Res, 2010. **30**(5): p. 341-7.
69. Strom, M., J. Krisinger, and H.F. DeLuca, *Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1090**(3): p. 299-304.
70. Yeh, K., et al., *Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 3): p. 893-9.

71. Alkhoury, F., et al., *Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(2): p. G285-90.
72. Shin, J., et al., *The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like factor 5 (KLF5)-dependent manner*. J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 25306-16.
73. Malo, M.S., et al., *The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression*. DNA Cell Biol, 2006. **25**(12): p. 684-95.
74. Le Du, M.H., et al., *Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9158-65.
75. Xu, X. and E.R. Kantrowitz, *A water-mediated salt link in the catalytic site of Escherichia coli alkaline phosphatase may influence activity*. Biochemistry, 1991. **30**(31): p. 7789-96.
76. Zalatan, J.G., T.D. Fenn, and D. Herschlag, *Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion*. J Mol Biol, 2008. **384**(5): p. 1174-89.
77. Kozlenkov, A., et al., *Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22992-9.
78. Tsonis, P.A., W.S. Argraves, and J.L. Millan, *A putative functional domain of human placental alkaline phosphatase predicted from sequence comparisons*. Biochem J, 1988. **254**(2): p. 623-4.
79. Ghosh, K., et al., *Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase--role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases*. J Struct Biol, 2013. **184**(2): p. 182-92.
80. Martins, M.J., M.R. Negrao, and C. Hipolito-Reis, *Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated*. Clin Biochem, 2001. **34**(6): p. 463-8.
81. Halling Linder, C., et al., *Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms*. Bone, 2009. **45**(5): p. 987-93.
82. Low, M.G. and A.R. Saltiel, *Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes*. Science, 1988. **239**(4837): p. 268-75.
83. Gamage, D.G. and T.L. Hendrickson, *GPI transamidase and GPI anchored proteins: oncogenes and biomarkers for cancer*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. **48**(5): p. 446-64.
84. Wilson, P.D., G.P. Smith, and T.J. Peters, *Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils*. Histochem J, 1983. **15**(3): p. 257-64.
85. Whyte, M.P., et al., *Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism*. J Clin Invest, 1985. **76**(2): p. 752-6.
86. Say, J.C., et al., *Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1074**(2): p. 256-62.
87. Kumar, V. and A. Sharma, *Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential*. Eur J Pharmacol, 2009. **616**(1-3): p. 7-15.
88. Pettengill, M., et al., *Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine*. J Biol Chem, 2013. **288**(38): p. 27315-26.

89. Tuin, A., et al., *On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(2): p. G377-85.
90. Kapojos, J.J., et al., *Induction of glomerular alkaline phosphatase after challenge with lipopolysaccharide*. Int J Exp Pathol, 2003. **84**(3): p. 135-44.
91. Glogowski, J., D.R. Danforth, and A. Ciereszko, *Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline*. J Androl, 2002. **23**(6): p. 783-92.
92. Kozlenkov, A., et al., *Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(11): p. 1862-72.
93. Hussein, A., et al., *Theophylline stimulates cAMP-mediated signaling associated with growth regulation in human cells from pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelia*. Int J Oncol, 2005. **27**(1): p. 155-60.
94. Vang, T., et al., *Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 497-507.
95. Lin, C.W. and W.H. Fishman, *L-Homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3082-7.
96. Malo, M.S., et al., *Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(10): p. G826-38.
97. Fishman, W.H. and H.G. Sie, *Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta; L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoarginine*. Enzymologia, 1971. **41**(3): p. 141-67.
98. Harris, H., *The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know*. Clin Chim Acta, 1990. **186**(2): p. 133-50.
99. Akiba, Y., et al., *Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(6): p. G1223-33.
100. Mizumori, M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 14): p. 3651-63.
101. Glickman, R.M., et al., *Increased lymph alkaline phosphatase after fat feeding: effects of medium chain triglycerides and inhibition of protein synthesis*. Biochim Biophys Acta, 1970. **201**(2): p. 226-35.
102. Hodin, R.A., et al., *Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 1): p. G83-9.
103. Nakano, T., et al., *Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1439-49.
104. Narisawa, S., et al., *Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7525-30.
105. Lynes, M., et al., *Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(6): p. R1738-47.
106. Lynes, M.D. and E.P. Widmaier, *Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet*. Life Sci, 2011. **88**(9-10): p. 384-91.

107. Tran, T.T., et al., *Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 25201-10.
108. Kaunitz, J.D. and Y. Akiba, *Purinergic regulation of duodenal surface pH and ATP concentration: implications for mucosal defence, lipid uptake and cystic fibrosis*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **201**(1): p. 109-16.
109. Jerala, R., *Structural biology of the LPS recognition*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(5): p. 353-63.
110. Trent, M.S., *Biosynthesis, transport, and modification of lipid A*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 71-86.
111. Kats, S., et al., *Prophylactic treatment with alkaline phosphatase in cardiac surgery induces endogenous alkaline phosphatase release*. Int J Artif Organs, 2012. **35**(2): p. 144-51.
112. Huizinga, R., et al., *Endotoxin- and ATP-neutralizing activity of alkaline phosphatase as a strategy to limit neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 266.
113. Bates, J.M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 371-82.
114. Chen, K.T., et al., *Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(2): p. G467-75.
115. Wilkes, J.M., A. Garner, and T.J. Peters, *Studies on the localization and properties of rat duodenal HCO₃⁻-ATPase with special relation to alkaline phosphatase*. Biochim Biophys Acta, 1987. **924**(1): p. 159-66.
116. Moss, A.K., et al., *Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(6): p. G597-604.
117. Hessle, L., et al., *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9445-9.
118. Harmey, D., et al., *Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders*. Am J Pathol, 2004. **164**(4): p. 1199-209.
119. Ho, A.M., M.D. Johnson, and D.M. Kingsley, *Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis*. Science, 2000. **289**(5477): p. 265-70.
120. Yadav, M.C., et al., *Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of *PHOSPHO1* and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(2): p. 286-97.
121. Orimo, H., *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease*. J Nippon Med Sch, 2010. **77**(1): p. 4-12.
122. Hori, Y., et al., *Impaired transport of lipopolysaccharide across the hepatocytes in rats with cerulein-induced experimental pancreatitis*. Pancreas, 1998. **16**(2): p. 148-53.
123. Baumann, J.M., et al., *The role of inhibitors and other factors in the pathogenesis of recurrent calcium-containing renal stones*. Clin Sci Mol Med, 1977. **53**(2): p. 141-8.
124. Amadasi, A., et al., *Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents*. Curr Med Chem, 2007. **14**(12): p. 1291-324.

125. Narisawa, S., C. Wennberg, and J.L. Millan, *Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization*. J Pathol, 2001. **193**(1): p. 125-33.
126. Waymire, K.G., et al., *Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6*. Nat Genet, 1995. **11**(1): p. 45-51.
127. Fonta, C., et al., *Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2005. **486**(2): p. 179-96.
128. Vardy, E.R., et al., *Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease*. Neurodegener Dis, 2012. **9**(1): p. 31-7.
129. Kim, M.K., et al., *Serum alkaline phosphatase, body composition, and risk of metabolic syndrome in middle-aged Korean*. Endocr J, 2013. **60**(3): p. 321-8.
130. Gomez-Zorita, S., et al., *Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress*. Br J Nutr, 2012. **107**(2): p. 202-10.
131. Ali, A.T., et al., *The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue*. Ann Clin Biochem, 2006. **43**(Pt 3): p. 207-13.
132. Ali, A.T., et al., *Ethnic differences in pre-adipocyte intracellular lipid accumulation and alkaline phosphatase activity*. Clin Chim Acta, 2015. **438**: p. 382-7.
133. Burg, D.L. and T.L. Feldbush, *Late events in B cell activation. Expression of membrane alkaline phosphatase activity*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 381-7.
134. Tuin, A., et al., *Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats*. Gut, 2009. **58**(3): p. 379-87.
135. Rentea, R.M., et al., *Radiation-induced changes in intestinal and tissue-nonspecific alkaline phosphatase: implications for recovery after radiation therapy*. Am J Surg, 2016. **212**(4): p. 602-608.
136. Kaliannan, K., et al., *Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 7003-8.
137. Heemskerck, S., et al., *Alkaline phosphatase treatment improves renal function in severe sepsis or septic shock patients*. Crit Care Med, 2009. **37**(2): p. 417-23, e1.
138. Tunjungputri, R.N., et al., *Human recombinant alkaline phosphatase inhibits ex vivo platelet activation in humans*. Thromb Haemost, 2016. **116**(6): p. 1111-1121.
139. Peters, E., et al., *Effects of a human recombinant alkaline phosphatase during impaired mitochondrial function in human renal proximal tubule epithelial cells*. Eur J Pharmacol, 2016. **796**: p. 149-157.
140. Whyte, M.P., et al., *Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia*. JCI Insight, 2016. **1**(9): p. e85971.
141. Whyte, M.P., et al., *Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(1): p. 334-42.
142. Millan, J.L. and H. Plotkin, *Hypophosphatasia - pathophysiology and treatment*. Actual osteol, 2012. **8**(3): p. 164-182.
143. Scott, L.J., *Asfotase Alfa in Perinatal/Infantile-Onset and Juvenile-Onset Hypophosphatasia: A Guide to Its Use in the USA*. BioDrugs, 2016. **30**(1): p. 41-8.

144. Narisawa, S., N. Frohlander, and J.L. Millan, *Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 432-46.
145. Aigner, B., et al., *Generation of N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse mutants with deviations in plasma enzyme activities as novel organ-specific disease models*. Exp Physiol, 2009. **94**(4): p. 412-21.
146. Hough, T.A., et al., *Novel mouse model of autosomal semidominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene Akp2*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(9): p. 1397-407.
147. Narisawa, S., *Genetically Modified Mice for Studying TNAP Function*. Subcell Biochem, 2015. **76**: p. 45-57.
148. Giachelli, C.M., *Vascular calcification mechanisms*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 2959-64.
149. Sheen, C.R., et al., *Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(5): p. 824-36.
150. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
151. Warrington, R., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011. **7 Suppl 1**: p. S1.
152. Fusunyan, R.D., et al., *Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes*. Pediatr Res, 2001. **49**(4): p. 589-93.
153. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 231-7.
154. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
155. Seddon, B. and R. Zamoyka, *Regulation of peripheral T-cell homeostasis by receptor signalling*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(3): p. 321-4.
156. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
157. Yokosuka, T. and T. Saito, *Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 27-40.
158. Risueno, R.M., et al., *Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses*. Blood, 2005. **106**(2): p. 601-8.
159. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7990-8000.
160. Parsons, S.J. and J.T. Parsons, *Src family kinases, key regulators of signal transduction*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7906-9.
161. Deindl, S., et al., *Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70*. Cell, 2007. **129**(4): p. 735-46.
162. Brownlie, R.J. and R. Zamoyka, *T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 257-69.
163. Baxter, A.G. and P.D. Hodgkin, *Activation rules: the two-signal theories of immune activation*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 439-46.
164. Boomer, J.S. and J.M. Green, *An enigmatic tail of CD28 signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a002436.

165. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
166. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
167. Hathcock, K.S., et al., *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 631-40.
168. Inaba, K., et al., *The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1849-60.
169. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
170. Belkaid, Y. and K. Tarbell, *Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*)*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 551-89.
171. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
172. Killar, L., et al., *Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells*. J Immunol, 1987. **138**(6): p. 1674-9.
173. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
174. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
175. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
176. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
177. Fu, S., et al., *TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors*. Am J Transplant, 2004. **4**(10): p. 1614-27.
178. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
179. Cupedo, T., et al., *Development and activation of regulatory T cells in the human fetus*. Eur J Immunol, 2005. **35**(2): p. 383-90.
180. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
181. Karim, M., et al., *Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 923-8.
182. Vukmanovic-Stejic, M., et al., *Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2423-33.
183. Ziegler, S.F., et al., *The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP)*. Adv Pharmacol, 2013. **66**: p. 129-55.

184. La Cava, A., *Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity*. *Autoimmun Rev*, 2008. **8**(1): p. 83-7.
185. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. *Science*, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
186. Mullen, A.C., et al., *Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 652-8.
187. Usui, T., et al., *GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet*. *Immunity*, 2003. **18**(3): p. 415-28.
188. Frucht, D.M., et al., *Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation*. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4659-64.
189. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(11): p. 3880-5.
190. Zhu, J., et al., *Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation*. *Immunity*, 2003. **19**(5): p. 739-48.
191. Zhang, D.H., et al., *Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21597-603.
192. Zheng, W.P. and R.A. Flavell, *Pillars Article: The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells*. *Cell*. 1997. **89**: 587-596. *J Immunol*, 2016. **196**(11): p. 4426-35.
193. Ho, I.C., T.S. Tai, and S.Y. Pai, *GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(2): p. 125-35.
194. Yamane, H., J. Zhu, and W.E. Paul, *Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment*. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 793-804.
195. Amsen, D., et al., *Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 89-99.
196. Yu, Q., et al., *T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(9): p. 992-9.
197. Ouyang, W., et al., *Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism*. *Immunity*, 1998. **9**(5): p. 745-55.
198. Usui, T., et al., *T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription*. *J Exp Med*, 2006. **203**(3): p. 755-66.
199. Pai, S.Y., M.L. Truitt, and I.C. Ho, *GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(7): p. 1993-8.
200. Zhu, J., et al., *Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(11): p. 1157-65.
201. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 89-102.
202. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. *Cell*, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
203. Ciofani, M., et al., *A validated regulatory network for Th17 cell specification*. *Cell*, 2012. **151**(2): p. 289-303.

204. Gaffen, S.L., et al., *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(9): p. 585-600.
205. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
206. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
207. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
208. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
209. Chen, Z., et al., *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8137-42.
210. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
211. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
212. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6725-9.
213. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
214. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-81.
215. Amadi-Obi, A., et al., *TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 711-8.
216. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
217. Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 277-84.
218. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 766-70.
219. Burchill, M.A., et al., *Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 112-21.
220. Burchill, M.A., et al., *IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 280-90.
221. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
222. Yao, Z., et al., *Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4368-75.
223. Guo, L., et al., *IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13463-8.
224. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.

225. Robinson, D., et al., *IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB*. *Immunity*, 1997. **7**(4): p. 571-81.
226. Yang, J., et al., *IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 157-64.
227. Zhu, J. and W.E. Paul, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. *Immunol Rev*, 2010. **238**(1): p. 247-62.
228. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 445-89.
229. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
230. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. *J Clin Gastroenterol*, 1986. **8**(5): p. 594-8.
231. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. *Dis Colon Rectum*, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
232. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
233. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. *Gut*, 1970. **11**(11): p. 928-40.
234. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. *Scand J Gastroenterol*, 1992. **27**(6): p. 501-7.
235. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. *J Pathol*, 1983. **140**(3): p. 209-19.
236. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. *Acta Gastroenterol Belg*, 2000. **63**(3): p. 289.
237. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2000. **3**(3): p. 217-226.
238. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(6): p. 850-7.
239. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. *Gut*, 1988. **29**(3): p. 346-51.
240. Garland, C.F., et al., *Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States*. *Gastroenterology*, 1981. **81**(6): p. 1115-24.
241. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1967. **2**(2): p. 129-36.
242. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. *Lancet*, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
243. Kull, K., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role*. *Hepatogastroenterology*, 1998. **45**(24): p. 2132-7.
244. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. *Acta Chir Hung*, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.

245. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 206-11.
246. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. *J Pediatr*, 2003. **143**(4): p. 525-31.
247. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(2): p. 350-8.
248. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Eur J Radiol*, 2000. **35**(3): p. 154-67.
249. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. *Am J Gastroenterol*, 1980. **74**(4): p. 332-6.
250. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 900-4.
251. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. *Genes Immun*, 2013. **14**(5): p. 310-6.
252. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(3): p. e1002559.
253. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. *J Gastrointest Liver Dis*, 2009. **18**(2): p. 137-8.
254. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 1984. **29**(12): p. 1073-9.
255. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
256. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1978. **75**(3): p. 368-72.
257. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 549-53.
258. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. *Springerplus*, 2012. **1**(1): p. 47.
259. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. *BMJ*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
260. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **17**(8): p. 849-53.
261. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
262. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(5): p. 913-24.
263. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(6): p. 1398-408.

264. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori* infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine. *Digestion*, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
265. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. *Ann Intern Med*, 1963. **59**: p. 133-44.
266. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2001. **24**(5): p. 228-35.
267. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. *Gastroenterology*, 1984. **86**(3): p. 449-52.
268. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. **88**: p. 14-6.
269. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. *Gut*, 1988. **29**(7): p. 990-6.
270. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
271. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. *BMJ*, 1996. **312**(7023): p. 95-6.
272. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
273. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
274. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
275. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(6): p. 715-22.
276. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(4): p. e58.
277. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(2): p. 204-12.
278. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e819.
279. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(1): p. 99-109.
280. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
281. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.

282. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
283. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
284. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
285. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(6): p. 372-85.
286. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. J Dig Dis, 2014. **15**(12): p. 641-6.
287. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. Gut, 2014. **63**(8): p. 1275-83.
288. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013. **75**(3): p. 245-51.
289. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
290. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
291. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
292. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
293. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. N Engl J Med, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
294. Engel, G.L., *Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon*. Gastroenterology, 1969. **57**(3): p. 362-5.
295. Alexander, T., *An objective study of psychological factors in ulcerative colitis in children*. Appl Ther, 1965. **7**(10): p. 837-9.
296. Robertson, D.A., et al., *Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1989. **30**(5): p. 623-6.
297. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(6): p. 985-90.
298. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. Gut, 1989. **30**(4): p. 455-9.
299. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. Gastroenterology, 1987. **93**(1): p. 91-7.
300. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. Gut, 2008. **57**(1): p. 50-8.
301. Wilk, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 505-15.

302. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. *Endocrinology*, 2006. **147**(10): p. 4968-76.
303. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. *Stress*, 2008. **11**(3): p. 225-34.
304. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011. **301**(3): p. G555-64.
305. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. *Behav Res Ther*, 1991. **29**(2): p. 167-77.
306. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1998. **33**(12): p. 1289-96.
307. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease*. *J Psychosom Res*, 2004. **56**(6): p. 687-96.
308. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. *Epidemiology*, 1992. **3**(1): p. 47-52.
309. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1998. **10**(3): p. 243-9.
310. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(5): p. 741-5.
311. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
312. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. *J Leukoc Biol*, 1993. **54**(6): p. 599-603.
313. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. *J Nutr*, 1991. **121**(4): p. 547-55.
314. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(5): p. 265-71.
315. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. *Nutr Rev*, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
316. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
317. Bergstrand, O. and G. Hellers, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1983. **18**(7): p. 903-6.
318. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls*. *Br Med J*, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
319. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. *Swiss Med Wkly*, 2014. **144**: p. w13927.

320. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
321. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.
322. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
323. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.
324. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(6): p. 776-81.
325. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
326. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. Am J Dig Dis, 1966. **11**(11): p. 858-64.
327. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. Acta Paediatr Scand, 1989. **78**(1): p. 81-6.
328. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6317): p. 706.
329. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. Lancet, 1984. **1**(8369): p. 168.
330. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4.
331. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52.
332. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(9): p. 1130-6.
333. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(6): p. 824-30.
334. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8.
335. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(2): p. 73-8.
336. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. J Pharm Pharmacol, 1990. **42**(4): p. 288-9.
337. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. Eur J Clin Invest, 1998. **28**(8): p. 664-71.
338. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
339. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 707-15.
340. Duggan, A.E., et al., *Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. Gut, 1998. **43**(4): p. 494-8.
341. Ekbohm, A., *Appendectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* Gut, 1998. **43**(4): p. 451.
342. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 2002. **51**(6): p. 808-13.

343. Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7.
344. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
345. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 241-53.
346. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
347. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. Steroids, 2002. **67**(2): p. 119-26.
348. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 270-82.
349. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
350. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
351. Crosnier, C., D. Stamatakis, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
352. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
353. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
354. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
355. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
356. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
357. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
358. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
359. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
360. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.
361. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3503-11.

362. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
363. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
364. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG*. Scand J Immunol, 2009. **69**(3): p. 181-7.
365. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*. BMC Microbiol, 2004. **4**: p. 33.
366. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
367. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
368. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(2): p. 195-204.
369. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(2): p. 298-306.
370. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 373-81.
371. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
372. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C31-41.
373. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38168-78.
374. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5398-405.
375. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
376. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
377. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
378. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
379. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.

380. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
381. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 840-6.
382. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
383. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
384. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
385. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. *Science*, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
386. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23729-40.
387. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(2): p. 112-8.
388. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
389. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
390. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
391. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.
392. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. *J Leukoc Biol*, 1994. **55**(5): p. 662-75.
393. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 307-13.
394. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
395. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 342-7.
396. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
397. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 362-7.
398. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **286**(3): p. G367-76.
399. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(11): p. 1739-47.

400. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
401. Rhee, S.H., et al., *Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13610-5.
402. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 50-65.
403. Baumgart, D.C., et al., *Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells*. *Gut*, 2005. **54**(2): p. 228-36.
404. Papadakis, K.A., et al., *Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4985-90.
405. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
406. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
407. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
408. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
409. Martin, B., et al., *Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3391-8.
410. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
411. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G648-54.
412. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
413. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 701-9.
414. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(43): p. 36099-109.
415. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
416. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(5): p. 720-8.
417. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 1966. **45**(5): p. 391-412.

418. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
419. Kotler, D.P., *Cachexia*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 622-34.
420. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
421. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. Dig Dis Sci, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
422. Dyer, N.H. and A.M. Dawson, *Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery*. Br J Surg, 1973. **60**(2): p. 134-40.
423. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. Q J Med, 1972. **41**(164): p. 419-36.
424. Means, R.T., Jr., *Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases*. Curr Opin Hematol, 1995. **2**(3): p. 210-3.
425. Schreiber, S., et al., *Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(10): p. 619-23.
426. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. Eur J Biochem, 1992. **210**(3): p. 649-63.
427. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. Dig Dis Sci, 1989. **34**(9): p. 1457-61.
428. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. South Med J, 1981. **74**(3): p. 359-61.
429. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(4): p. 282-5.
430. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
431. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
432. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
433. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
434. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
435. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
436. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
437. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
438. MacPherson, B.R. and C.J. Pfeiffer, *Experimental production of diffuse colitis in rats*. Digestion, 1978. **17**(2): p. 135-50.

439. Rachmilewitz, D., F. Karmeli, and E. Okon, *Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(1): p. 98-106.
440. Satoh, H., et al., *New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis*. *Jpn J Pharmacol*, 1997. **73**(4): p. 299-309.
441. Barada, K.A., et al., *Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat*. *Life Sci*, 2006. **79**(21): p. 2032-42.
442. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 694-702.
443. Clapper, M.L., H.S. Cooper, and W.C. Chang, *Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions*. *Acta Pharmacol Sin*, 2007. **28**(9): p. 1450-9.
444. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
445. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. *J Exp Med*, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
446. Strober, W., et al., *Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation*. *Immunol Today*, 1997. **18**(2): p. 61-4.
447. Wirtz, S., et al., *Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens*. *J Immunol*, 1999. **162**(4): p. 1884-8.
448. Watanabe, M., et al., *Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa*. *J Exp Med*, 1998. **187**(3): p. 389-402.
449. Horak, I., *Immunodeficiency in IL-2-knockout mice*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1995. **76**(3 Pt 2): p. S172-3.
450. Kole, A. and K.J. Maloy, *Control of intestinal inflammation by interleukin-10*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. **380**: p. 19-38.
451. Mombaerts, P., et al., *Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 274-82.
452. Wilk, J.N., J. Bilsborough, and J.L. Viney, *The mdr1a-/- mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease*. *Immunol Res*, 2005. **31**(2): p. 151-9.
453. Strober, W., B.R. Ludviksson, and I.J. Fuss, *The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease*. *Ann Intern Med*, 1998. **128**(10): p. 848-56.
454. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. *Nature*, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
455. Steinbrecher, K.A., et al., *Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2588-99.
456. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
457. Elson, C.O., Y. Cong, and J. Sundberg, *The C3H/HeJ^{Bir} mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis*. *Int Rev Immunol*, 2000. **19**(1): p. 63-75.

458. Pizarro, T.T., et al., *SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(12): p. 2566-84.
459. Powrie, F., R.L. Coffman, and R. Correa-Oliveira, *Transfer of CD4+ T cells to C.B-17 SCID mice: a model to study Th1 and Th2 cell differentiation and regulation in vivo*. *Res Immunol*, 1994. **145**(5): p. 347-53.
460. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. *Int Immunol*, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
461. Morrissey, P.J., et al., *CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 237-44.
462. Mascaraque, C., et al., *Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4+ CD62L+ T cell transfer model of colitis*. *Pharmacol Res*, 2014. **90**: p. 48-57.
463. Powrie, F., S. Mauze, and R.L. Coffman, *CD4+ T-cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine*. *Res Immunol*, 1997. **148**(8-9): p. 576-81.
464. Sartor, R.B., *The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation*. *Res Immunol*, 1997. **148**(8-9): p. 567-76.
465. Powrie, F., et al., *Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells*. *Immunity*, 1994. **1**(7): p. 553-62.
466. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD*. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1333-6.
467. Gotlind, Y.Y., et al., *CD4+FoxP3+ regulatory T cells from Galphai2-/- mice are functionally active in vitro, but do not prevent colitis*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25073.
468. Blum, A.M., et al., *Heligmosomoides polygyrus bakeri induces tolerogenic dendritic cells that block colitis and prevent antigen-specific gut T cell responses*. *J Immunol*, 2012. **189**(5): p. 2512-20.
469. Xia, C.Q., et al., *Anti-CD3 antibody treatment induces hypoglycemia and super tolerance to glucose challenge in mice through enhancing glucose consumption by activated lymphocytes*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 326708.
470. Mudter, J., et al., *A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis*. *Pathobiology*, 2002. **70**(3): p. 170-6.
471. Gronbach, K., et al., *Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(3): p. 765-75.
472. Sonnenberg, G.F., et al., *Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1321-5.
473. Asghar, M.N., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in murine colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2014. **20**(8): p. 1435-47.
474. Kielland, A., et al., *In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(6): p. 760-6.
475. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
476. Van Belle, H., *Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans*. *Clin Chem*, 1976. **22**(7): p. 972-6.

477. Ghosh, N.K. and W.H. Fishman, *On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. I. Kinetic studies.* J Biol Chem, 1966. **241**(11): p. 2516-22.
478. Alegre, M., et al., *Hypothermia and hypoglycemia induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice: role of tumor necrosis factor.* Eur J Immunol, 1990. **20**(3): p. 707-10.
479. Yan, S.L., et al., *Platelet abnormalities during colonic inflammation.* Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(6): p. 1245-53.
480. Collins, C.E., et al., *Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 1994. **106**(4): p. 840-5.
481. Harries, A.D., et al., *Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease.* Br Med J (Clin Res Ed), 1983. **286**(6376): p. 1476.
482. O'Connor, W., Jr., et al., *A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation.* Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 603-9.
483. Agnholt, J., et al., *Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease.* Scand J Immunol, 2007. **65**(5): p. 453-60.
484. Gordon, J.N. and T.T. MacDonald, *Osteopontin: a new addition to the constellation of cytokines which drive T helper cell type 1 responses in Crohn's disease.* Gut, 2005. **54**(9): p. 1213-5.
485. Mishima, R., et al., *High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease.* J Clin Gastroenterol, 2007. **41**(2): p. 167-72.
486. Sato, T., et al., *Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response.* Gut, 2005. **54**(9): p. 1254-62.
487. Heilmann, K., et al., *Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation.* J Cell Mol Med, 2009. **13**(6): p. 1162-74.
488. Masuda, H., et al., *Osteopontin expression in ulcerative colitis is distinctly different from that in Crohn's disease and diverticulitis.* J Gastroenterol, 2005. **40**(4): p. 409-13.
489. Masuda, H., et al., *Distinct gene expression of osteopontin in patients with ulcerative colitis.* J Surg Res, 2003. **111**(1): p. 85-90.
490. Mottet, C., H.H. Uhlig, and F. Powrie, *Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells.* J Immunol, 2003. **170**(8): p. 3939-43.
491. Rentea, R.M., et al., *Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases systemic inflammatory cytokine expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model.* J Surg Res, 2012. **177**(2): p. 228-34.
492. Liu, W., et al., *Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels.* J Am Coll Surg, 2016. **222**(6): p. 1009-17.
493. Malo, M.S., *A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2 Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity.* EBioMedicine, 2015. **2**(12): p. 2016-23.
494. Martinez-Augustin, O., et al., *It may not be intestinal, but tissue non-specific alkaline phosphatase.* Gut, 2010. **59**(4): p. 560; author reply 560.
495. Ostanin, D.V., et al., *T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(2): p. G135-46.
496. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.* Cell Adh Migr, 1992. **68**(5): p. 869-877.
497. Beck, G.R., Jr., B. Zerler, and E. Moran, *Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8352-7.

498. Ashkar, S., et al., *Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity*. Science, 2000. **287**(5454): p. 860-4.
499. Hunter, G.K., C.L. Kyle, and H.A. Goldberg, *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation*. Biochem J, 1994. **300 (Pt 3)**: p. 723-8.
500. Inoue, M. and M.L. Shinohara, *Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity*. Immunol Res, 2011. **49**(1-3): p. 160-72.
501. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Osteopontin-induced survival of T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 19-20.
502. Morimoto, J., et al., *Osteopontin modulates the generation of memory CD8+ T cells during influenza virus infection*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 5671-83.

AGRADECIMIENTOS

Podríamos decir que en la vida hay momentos, etapas, personas, vivencias, etc. que pueden alcanzar tal magnitud e intensidad que nos traen a la mente frases como “ya no me queda nada por ver”, “ya puedo estar tranquila”, o “¡estoy curada de espanto!”, entre otras tantas.