

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**Caracterización del efecto antiinflamatorio de los
bisfosfonatos nitrogenados y su aplicación en el tratamiento
de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

TESIS DOCTORAL

Rocío López Posadas

Granada, 2010.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rocío López Posadas
D.L.: GR 3522-2010
ISBN: 978-84-693-5191-8

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Tomás de Haro Muñoz
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



Caracterización del efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados y su aplicación en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Rocío López Posadas

Bajo la dirección de los doctores:

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

Antonio Zarzuelo Zurita

Granada, 2010.

Índice.

JUSTIFICATION AND SUMMARY	1
OBJETIVOS	5
INTRODUCCIÓN	6
I. Enfermedad Inflamatoria Intestinal	6
1. Generalidades	6
2. Epidemiología	9
3. Etiología	12
3.1. Factores genéticos	12
3.2. Factores ambientales	17
3.3. Factores inmunológicos	22
4. Fisiopatología	23
5. Vías de señalización relacionadas con la EII	27
5.1. NFκB	27
5.2. MAPk	28
5.3. JAK/STAT	29
5.4. PPAR	30
6. Modelos experimentales en EII	30
7. Tratamiento en la EII	32
7.1. Aminosalicilatos	32
7.2. Glucocorticoides	34
7.3. Azatioprina y 6-mercaptopurina	35
7.4. Metotrexato	36
7.5. Ciclosporina y tacrólimo	37
7.6. Agentes biológicos o terapia biológica	38
7.7. Terapia génica	39
II. Prenilación	41
1. Generalidades	41
2. Estructura y síntesis de isoprenoides. Vía del mevalonato	42
3. Enzimas que participan en la prenilación	43
4. Proteínas G: GTP-asas de pequeño tamaño molecular	45
5. Prenilación y patologías	47
6. Fármacos que inhiben la prenilación	47
6.1. Estatinas	48
6.2. FTI-277 y GGTI-298	49
6.3. Bisfosfonatos nitrogenados	50
7. Prenilación	50
III. Bisfosfonatos	52

1. Generalidades	52
2. Estructura química y clasificación	52
3. Mecanismo de acción	54
4. Farmacocinética y características farmacológicas	57
5. Aplicaciones terapéuticas	58
6. Bisfosfonatos e inflamación (EII)	60
MÉTODOS	61
I. Reactivos	61
II. Experimentos <i>in vivo</i>	61
1. Animales de experimentación	61
2. Diseño experimental <i>in vivo</i>	61
3. Inducción de la colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico	63
4. Inducción de la colitis por sulfato de dextrano sódico	63
5. Tratamiento <i>in vivo</i> en animales sanos	63
6. Obtención de plasma sanguíneo	64
III. Estudio del tejido colónico	64
1. Cuantificación del daño colónico	64
2. Histología	65
3. Determinación de la actividad MPO y AP en colon	65
4. Análisis del transcriptoma colónico	66
IV. Experimentos <i>in vitro</i>	66
1. Diseño experimental <i>in vitro</i>	66
2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos	67
3. Cultivos primarios de células mononucleares	67
4. Purificación celular magnética	68
5. Cocultivo en TranswellTM de enterocitos-linfocitos T	68
6. Ensayo de diferenciación de linfocitos hacia Th1	69
V. Toxicidad y viabilidad celular	69
1. Determinación de la adhesión por cristal violeta	69
2. Medida de la actividad enzimática LDH	69
3. Proliferación por incorporación de timidina tritiada	70
VI. Técnicas generales	70
1. Determinación de la secreción de citoquinas	70
2. Extracción y cuantificación del contenido proteico	70
3. Western Blot	71
4. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción	71
5. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real	72
VII. Análisis estadístico	72

RESULTADOS	73
I. Efecto antiinflamatorio de bisfosfonatos nitrogenados en EII	74
1. Efecto del Pamidronato en el modelo de TNBS	74
1.1. Efecto del Pamidronato por vía oral	74
1.2. Efecto del Pamidronato por vía intraperitoneal	78
2. Efecto del Pamidronato en el modelo de DSS	80
3. Efecto del alendronato en el modelo de TNBS	82
3.1. Efecto del alendronato por vía oral	82
3.2. Efecto del alendronato por vía intraperitoneal	83
4. Efecto del ibandronato en el modelo de TNBS	84
4.1. Efecto del ibandronato por vía oral	84
4.2. Efecto del ibadronato por vía intraperitoneal	86
II. Caracterización del mecanismo de acción del Pamidronato	87
1. Estudio del transcriptoma colónico	87
2. Efecto del Pamidronato en rataas sanas	90
3. Estudios <i>in vitro</i>	94
3.1. Enterocitos	96
3.1.1. Células Caco-2	96
3.1.2. Células HT29	102
3.1.3. Células IEC18	107
3.2. Células mononucleares	114
3.3. Linfocitos T	120
3.4. Macrófagos	124
3.5. Cocultivo enterocitos-linfocito T	125
DISCUSIÓN	128
CONCLUSIONES	144
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXO	183
Abreviaturas	183
Índice de tablas	185
Índice de figuras	185
Publicaciones científicas	191

The basis for the approach of this thesis is the antiinflammatory profile of statins as inhibitors of prenylation and several studies testing statins in preclinical models of IBD [1-6]. In recent years it has been shown that the antiinflammatory behaviour of statins is largely independent on the decrease in cholesterol levels due to inhibition of HMGCoA reductase. These antiinflammatory effects have been linked to inhibition of prenylation because statins inhibit the synthesis of isoprenoid residues required for prenylation reactions [7].

The prenylation is a postranslational process that involves a modification of the structure of proteins consisting of the incorporation of a lipidic moiety to the proteins, leading to a modification of their physicochemical properties and their behavior. The prenylation is therefore a crucial process for key processes in the cell, such as interaction between proteins, growth, cell differentiation, cytoskeletal function and vesicular trafficking. The modification of prenylation is proposed as an attractive option in biological and therapeutic research, as the alteration of this process can cause significant changes in cell biology. In fact, several prenylation inhibitors are currently included in preclinical and clinical research as anticancer agents [8, 9]. Many prenylation-modified process can be considered as immune or inflammatory-related process. In addition, a major substrate for prenylation reactions are small G proteins which are involved in the activation of some relevant signaling pathways in immune system. Thus, the immune response could be controlled by changing the prenylation and, therefore, the study of the relationship between prenylation and inflammation is fully justified. The interest of this approach has been demonstrated in the statin trials, both cardiovascular and other areas.

Along with statins, bisphosphonates are drugs that inhibit the prenylation process and they are currently used in clinical practice, particularly in the treatment of various bone diseases like osteoporosis, osteopenia, Paget's disease, osteogenesis imperfecta or the detection of malignant bone disorders. Prenylation inhibition exerted by nitrogen-containing bisphosphonates is based on inhibition of farnesyldiphosphate synthase, which is responsible for the synthesis of FPP, one of the isoprenoids required to be built into the structure of proteins in the process of prenylation. This phenomenon is responsible for the antiresorptive capacity of these amino compounds, which constitute the second generation within the group of bisphosphonates. Accordingly, our main objective in this thesis has been the identification and characterization of the anti-inflammatory effect of aminobisphosphonates as inhibitors of prenylation in IBD based on previous results published with statins. Once the existence of an anti-inflammatory effect by these drugs is established [10], the development of the thesis focuses on deepening and characterization of the mechanism of this effect, as well as the profiling of conditions necessary to achieve it. Moreover, an important aspect of this thesis is to determine the relationship between inhibition of prenylation and anti-inflammatory effect of bisphosphonates,

establishing whether anti-inflammatory profile of nitrogen-containing bisphosphonates depends on the inhibition of prenylation and if it is a class effect, common to all of these drugs.

A priori, we have used two preclinical models of IBD in rats to determine whether alendronate, ibandronate and/or pamidronate have an inflammatory profile. Alendronate and pamidronate showed an antiinflammatory character in the model of colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. By contrast, ibandronate has no effect in this experimental model, and it is related to a systemic reaction to treatment with this bisphosphonate characterized by an increased plasma concentration of cytokines such as IL-6 or TNF- α leading to a progressive deterioration of the animals. Pamidronate also exerts important immunomodulatory effects in the DSS colitis model. In short, we can say that alendronate and pamidronate are anti-inflammatory in the TNBS colitis model, this effect is not dependent on inhibition of prenylation and therefore it is not a class effect. This anti-inflammatory effect requires the administration of oral bisphosphonates, as intraperitoneal administration (equivalent dose according to the oral bioavailability of these drugs) involves the loss of the effect seen in the oral route. Thus, the contact between the bisphosphonate and the intestinal tissue is crucial for the anti-inflammatory effect.

Subsequently, pamidronate was selected as a reference molecule to further characterize the mechanism of the antiinflammatory effect of nitrogen-containing bisphosphonates. Pamidronate selection was due to its better profile in the TNBS model and because alendronate is not effective in the preventive protocol, which was chosen for this thesis. The analysis of colonic transcriptome in TNBS colitis shows the ability of pamidronate to normalize the expression of a large number of genes modified by inflammation. But taking into account a comparison with the effect observed in the case of sulfasalazine (anti-inflammatory drug), we can conclude that the mechanism of pamidronate is different and it may be related to changes in the expression of many genes not related to the inflammatory process.

Pamidronate administration to healthy rats also results in immunomodulatory effects. Cell infiltration and an increase in the production of cytokines in mesenteric lymph nodes and spleen are characteristic of this experiment. The kinetic study of this effect determines that systemic phenomenon (spleen) is secondary to changes observed in the gastrointestinal area. This early response observed at 3 days in the mesentery and at 5 days in the spleen was normalized after 8 days of treatment. On the other hand, treatment with pamidronate causes induction of Foxp3 expression in splenocytes. All these effects are accompanied by an increase in the concentration of IFN- γ in plasma.

Many *in vitro* experiments were performed in order to characterize the mechanism involved in the pamidronate, alendronate and ibandronate; other related substances were included to compare them to bisphosphonates. Thus, two

others nitrogen-containing bisphosphonates have been included, risedronate and zoledronate, and a classic bisphosphonate, etidronate, which is not able to inhibit prenylation. In addition, we used three specific inhibitors of the prenylation pathway, FTI-277, a farnesyltransferase inhibitor; GGTI-298, a geranylgeranyltransferase inhibitor, and mevalonin/lovastatin, a statin that inhibits the synthesis of isoprenoids by blocking the limiting step in the mevalonate route. Using this repertoire of substances, we have characterized the effect of bisphosphonates and other inhibitors of prenylation in several cell models, whereas those cell types of particular relevancy in immune responses and intestinal inflammation, namely enterocytes, lymphocytes and macrophages.

One of the main conclusions of these *in vitro* studies is the different behavior of nitrogen-containing bisphosphonates and specific prenylation inhibitors, because in most cases the observed effect is opposite and there is only similar action in the case of specific inhibitors and most potent compounds such as zoledronate or ibandronate. This supports the independence of anti-inflammatory effects of alendronate and pamidronate for prenylation. On the other hand, the kinetic inhibition of prenylation is important, so our results show that it takes a longer period (5-7 days) for the inhibition of prenylation by bisphosphonates in many of the cellular models. After prolonged treatment, as stated above, once prenylation is inhibited, the action of more potent bisphosphonates is similar to that of specific inhibitors.

The effect of bisphosphonates on enterocytes includes the proinflammatory profile of alendronate and ibandronate in HT29 and Caco-2 cells, as evidenced by the increase in the production of IL-8 in the long-term treatment, both in basal conditions and especially after the stimulation of cells. This coincides with a dramatic increase in the phosphorylation of p38 and ERK. This phenomenon is associated with a certain toxicity, especially in the case of alendronate, and can be related to the failure of this molecule in the TNBS model when used as a preventive treatment.

Ibandronate has a clear effect on LPS-stimulated mononuclear cells and on purified macrophages. This effect consists in an increase in the production of cytokines, mainly IL-6 and TNF- α . Thus, ibandronate could lead to a stimulation and/or activation of macrophages, resulting in the production of these cytokines in large amounts. This activation may be responsible for the systemic reaction observed in experiments *in vivo* and increased concentrations of cytokines in plasma.

Pamidronate causes an increase in the production of IFN- γ in the T lymphocyte population, a phenomenon also seen in the treatment with alendronate, although the magnitude of the effect is smaller in the latter case. There are several observations in animal experiments that show the same trend in increasing the IFN- γ production: the study of gene expression in the colonic

tissue, the production of cytokines in splenocytes stimulated with Con A, in the TNBS model; or the increase in plasma concentration of this cytokine in healthy rats treated with pamidronate, as well as increased production in mononuclear cells of mesenteric lymph nodes or spleen stimulated with Con A in these healthy animals. In addition, pamidronate increases the differentiation of lymphocytes toward the Th1 subtype, so production of IFN- γ induced by treatment of lymphocytes with IL-12 is enhanced due to treatment with pamidronate. This polarizing effect is not accompanied by a change in the secretion of other cytokines characteristic of different lymphocyte subsets, although there is an inhibition in the expression of IL-23 in T cells stimulated with Con A. This ability of activation by pamidronate on T lymphocytes is enhanced when examined as a coculture with enterocytes (TranswellTM system), because prolonged contact with the bisphosphonate not only increases the production of IFN- γ production, but leads to an increase in cell proliferation (expression of proliferating cell antigen), a STAT4 pathway activation and an increase in the synthesis of other cytokines such as IL-6 or IL-10. All these effects are dependent on pamidronate contact with T cells in the coculture and the presence of the epithelial monolayer in contact with them. Although the mechanism of anti-inflammatory effect of pamidronate is not fully elucidated, the proposed model according to the results obtained in this thesis is based on a possible effect of pamidronate on activation of a subtype of T lymphocytes in the gastrointestinal area. The bisphosphonate contact with epithelial monolayer is essential for this activation.

1. Estudiar el posible efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados como inhibidores de la prenilación en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
2. Establecer el protocolo o los requerimientos para el efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados en modelos preclínicos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
3. Determinar si se trata de un efecto de clase y si el mecanismo está relacionado con la inhibición del proceso de prenilación.
4. Caracterizar el mecanismo de acción del bisfosfonato más eficaz como antiinflamatorio, utilizando para ello métodos diversos *in vivo* e *in vitro*.

I. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII).

1. Generalidades.

El término **Enfermedad Inflamatoria Intestinal** (EII) hace referencia a una inflamación crónica e idiopática del tracto gastrointestinal de carácter recurrente, en la que se alternan períodos activos de la enfermedad y períodos de remisión de la misma. El mantenimiento del proceso inflamatorio da lugar al daño tisular que se traduce en daño del parénquima, atrofia, fibrosis y pérdida de función. A esto hay que sumar el mayor riesgo para el desarrollo de procesos malignos, fundamentalmente adenocarcinomas. Los signos y síntomas dependen de la extensión, distribución y gravedad del proceso inflamatorio y muchos de ellos se relacionan con la localización anatómica de la enfermedad.

La denominación EII hace referencia a una serie de manifestaciones clínicas de la misma enfermedad, entre las que se encuentran: la **Enfermedad de Crohn** (EC) y la **Colitis Ulcerosa** (CU). Los síntomas comunes a ambas son la diarrea¹ (combinación entre la inhibición de la absorción y el aumento de la secreción), la malnutrición [11-13], la anorexia [14, 15], la pérdida de peso corporal [16-19] y el dolor abdominal [20], junto con consecuencias sistémicas como la anemia [21-25]. En el caso del paciente pediátrico una característica clínica importante, que incluso se emplea con fines diagnósticos, es el retraso en el crecimiento [26-30]. Estos signos clínicos comunes dificultan el diagnóstico diferencial ente EC y CU, aunque existen igualmente diferencias entre ellas, mayormente a nivel anatomopatológico.

El primer aspecto que permite el diagnóstico diferencial entre la EC y la CU es la localización anatómica, ya que mientras que la EC puede afectar a cualquier tramo del tubo digestivo [31, 32], la CU sólo afecta al intestino grueso, comenzando en el recto y no extendiéndose nunca más allá de la válvula íleo-cecal [33]. La gravedad de la CU aumenta distalmente en el colon, y puede acompañarse por daños indirectos a nivel del íleon (ileítis) o afectación del apéndice. En cuanto a la extensión, la colitis ulcerosa presenta un patrón difuso, en el que la inflamación comienza en el recto y se extiende proximalmente en el colon con una longitud variable. La lesión se presenta de forma continua con respecto al recto, con ausencia de zonas sanas. Por el contrario la EC se caracteriza por la presencia de zonas dañadas y zonas sanas que se alternan a lo largo de la extensión área dañada. Existe una variedad de CU en la que se presentan zonas parcheadas que se da en pacientes en tratamiento o en niños, aunque las zonas aparentemente sanas muestran huellas de un proceso inflamatorio ya superado [34, 35].

La afectación de las distintas capas de la pared intestinal es asimismo diferente entre ambas manifestaciones. En la CU sólo se va a afectar la capa

¹ La aparición de diarrea en la EC sólo se da en casos en los que esta enfermedad afecta al colon, es decir, depende de la localización de la misma a lo largo del tracto gastrointestinal.

mucosa, aunque existen casos graves y poco frecuentes en los que la submucosa puede presentar signos inflamatorios, pero dicha afectación sólo se va a producir en continuidad con el daño de la mucosa que se encuentra por encima de dicha capa. Sin embargo, en la EC todas las capas de la pared intestinal van a sufrir alteraciones (inflamación transmural) pudiendo incluso dar lugar a la participación de estructuras adyacentes mediante la formación de fístulas o fisuras [36-41]. La existencia de granulomas a nivel de la capa epitelial es una característica de la EC, y se considera un criterio importante para el diagnóstico diferencial [42, 43].

Analizando las dos manifestaciones de forma independiente desde el punto de vista patológico, en la **CU** el colon se acorta. La serosa colónica y la grasa perirrectal presentan un aspecto blando, liso y brillante, con ausencia de fibrosis o fístulas. La mucosa colónica se caracteriza por hemorragia, congestión y edema, con ausencia de marcas haustrales y presencia de pliegues mucosos. Esta capa de la pared intestinal puede presentar un aspecto granular, con forma de guijarros o incluso ulcerado. En los casos más moderados la mucosa es pálida, oscura y atrófica, mientras que en los graves pueden aparecer pólipos inflamatorios. La alteración del patrón vascular se caracteriza por dilatación y congestión de los microvasos a nivel de mucosa y submucosa, así como aumento del flujo sanguíneo a nivel del colon y vasodilatación de la vasculatura de los nódulos [44-51]. A nivel microscópico existe un infiltrado inflamatorio, fundamentalmente compuesto por linfocitos y células plasmáticas en la *lamina propria*, con posibles acúmulos de neutrófilos formando abscesos en las criptas, con actividad eosinofílica variable pero importante en algunos casos. Junto a este infiltrado, otro aspecto fundamental es la pérdida o distorsión de la arquitectura de las criptas. Las criptas forman ramas en las que dos o más criptas irregulares comparten un orificio común con un ángulo anormal, y puede darse también cualquier otra modificación o morfología aberrante de dichas estructuras. El grado más avanzado de CU es la colitis fulminante, que conlleva ciertas complicaciones que ponen en peligro la vida del paciente como hemorragia o perforación y que se manifiesta con necrosis difusa, ulceración, congestión y hemorragia, extendiéndose normalmente a las capas más profundas de la pared intestinal, incluso más allá de la mucosa. La fragilidad del tejido que se alcanza puede dar lugar a la formación de grietas en el mismo [52]. Esta colitis fulminante puede provocar lo que se conoce como megacolon tóxico, en el que el intestino se dilata, se produce una hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto extremadamente fino y delicado, lo que implica la necesidad de la colectomía [53]. Las variantes de la CU son la proctitis [54], la enfermedad del lado izquierdo [55], la colitis limitada y la pancolitis. Una de las principales consecuencias de la CU es el riesgo elevado de desarrollo de adenocarcinoma colorrectal, como se demostró por primera vez en 1925 y se ha corroborado posteriormente [56-62]. El objetivo terapéutico en este caso es la eliminación del carcinoma previa al desarrollo de metástasis. El paso previo al desarrollo del carcinoma suele ser un estadio de displasia (neoplasia inequívoca

del epitelio localizada en la membrana basal, sin invasión de la *lamina propria*) [63], por lo que se recomienda la supervisión del paciente para detectar tempranamente dicha displasia y poder practicar una colectomía previa al proceso maligno [64-69]. La displasia consiste en la transformación de las células epiteliales hacia un estado neoplásico y su evolución natural es el desarrollo de cáncer, aunque existe la posibilidad de la existencia concomitante de displasia y procesos malignos [69-75].

La **EC** se caracteriza por la fibrosis y la pérdida de la anatomía funcional de las distintas capas de la pared intestinal, siendo la afectación de la submucosa y serosa independiente del daño de la mucosa situada por encima de éstas. La arquitectura de la mucosa y submucosa aparece distorsionada. A nivel de la mucosa pueden encontrarse de forma contigua segmentos normales junto a zonas de ulceración profunda. La mucosa se caracteriza por la aparición de células mononucleares en la *lamina propria*, las criptas con ramas o brotes y la atrofia, junto con úlceras, erosiones, alteraciones del epitelio y tejido granular. Los infiltrados de neutrófilos y eosinófilos son variables. El edema y la fibrosis afectan a toda la profundidad de la pared intestinal. La atrofia de la submucosa se traduce en hipertrofia de los plexos nerviosos y dilatación de los canales linfáticos. Pueden existir agregados linfoides en cualquier capa intestinal. Es frecuente la existencia de granulomas de tipo sarcoidal y de lesiones aftoides [42, 76, 77]. La formación de los granulomas se debe al daño a nivel de las criptas, que provoca la llegada de contenido luminal y de mucinas hasta la *lamina propria*. Asimismo, son frecuentes las fisuras y los sinusoides debidas a un aumento en la presión intraluminal [37, 78, 79]. Uno de los aspectos que definen a la EC y que la distinguen de la CU es la posibilidad de extensión de la enfermedad hacia intestino delgado y tracto gastrointestinal superior (esófago o estómago) [80-83]. De forma similar a lo que ocurre en la CU, aunque con una mayor variabilidad en lo que se refiere al órgano afectado, existe un mayor riesgo de adenocarcinoma colorrectal, de otros segmentos del tracto gastrointestinal implicados en la EC, o de otros órganos [84-92]. Sin embargo, la relación entre la displasia y la EC se encuentra en un estado de estudio menos avanzado y la asociación entre la EC y la aparición de displasia es un hecho más reciente [93-95].

El término "colitis indeterminada" fue introducido en 1978 por Price y hace referencia al diagnóstico obtenido en el caso de una colitis crónica sin una etiología conocida y sin una distinción convincente entre EC y CU [96-99]. Recientemente se ha introducido la distinción entre IBDU (EII no clasificada) para aquellos casos con un diagnóstico de EII, pero en los que resulta imposible distinguir entre EC y CU, como en el caso de variantes morfológicas de CU, presentación inusual de EC o colitis activa crónica con una causa desconocida hasta el momento; y CUTE (colitis de tipo o etiología incierta), refiriéndose a la imposibilidad de diagnóstico debida a colitis fulminante sin antecedentes, ya que

se impone la necesidad de la colectomía y la gravedad del proceso impide el diagnóstico diferencial entre CU y EC [100].

2. Epidemiología.

La EII se considera una enfermedad del siglo XX, cuya incidencia ha aumentado de forma considerable a lo largo de este siglo, especialmente a partir de la Segunda Guerra Mundial en Europa y América del Norte, tanto en el caso de la EC como en el de la CU [101-103]. De forma global, la incidencia de la CU es mayor a la de la EC [104, 105]. Este incremento de incidencia en los países desarrollados ha sido corroboradora en diferentes estudios. Los datos de países subdesarrollados son menos fiables debido a defectos en el diseño y la metodología de dichos estudios pero aun así, los datos demuestran una menor incidencia en dichas zonas. En una zona geográfica concreta, el incremento de incidencia de CU precede al de la EC con una diferencia temporal de unos 15-20 años [106-110], lo cual permite establecer una relación entre la aparición de ambas manifestaciones.

En la mayoría de los casos el incremento de incidencia va seguido de una etapa de estabilización de las cifras epidemiológicas, sobre todo en el caso de la CU. Sin embargo, es posible que aún no se haya alcanzado dicha etapa en el caso de la EC o en las zonas de baja incidencia [111].

España ha sido considerada como una zona con una incidencia media [112, 113] o elevada [114], dependiendo del estudio considerado y de la zona incluida en él. Navarra y Asturias son las provincias con unos datos de incidencia más elevados.

El grupo de población preferentemente afectado en zonas con una alta incidencia es aquel con edades comprendidas entre los 20 y 40 años, tanto para CU [115, 116] como para EC [110, 117]; mientras que en zonas de escasa incidencia, ésta no presenta diferencias importantes según la edad. Posteriormente, existe un segundo pico de incidencia de menor relevancia entre la población mayor de 60 años, aunque éste puede reflejar únicamente un diagnóstico tardío en esta población. Recientemente se ha propuesto una distribución bimodal para la incidencia de la EII, en la que los dos picos de incidencia anteriormente citados presentan distinta importancia según se trate de EC o CU; así el pico de mayor importancia en el caso de la EC es el de la población joven, mientras que en la CU ocurre lo contrario [118]. Con un interés clínico cada vez mayor, la EII pediátrica se mantuvo estable en términos de incidencia desde la Segunda Guerra Mundial, aunque en los últimos años se ha observado una tendencia a la alza en un amplio abanico de localizaciones geográficas [119-125], con algunas excepciones como el caso de Polonia, en la que la incidencia ha disminuido [126]. De forma general, en la población pediátrica predomina la EC sobre la CU [127].

La distribución de la enfermedad en relación al sexo ha sido cambiante a lo largo del tiempo, aunque en la actualidad se considera de forma general que la incidencia es mayor en el caso de la EC en mujeres en las zonas con una elevada incidencia, mientras que en lo que se refiere a la CU existe una predominancia en los hombres [106, 128]. Igualmente, el grado de extensión de la enfermedad también se ha visto modificado a lo largo de los últimos años, con una evolución hacia una enfermedad menos extensiva, lo que puede explicarse igualmente por la mejora en el manejo de la enfermedad.

Los aspectos geográficos y/o de localización, como se ha demostrado en muchos estudios epidemiológicos, desempeñan un papel importante en el caso de la EII. Aunque las primeras teorías trataban de demostrar la existencia de un gradiente norte-sur [129-132], esta hipótesis perdió importancia en un estudio llevado a cabo en veinte centros europeos, entre otros [133-135]. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de un gradiente este-oeste [136-139], aunque la importancia de dicho gradiente va disminuyendo a lo largo de los años y el ritmo de crecimiento de la enfermedad en la actualidad es mayor en países orientales, debido a la influencia de factores ambientales o tal vez a las prácticas clínicas más desarrolladas en Occidente, lo que permite la estabilización de los datos de incidencia [140]. Otro aspecto característico de la EII es la uniformidad en la incidencia dentro de un mismo país, que parece estar relacionada con las fronteras y no con los límites naturales [108, 141]. Asimismo, existe un mayor riesgo en grupos de población con un mayor estatus socioeconómico [142-145], aunque esta observación no se ha corroborado en estudios posteriores [146-148]. La plausible asociación entre el nivel socioeconómico y la EII puede explicarse a partir de la "teoría de la higiene", en la que el nuevo modo de vida, el ambiente más limpio y las prácticas cotidianas relacionadas con la higiene evitan la exposición a microorganismos durante las primeras etapas de la vida, lo cual podría modificar la respuesta inmune tras el contacto tardío con dichos agentes infecciosos en la edad adulta, alterándose el equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 [149-151].

En el estudio de la influencia de la raza en el desarrollo de la EII se ha demostrado que la etnia judía presenta una mayor incidencia en varios estudios [152-155]. El diseño de estos estudios no permite establecer una relación global entre la población judía y la enfermedad, aunque sí demuestra que un cierto grupo de individuos de origen judío presenta una predisposición para la EC. Por otro lado, aunque en un principio se pensó que la EII era una enfermedad que sólo afectaba a individuos de raza blanca, posteriormente se ha demostrado que puede afectar a una población muy diversa.

A lo largo del siglo XX se ha analizado el papel de distintos factores ambientales como factores de riesgo para la EII, basándose en la hipótesis de dicha enfermedad como una interacción entre la susceptibilidad genética y determinados componentes ambientales que dan lugar a la respuesta inmunológica alterada. Los resultados en la mayoría de los casos han sido

negativos, con datos inconsistentes, incapaces de demostrar la influencia de dichos factores (ver más adelante).

El único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son concluyentes y por tanto permiten establecer una relación taxativa con la EII es el tabaco. En efecto, se ha observado una capacidad protectora del tabaco en la CU [156-159], siendo el porcentaje de fumadores dentro de los pacientes con CU sólo del 10-15% [160]. En contrapartida, fumar es un factor de riesgo para la EC, actuando como un componente importante en el desarrollo de la enfermedad o, una vez que ésta se ha establecido provocando un aumento de la gravedad de la misma [161-168]. Algunos estudios hablan de un porcentaje de entre el 45 y el 55% de fumadores dentro del grupo de pacientes afectados por la EC, mayor que en la población total [169]. El efecto del tabaco en la EII está relacionado además con el sexo, siendo el efecto perjudicial más importante en el caso de las mujeres [170], y el efecto protector en la CU más relevante en el sexo masculino.

Otros resultados concluyentes son los obtenidos en los casos de apendectomía que demuestran una disminución del riesgo de CU en los individuos sometidos a la extracción del apéndice en etapas tempranas de la vida [171-179].

Hasta la fecha no se ha demostrado una relación directa de ningún agente infeccioso con la EII, aunque se han desarrollado varios estudios dentro de esta línea de investigación. En la EC el principal candidato es *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* [180-183], aunque *Mycobacterium kansasii* [184], *Listeria monocytogenes* [185], *Pseudomonas maltophilia* [186] y *Mycoplasma* [187] también han sido objeto de estudio. En la CU los microorganismos estudiados son muchos, incluyendo diversas especies del género *Bacillus*, *Chlamydia*, *Bacteroides* [188, 189], *E.coli* adherente [190] o, más recientemente, *Fusobacterium varium* [191, 192]. El papel en la etiología de la EII de determinados virus ha sido analizado a lo largo de la historia [193-195]. En cualquier caso los resultados son negativos, ya que hasta el momento no ha sido posible establecer una relación causal entre alguno de estos microorganismos y la EII. Recientemente se ha publicado un artículo que recoge datos epidemiológicos y de laboratorio que ponen de manifiesto el posible efecto protector de la infección gástrica de *H. pylori* en la EII, con una disminución de un 13% aproximadamente en la población afectada por dicha infección en el grupo de pacientes con EII [196].

Globalmente, la emergencia de la EII en términos epidemiológicos puede ser considerada como un resultado de la disminución de la mortalidad perinatal [197] durante este siglo. La mejor higiene y nutrición junto con el avance en los cuidados pediátricos y maternos han permitido que aumente el número de niños más o menos vulnerables que sobreviven a una determinada infección o proceso autoinmune, y que en la actualidad han dado lugar al incremento en la

incidencia de la EII. Esto explica a su vez la relación de la patología con un nivel socioeconómico elevado. Asimismo, la exposición temprana de estos individuos a un determinado agente infeccioso puede ser importante [198].

El posible mecanismo implicado es la modificación de la flora gastrointestinal, ya que la colonización en los primeros estadios de la vida va a determinar dicha microflora [199, 200]. Igualmente, los cambios en cuanto a la higiene y la alimentación que se han producido en este último siglo pueden alterar la composición de la flora intestinal.

3. Etiología.

La EII es una patología idiopática, cuya etiología no se encuentra completamente esclarecida hasta la fecha. Aunque ciertas infecciones pueden dar lugar a una patología tisular semejante a la de dicha enfermedad, ya hemos mencionado que no se ha identificado una relación causal con ningún agente infeccioso o microorganismo. La hipótesis más aceptada actualmente es la existencia de una respuesta inmune no regulada a nivel de la mucosa intestinal llevada a cabo fundamentalmente por células T CD4⁺ ante antígenos de las bacterias de la flora entérica en un paciente genéticamente predispuesto, dando lugar a una inflamación intestinal crónica. Dicha reacción puede verse modificada, regulada o modulada por diversos factores ambientales (consumo de tabaco, por ejemplo). De este modo, la EII se debe a una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos.

3.1. Factores genéticos.

La EII puede ser considerada como el resultado de la interacción entre una herencia genética con un patrón no mendeliano y un componente ambiental, lo que provoca una respuesta inmune incontrolada, responsable de la enfermedad. La predisposición genética a padecer la enfermedad queda demostrada con la variabilidad de incidencia de la misma entre distintos grupos étnicos, como es el caso de la elevada incidencia y prevalencia en la población judía, incluso cuando se compara ésta con otros grupos étnicos dentro de la misma localización geográfica [201, 202].

Los datos obtenidos a partir de la epidemiología familiar demuestran asimismo una agregación familiar en la predisposición a padecer la enfermedad [203-205]. Además, se confirma la relación etiológica entre la EC y la CU, ya que la agregación familiar existe en ambos casos no sólo de forma directa, sino también de forma cruzada, es decir, una mayor probabilidad para ambas manifestaciones dentro de una misma familia predispuesta [206-208]. Comparativamente, el componente familiar es algo más relevante en la EC [149, 209, 210]. Estudios realizados en mellizos y gemelos [211, 212] han demostrado una tasa de concordancia mayor en el segundo caso, tanto para la EC como para la CU, aunque superior en aquélla [213]. Sin embargo, los factores ambientales también han de cumplir un papel importante, ya que no

existe un 100% de concordancia entre gemelos monocigóticos [214-217]. Todas estas observaciones se complementan consistentemente con los datos negativos obtenidos en estudios comparativos de la incidencia en esposos y entre familiares que han desarrollado la enfermedad y que se encuentran separados geográficamente tanto en el comienzo como en el desarrollo de la misma. En definitiva, existe un obvio componente genético en el desarrollo de la EII.

El complejo modelo etiopatogénico de la EII viene determinado por la intervención de factores ambientales y su interacción con la genética, la relación genética entre EC y CU, la mayor participación del componente genético en la primera, la existencia de *loci* y genes específicos implicados y el hecho de que diferentes genes puedan causar el mismo fenotipo desde el punto de vista clínico. Teniendo en cuenta lo anterior, la EII no responde a un modelo de herencia mendeliano, aunque es posible que este modelo pueda ser adecuado en algún tipo o subtipo concreto de la enfermedad. El modelo poligénico propuesto por McConnell no permite explicar la agregación familiar. Así, un modelo multi-*locus* u oligogénico sería adecuado para explicar las características patofisiológicas de la enfermedad, la relación entre EC y CU, así como los aspectos familiares de la EII [218-220]. La EII podría ser considerada como un grupo heterogéneo de desórdenes, siendo cada uno de los componentes de la misma un defecto oligogénico debido a la interacción de un pequeño número de genes y con la contribución de determinados genes modificados, algunos de los cuales pueden ser compartidos por ambas manifestaciones [221].

La intensa investigación genética, aunque con escasa utilidad clínica permite la detección de variantes genéticas que desempeñan un papel en el desarrollo de una determinada patología. Los estudios de asociación genética han propuesto más de 30 *loci* relacionados con la EII hasta el día de hoy [222], confirmándose así la hipótesis de una enfermedad poligenética compleja:

- IBD1: localizado en el cromosoma 16, fue el primero en descubrirse y el que cuenta con un mayor apoyo científico [223]. Incluye el gen *NOD2/CARD15*, localizado en 16q21 [224, 225], cuya modificación está relacionada con la EC [226-228]. Esta relación no ocurre en todos los grupos poblacionales, ya que por ejemplo no sucede en Asia [229-231]. Se han caracterizado tres mutaciones diferentes en este gen (Arg702Trp, Gly908Arg and Leu1007insC). De igual forma, estas mutaciones se relacionan con una localización ileal y no colónica, excluyendo asimismo a la CU [232, 233]. La proteína codificada por el gen en cuestión (NOD2) pertenece a una superfamilia de reguladores de la apoptosis expresada en monocitos, y por tanto, sus variantes dan lugar a una muerte celular programada alterada en este tipo celular; por otro lado, las variaciones de *NOD2* alteran la interacción de la proteína NOD2 con el muramildipéptido (MDP) o el LPS, modificándose la activación del factor de transcripción nuclear NFκβ, que se traduce en una activación deficiente de dicho factor de transcripción y a un fallo

en la respuesta desencadenada por las bacterias que se encuentran en el lumen [234, 235]. Por otro lado, la activación de NFκB a través de TLR (Toll like receptors, receptores tipo Toll) puede aumentar debido a la mutación del gen NOD2, ya que la proteína en cuestión actúa modulando este proceso, es decir, frenando la activación de este factor de transcripción. Los TLR son receptores que participan en la respuesta inmune innata, ya que reconocen patrones moleculares conservados de la estructura de microorganismos, dando lugar a la activación de diversas vías de señalización.

- IBD2: localizado en la región 12q14. Aunque en un principio se postuló la existencia de dos *loci* diferentes, uno para EC y otro para CU, la asociación con la última es más importante [236-238]. Aunque varios genes han sido investigados dentro de esta región como candidatos, en la mayoría de los casos sólo se han obtenido resultados poco concluyentes, como en el caso del IFN-γ [239, 240], el NRAMP2 [241], la metaloproteinasa 18, el receptor de la vitamina D (VDR) [242, 243], la integrina β7, la queratina 8 [244] o la advillina [245]; o resultados controvertidos, como en el caso de STAT-6 [246-249].
- IBD3: localizado en 6p21.3. Incluye diferentes genes candidatos dentro del complejo principal de histocompatibilidad, algunos de los cuales, concretamente diferentes alelos dentro del MHC de clase II podrían estar relacionados con la CU, como HLA-DR2, HLA-DRB1*1502, HLA-DR9 y HLA-DRB1*0103 [250, 251] y con una localización exclusivamente colónica de la EC [252]. El gen que codifica para la citoquina TNF-α se encuentra asimismo dentro de esta región, y la mutación -308 G/A SNP se ha relacionado con un riesgo elevado de CU [253-256], aunque otras mutaciones en el mismo (-857 C/T SNP por ejemplo) parecen disminuir el riesgo de padecer EII [257, 258].
- IBD4: localizado en el cromosoma 14, en la región 14q11-q12 está relacionado con la susceptibilidad para padecer EC [259-261]. Entre los genes candidatos se encuentran los que codifican el receptor de células T α/δ (TCR), la IL-25, citoquina relacionada con la respuesta Th2 y con capacidad limitante de procesos inflamatorios patológicos a nivel del tracto gastrointestinal [262], aunque la relación de este gen con la enfermedad es controvertida [263].
- IBD5: situado en la región 5q31-33, es junto con el IBD1 uno de los *loci* más estudiados en EII, relacionado concretamente con la EC, con un comienzo temprano de la misma o con una elevada frecuencia de enfermedad perianal [264-270]. También se ha relacionado recientemente con la CU, aunque esta asociación es mucho menos convincente hasta el momento [271]. El gen que codifica el transportador de cationes orgánicos (OCTN) se ha asociado con la EC,

fundamentalmente con una localización colónica y no exclusivamente ileal, aunque también con la CU, de forma menos importante [272-277]. Su relación con la EII podría explicarse por la alteración en la erradicación de los patógenos luminales que se produce de forma asociada a la mutación de dicho gen. El gen DLG5 (10q22-23), relacionado con la integridad de las células intestinales, presenta una vinculación con la EII [278], ya que la mutación del mismo provoca una alteración de la permeabilidad intestinal. La proteína codificada por el gen MDR1 actúa como una bomba dependiente de ATP para la eliminación de toxinas y xenobióticos intracelulares [279], y el polimorfismo de dicho gen se relaciona con la EII [280-282]. Incluido también en este locus, el polimorfismo del gen que codifica la IL-6 se ha relacionado exclusivamente con la EC [240, 283, 284]. Además, esta región comprende otros genes susceptibles como los correspondientes a las interleukinas 3, 4, 5 y 13 [285], el factor 1 regulador de IFN γ (IRF-1) [265], el factor 2 estimulante de colonias y una región relacionada con la susceptibilidad a la colitis inducida por DSS en ratón [286].

- IBD6: localizado en la región 19p, este *locus* confiere susceptibilidad a padecer ambas manifestaciones, EC y CU [264, 266, 268, 287, 288]. Contiene genes como el del receptor del tromboxano A₂, la hidrolasa de leucotrieno B₄, TYK2 y JAK3, si bien sólo existen datos positivos en el caso de la EC fistulizante y el gen de ICAM-1 [289] o el de la subunidad C3 del complemento [290].
- IBD 7: este *locus*, situado en el brazo pequeño del cromosoma 1 contiene el gen que codifica el TGF- β 2, que es una citoquina antiinflamatoria implicada en el crecimiento y la diferenciación de células epiteliales intestinales [291, 292]. Su asociación con la EC pero no con la CU debe ser estudiada con mayor profundidad [293].
- IBD8: localizado en el mismo cromosoma que NOD2 (16p), este *locus* se solapa a IBD1, pero es independiente del mismo [294].
- IBD9: el gen que codifica el receptor de RANTES, es decir, CCR-5, se encuentra en el cromosoma 3 (3p) y confiere susceptibilidad para la EII, y de forma más concreta para las lesiones anales en la EC [295, 296]. Otros genes integrados en este locus son el de CCR-9 o el de la IL-12.
- Otros genes: IL23R e IL12B [252, 297-300], ATG16L1 (proteína relacionada con la autofagia 16, similar a 1) [252, 299, 301-309]; IRGM (immunity-related guanosine triphosphate) [304, 310-313]; PTPN2 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2) [304, 310]; TLR [314-317]; NOD1/CARD4 [318]; IL-11 [319]; IL-18 [320].

Principales regiones y genes en la EII			
Región	Locus	Gen	Función
IBD1 (16)	16q21	NOD2/CARD15	Regulación apoptosis monocitos ; reconocimiento bacterias (MDP); activación NFκB.
	16p12.1-p11.2	IL-4R	Subunidad alfa del receptor de IL-4; respuesta Th2.
	16p11.2	ITGAM (CD11b)	Integrina alfa-M.
IBD2 (12)	12q13.11	VDR	Receptor de la vitamina D.
	12q13	STAT-6	Respuestas biológicas mediadas por IL-4; respuesta Th2.
	12q14	IFNG (IFN-γ)	Citoquina con propiedades antivirales, inmunorreguladoras y antitumorales; activador de macrófagos.
	12q13.13	ITGB7 (Integrina β ₇)	Recirculación de linfocitos hacia el sistema digestivo.
IBD3 (6)	6p21.3	MHC-II (HLA)	Reconocimiento de epítomos.
IBD4 (14)	14q11.2	IL25 (IL-25)	Citoquina que activa NFκB; producción de IL-8.
IBD5 (5)	5q31.1	OCTN	Transporte de cationes orgánicos.
	5q31.1	CD14	Antígeno superficie de monocitos-macrófagos; inmunidad innata frente al LPS.
IBD6 (19)	19p13.3	TXA2R	Receptor tromboxano A2 ; agregación plaquetaria.
	19p13.3-p13.2	ICAM-1	Unión a integrinas.
IBD7 (1)	1q41	TGFB2	Inhibición del crecimiento de linfocitos T colaboradores y citotóxicos inducido por el antígeno.
IBD8 (16)	16	Desconocido (independiente de IBD1)	
IBD9 (3)	3p21.31	CCR-5	Receptor de quimioquina expresado en linfocitos T y macrófagos; entrada virus en macrófagos.
	3p21.3	CCR-9	Receptor de quimioquina ; reclutamiento de timocitos hacia el tracto gastrointestinal.
	3q25.33-q26	IL12A	Subunidad de la IL-12 de 53 kDa ; inducción de IFN-γ; diferenciación de Th1 y Th2.
Otros	9q32-q33	TLR4	Respuesta inmune innata ; reconocimiento de patógenos
	4p14	TLR1	
	4q32	TLR2	
	4p14	TLR6	
	3p21.3	TLR9	
	7p15-p14	NOD1/CARD4	Reconocimiento de bacterias (ácido diaminopimélico)
	2q33-q37	CCL20	Quimioquina con acción sobre linfocitos T y B y células dendríticas.
	19q13.3-q13.4	IL-11	Producción de inmunoglobulinas por linfocitos B; proliferación de células madre hematopoyéticas y células progenitoras megacariocíticas.
	11q22.2-q22.3	IL18 (IL-18)	Inducción de la producción de IFN-γ.
	2q37.1	ATG16L1	Autofagia.
	5q33.1	IRGM	Autofagia ; control de micobacterias intracelulares.
18p11.3-p11.2	PTPN2	Señalización celular.	

Tabla 1: principales genes relacionados con la EII.

A priori, cabría esperar que los genes candidatos para la susceptibilidad a EII estuviesen implicados en la regulación del equilibrio entre células inmunológicas, la respuesta a la flora intestinal y la producción y liberación de citoquinas durante la reacción inmunológica y la curación de la mucosa intestinal. Efectivamente, los datos más recientes obtenidos mediante estudios de asociación genómica, indican que los fenómenos o procesos patofisiológicos con potencial importancia en el desarrollo de la enfermedad son la inmunidad innata, la autofagia, la apoptosis, las respuesta Th17 (IL-23) y Th1 (IL-12), la activación de células T y la inmunosupresión [321].

Existe una relación genética entre EC y CU, ya que algunos genes predisponentes son comunes a las dos; si bien otros genes pueden ser los responsables de la aparición o derivación hacia una entidad concreta dentro de la EII. Además de dicha relación entre ambas enfermedades, existe una relación genética de la EII con otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis [322-325], la espondilitis anquilosante [326] o la diabetes tipo I [303], lo cual queda demostrado con la susceptibilidad a padecer dichas enfermedades relacionada con las variaciones o mutaciones con genes asociados asimismo a la EII.

3.2. Factores ambientales.

La interacción de los factores ambientales con la genética en un determinado individuo predispuesto puede ser el determinante último de la evolución y el resultado final de dicha enfermedad en ese individuo concreto. Entre estos factores ambientales se encuentran los siguientes:

- **Estrés:** El tracto gastrointestinal, así como el sistema inmune, pueden verse afectados por esta respuesta, en la que desempeña un papel fundamental el sistema nervioso. El sistema nervioso entérico se encarga de la coordinación de diversas funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal, en particular de la motilidad, el transporte hidroelectrolítico, las funciones endocrinas y exocrinas y la microcirculación [327]. Desde la mitad del siglo XX se ha considerado la EII como un trastorno con un destacable componente psicosomático [328-332], aunque en 1990 se demostró que los estudios llevados a cabo hasta entonces no eran fidedignos, ya que el protocolo experimental en muchos de los estudios en cuestión no era adecuado y podía dar lugar a una interpretación errónea de los resultados [333], lo que hizo que se descartara al estrés como la causa principal de la EII, a lo que contribuyó el avance en el conocimiento de la etiología de la enfermedad, y la implicación de múltiples factores en la misma. Sin embargo, posteriores estudios tanto en animales [334-338] como en humanos [339-342] han demostrado un papel importante del estrés no tanto en la etiología como en la evolución y en la aparición de recaídas en la EII. Los estudios realizados demuestran que el estrés provoca un aumento de la permeabilidad intestinal [343-345] y de la

motilidad [346, 347], así como una mayor secreción de agua y de iones [348-350] y una alteración de la interacción entre las bacterias y la mucosa [351], mecanismos que forman parte de las alteraciones en la EII y que pueden contribuir al empeoramiento de la misma. Asimismo se ha demostrado que el efecto del estrés sobre la EII es dependiente de la inervación colinérgica y de los mastocitos [352, 353]. El factor liberador de corticotropina (CRF) juega un papel crucial en dicho efecto, como se ha demostrado en diversos experimentos realizados en animales [354-360]. En humanos los datos disponibles son mucho más limitados, aunque se ha observado un aumento en la expresión de CRF en células mononucleares de *lamina propria* procedente de pacientes con CU [361, 362]. Según lo expuesto, el efecto del estrés en la EII puede explicarse por la activación de neuronas entéricas que liberan neurotransmisores como CRF o sustancia P (SP), las cuales actúan sobre mastocitos produciendo una serie de mediadores que provocan la alteración de la permeabilidad y de la interacción de las bacterias con la función de la barrera epitelial, lo que desencadena la activación de células inmunes. Algunos estudios han sido tratado de demostrar el efecto terapéutico en la reducción del estrés en la EII, aunque los resultados son contradictorios [363-365].

- **Dieta:** el epitelio intestinal constituye el primer punto de contacto del individuo con los alimentos ingeridos (fuente de antígenos extraños), y por tanto la respuesta ante éstos puede considerarse como una reacción inmune controlada. La duración de esta reacción así como la autolimitación de la misma (tolerancia oral) determinan su intensidad, pudiendo actuar dichos antígenos como factores potencialmente causantes de trastornos a nivel del sistema digestivo. En los últimos 40 años se han llevado a cabo múltiples estudios con el fin de valorar la posible relación de diferentes componentes de la dieta con la EII, como la leche y los productos lácteos [366-368], la margarina [369], los cereales [370], la comida rápida [371] o las bebidas de cola [372]. A pesar del esfuerzo realizado, no se ha podido demostrar que ninguno de los alimentos que han sido estudiados sea realmente un componente etiológico de la enfermedad [371-379]. La mayoría de los estudios llevados a cabo relacionan componentes de la dieta occidental con la EII, fundamentalmente las grasas ω -6 y el uso de carbohidratos refinados, como la sacarosa. La alteración del componente lipídico de la dieta y del equilibrio en ácidos grasos de la misma podrían ser los responsables del incremento en la actividad de la enfermedad [379, 380]. Esta hipótesis se ve apoyada por el efecto beneficioso de los ácidos grasos ω -3 en algunos estudios, presentando un efecto antiinflamatorio [381-388]. Preparaciones a base de aceite de pescado conteniendo EPA y DHA han sido beneficiosas en la EC [389-391] y CU [392-396]. Los ácidos grasos de cadena corta y la capacidad de

metabolización preferente por parte de los colonocitos podrían representar un mecanismo importante y beneficioso en la enfermedad, especialmente en la CU [397, 398]. Asimismo, la comida rápida, con un alto contenido en grasa, se ha asociado tanto con la CU como con la EC [371, 372].

La lactancia materna disminuye el riesgo en el desarrollo tanto de CU [399-401] como de EC en el niño [402, 403], siendo el riesgo inversamente proporcional a la duración del periodo de lactancia. Diversos mecanismos pueden explicar esta capacidad protectora de la leche materna, como la protección frente a infecciones gastrointestinales [404-406], la capacidad de potenciar el desarrollo de la mucosa intestinal y de la capacidad inmunológica [407-410], o el retraso del contacto con la leche de vaca, fuente de potenciales infecciones, incluso de *Mycobacterium avium paratuberculosis* [411], y con un efecto perjudicial en la EII [367, 412, 413].

Los pacientes de EII presentan una dieta rica en azúcares refinados con frecuencia [414, 415]. Este tipo de alimentos han sido propuestos como factor de riesgo en EC [377, 416, 417] y en CU [418, 419]. El efecto beneficioso de una dieta con niveles reducidos de azúcares refinados no ha sido confirmado en otros estudios [420]. Un problema fundamental de estos estudios es la asociación entre tabaquismo y consumo de azúcares refinados, de forma que el efecto puede achacarse posiblemente a aquél.

Por otro lado, no se han encontrado evidencias de asociación entre alergias alimentarias y el desarrollo de EII [421, 422], mientras que la valoración del papel de una intolerancia alimentaria en la patogénesis de la enfermedad conlleva dificultades importantes [423, 424].

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

- **Tabaco:** como ya se ha expuesto, el tabaco es, junto con la apendectomía, el factor ambiental más importante en la etiología de la EII. El comportamiento es diferente en las dos variantes con un efecto protector del tabaco en la CU [156-159] y un empeoramiento en la EC [161-168]. Existe una relación con el sexo, así la importancia del efecto protector es mayor para hombres, y las mujeres son más susceptibles al efecto perjudicial. La acción del tabaco sobre la EII se pone de manifiesto igualmente en la modificación del curso y de las características de la enfermedad ya establecida, ya sea una mejoría en

el caso de la CU o una mayor gravedad en el caso de la EC, lo que se materializa en la necesidad de cirugía o de tratamiento inmunosupresor, la aparición de complicaciones (fístulas o estenosis en el caso de la EC, o pouchitis o esclerosis colagenosa en el caso de la UC), recaídas o recurrencias, períodos de hospitalización, etc [164, 425-434]. La acción de la nicotina sobre el sistema inmunológico ha sido demostrada en diversos estudios que exponen un extenso repertorio de efectos por parte de dicha sustancia [435-439], aunque el efecto del tabaco puede deberse, al menos en parte, a otras sustancias presentes en él. El efecto protector en la CU puede deberse a la capacidad del humo del tabaco para disminuir la secreción de IL-8 e IL-1 β [440], junto con la hipoperfusión a nivel rectal [441]. La explicación mecanística en el caso de la EC puede ser la potenciación de la isquemia multifocal gastrointestinal por parte del tabaco y en concreto el CO contenido en él, que impide la vasodilatación de los microvasos implicados en la zona inflamada, lo que da lugar a la aparición de ulceraciones y fibrosis [441, 442].

La terapia farmacológica basada en la nicotina ha demostrado ciertos efectos beneficiosos en la CU [443-445]. El mecanismo para su uso terapéutico en la CU es desconocido, aunque un efecto a nivel de la motilidad intestinal junto con acciones antiinflamatorias podría explicar esta opción. Su administración se realiza mediante parches transdérmicos, aunque existen otras posibilidades con menores niveles sanguíneos y por tanto, menos efectos adversos, como las formulaciones orales o rectales o las de liberación retardada.

- **Apendectomía:** la extirpación del apéndice, especialmente en edades tempranas, conlleva un efecto inmunomodulador que determina la protección frente al desarrollo de CU [175, 176, 179, 446-448]. La apendectomía realizada antes del desarrollo de la CU supone una reducción en la incidencia de la enfermedad, una mayor edad de debut, una enfermedad menos activa, una reducción de la necesidad de corticosteroides o azatioprina, así como una menor tasa de recaídas y riesgo de colectomía [177, 178, 449]. De hecho, el número de individuos sometidos a este tipo de intervención dentro del grupo de pacientes con CU es reducido [111].
- **Anticonceptivos orales:** el uso prolongado de anticonceptivos orales es un factor controvertido en cuanto a su contribución al desarrollo de la EII [135, 450], de forma especialmente importante en la EC [451-453], pero también en la CU [454]. La evolución de la enfermedad parece no ser modificada por la anticoncepción oral [455]. El mecanismo implicado puede ser la formación de microtrombos y de infartos locales a nivel de la microvasculatura intestinal [442].

- **Flora bacteriana entérica:** la pérdida de tolerancia frente a la flora comensal entérica es una de las hipótesis etiopatogénicas de la EII [456-458], es decir, las bacterias no patogénicas que colonizan el intestino participan en la patogénesis de la EII [459, 460]. Junto al papel de la flora comensal, un desequilibrio entre ésta y las bacterias potencialmente patógenas en el intestino podría tener un papel importante en el desarrollo de la EII, así existe una mayor cantidad de bacterias adherentes en pacientes con EC que en individuos control [461, 462]. Las bacterias de la flora entérica promueven la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas por parte de las células epiteliales intestinales [463-466]. La activación de las células epiteliales mediante la estimulación de TLR constituye un mecanismo inmunológico de tipo innato que puede participar en dicha interacción, ya que los TLR expresados en la superficie de las células epiteliales reconocen patrones moleculares de la estructura de los microorganismos, por lo que las bacterias comensales son una importante fuente de ligandos para TLR. Las alteraciones en el perfil de estos receptores puede dar lugar a una respuesta equívoca frente a la flora intestinal en el caso de los pacientes de EII [317, 467-473].

Por otro lado, las defensinas son péptidos con carácter antimicrobiano producidos por las células intestinales (células de Paneth) y cuyo papel en la patogénesis de la EII, especialmente en la EC, se está analizando en la actualidad [474-480]. Diferentes estudios muestran una menor producción de defensinas en el epitelio intestinal de pacientes con EC, pero no en CU [481, 482]. Las defensinas a nivel intestinal participan en el mantenimiento del equilibrio entre la protección frente a los patógenos y la tolerancia a flora entérica normal [483]. Una alteración en el patrón de expresión o comportamiento de las mismas puede estar implicada en la etiología de la EII, lo que demuestra el papel de la alteración de flora intestinal en la EII.

La manipulación de la flora entérica se ha propuesto como una de las estrategias terapéuticas plausibles en el manejo de la inflamación intestinal crónica. Se han realizado diversos estudios con animales, así como algunos ensayos clínicos, para verificar el efecto de antibióticos, prebióticos y probióticos en la EII. El uso de antibióticos se ve limitado por el riesgo de crecimiento excesivo de ciertas especies patógenas, la eliminación de parte de la flora comensal, la falta de especificidad y el desarrollo de resistencia a largo plazo. Varias son las moléculas con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras que han sido ensayadas o estudiadas, como el ciprofloxacino [484-489], fármacos antituberculosos [182, 490-499], agentes antituberculosos específicos frente a *Mycobacterium paratuberculosis* [500]; el trimetoprim [501,

502] o la rifaximina [503-506], entre otros, aunque los únicos datos concluyentes son aquellos que avalan el uso del metronidazol en la EC perianal [507-510].

El término "probiótico" define a los microorganismos vivos (bacterias o levaduras) que se ingieren en la dieta con la capacidad de alterar la microflora entérica, dando lugar a un efecto beneficioso para la salud [511, 512]. Se han observado interesantes efectos beneficiosos de los probióticos en modelos animales de colitis [513-522]. Los datos en animales han planteado la necesidad de estudios del uso de probióticos en humanos mediante los ensayos clínicos oportunos. En la CU destaca la capacidad de mantenimiento de la remisión por parte de *Escherichia coli* cepa Nissle 1917 [523-527], *Lactobacillus acidophilus* o *Bifidobacterium bifidum* [528] (Ishikawa H. *Gastroenterology* 2000; 118: A4171). Una mezcla de probióticos, el VSL#3, que contiene *Lactobacillus*, bifidobacterias y una especie de *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, previene y mejora la pouchitis y potencia el mantenimiento de los períodos de remisión en la CU [529-531] (Gionchetti P. *Gastroenterology* 1999; 116: A723). En la EC diversos estudios sugieren que *Saccharomyces boulardii*, una levadura probiótica, presenta cierta eficacia [532-534] o, en menor medida, *E.coli* Nissle 1917 [535, 536] o *Lactobacillus casei* [537].

Otro hecho que demuestra la dependencia de la flora intestinal en el desarrollo de la CU o la EC es la existencia de modelos experimentales de colitis espontánea en animales en los que la enfermedad sólo se desencadena en condiciones ambientales normales, es decir, en presencia de microorganismos que puedan colonizar el intestino y constituir la flora entérica, lo que demuestra el papel de la flora intestinal en el desarrollo de la EII. Éste es el caso de los ratones knockouts de IL-2 y TCR α [538, 539].

3.3. Factores inmunológicos.

Como se ha indicado anteriormente, una respuesta inmune exacerbada frente a componentes lumbinales es la causante de la EII en los individuos genéticamente predispuestos, aunque muchos aspectos de esta respuesta no se conocen de forma certera y/o global hasta la fecha. Los modelos experimentales en animales han permitido la estandarización de los factores genéticos y ambientales para permitir así profundizar en los mecanismos inmunológicos de la patología. Los principales actores en esta reacción inmune incontrolada son los linfocitos T CD4⁺ [540-542]. Considerando los distintos subtipos de linfocitos CD4⁺, la EII no puede explicarse como un mero desequilibrio entre la respuesta Th1 y Th2, sino que una respuesta efectora exacerbada, ya sea de tipo Th1, Th2 o Th17 puede ser perjudicial y dar lugar a la EII, siendo el resultante daño tisular una consecuencia indirecta de las citoquinas de dicha respuesta inmune,

como por ejemplo el TNF- α [543] y no una acción directa de citotoxicidad. Tradicionalmente, según el paradigma Th1/Th2, la EC parece ser una respuesta exacerbada de tipo Th1, con un incremento de células T productoras de IFN- γ [544-547], aumento en los niveles de proteína y de ARN mensajero para IL-12 [548-550] y mayores niveles del factor de transcripción STAT-4 [551]. Por el contrario, la CU ha sido calificada como de tipo Th2 (aunque atípica), ya que se produce un aumento en la producción de IL-5 y una reducción de IL-13 en mucosa, aunque no se observe un incremento en el caso de la IL-4 [552-555]. Sin embargo, la idea excluyente entre Th1 y Th2 es demasiado simplista, y es posible que las dos respuestas coexistan, hasta cierto punto; de hecho, linfocitos T aislados de *lamina propria* de tejido colónico afectado por la CU producen mayores cantidades de IFN- γ que aquellas que proceden de individuos sanos [552], lo que prueba la participación de la respuesta Th1 en la CU y por tanto la posibilidad de una respuesta mixta. Recientemente, la contribución de la respuesta Th17 como efector en la EII ha sido puesta de manifiesto, especialmente en el caso de la EC [556-559]. Junto con el aumento de los procesos efectores, una disminución de la función de las células T reguladoras y de las citoquinas antiinflamatorias que éstas y otros tipos celulares producen pueden llevar a la descompensación inmunológica y a la consiguiente inflamación crónica. Estudios en animales demuestran la importancia de las células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) en la EII, los cuales han sido recopilados recientemente en una revisión [560]. En cambio, además de las células T CD4⁺, existen otros tipos celulares que pueden intervenir en el desarrollo y mantenimiento de la EII, como células T CD8⁺ [561-564], células Natural Killer o NK [565], células T NK [566], células dendríticas [567-571] y células productoras de anticuerpos o linfocitos B [572, 573], entre otras.

4. Fisiopatología.

En la EII, tanto en la EC como en la CU, existe una activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, lo que conlleva una pérdida de tolerancia frente a las bacterias comensales entéricas [574, 575]. Las citoquinas y las quimioquinas juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta respuesta [576], ya que en estos individuos se produce un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias o activadoras y las antiinflamatorias o reguladoras [577-580], lo que implica la descompensación entre los mecanismos activadores que aseguran la protección frente a microorganismos patógenos, y los mecanismos inhibidores que evitan la exacerbación de dichos procesos y permiten la tolerancia oral a los alimentos y a los microorganismos de la flora entérica. De hecho, la inhibición de citoquinas proinflamatorias o el aumento de las antiinflamatorias dan lugar a la reducción de la inflamación en varios modelos animales de inflamación intestinal [581-583]. Los antígenos lumenales van a ser captados por las células presentadoras de antígenos (APC), es decir, macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, donde van a ser procesados y presentados a través de las moléculas de MHC-II a los linfocitos T vírgenes para

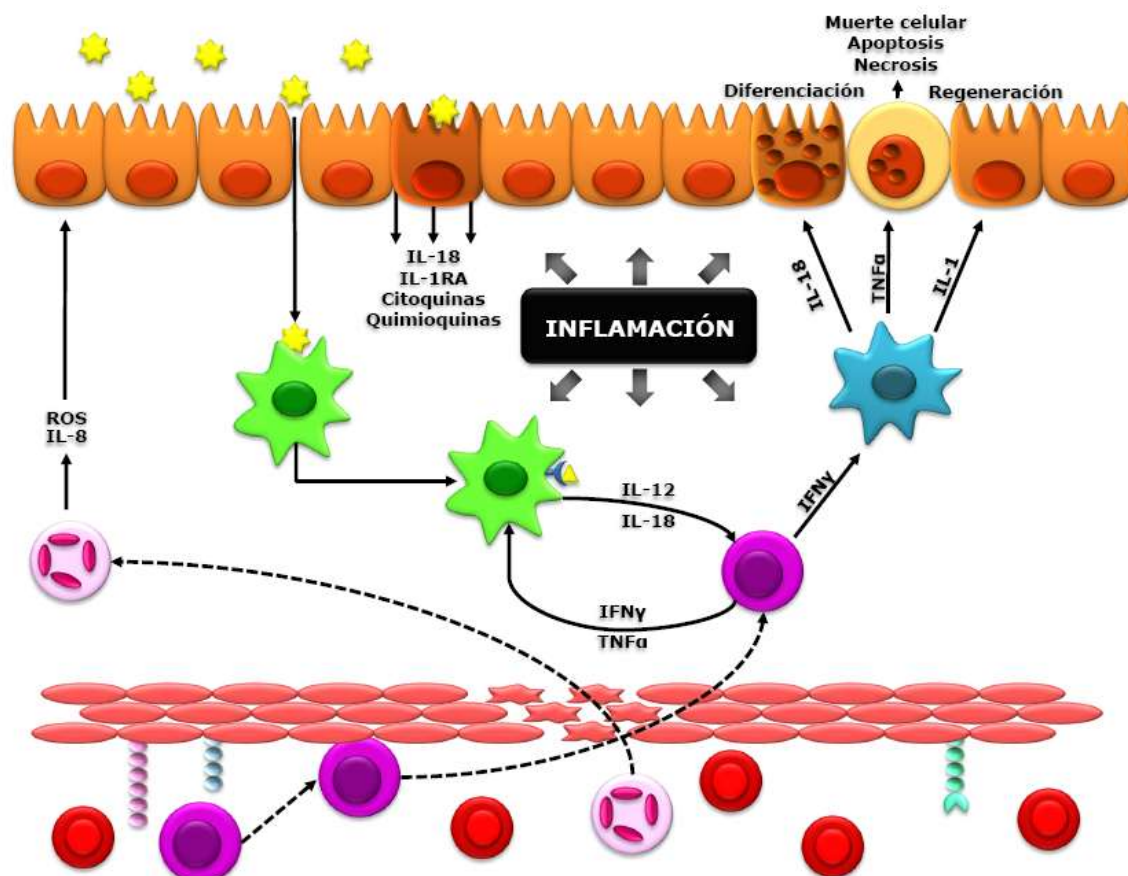


Figura 1: Fisiopatología de la EII, inflamación en la mucosa intestinal.

que éstos sean activados. La acción de estos antígenos sobre las APC provoca la liberación de diversas citoquinas por parte de estas células. Entre estas citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18, IL-23, IL-27), algunas van a promover la polarización de los linfocitos T vírgenes o de tipo Th0 hacia el subtipo Th1 (IL-12, IL-18, IL-23 y TNF- α), de modo que cuando estos linfocitos sean activados van a presentar un fenotipo Th1 y producirán elevadas cantidades de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , LT) que participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; o bien hacia el subtipo Th17 que produce IL-17, IL-22 o IL-21 entre otras, y cuya diferenciación depende de la existencia de IL-6 y cantidades reducidas de TGF- β , [584-587]. La inducción de la respuesta Th2 está orquestada por la IL-4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1, es la principal citoquina implicada en la respuesta Th2, junto con la IL-5 o la IL-13. La diferenciación de los linfocitos Th0 hacia células Treg, en la que participa de nuevo el TGF- β hace que, una vez activadas, estas células liberen citoquinas con carácter antiinflamatorio (IL-10, TGF- β), que tratan de frenar o contrarrestar la reacción inflamatoria, pero que en el contexto de la EII no van a ser suficientes y se van a ver superadas o contrarrestadas por el carácter proinflamatorio de la respuesta. Con la misma función protectora o antiinflamatoria podemos encontrar los linfocitos T pertenecientes al subtipo Th3, que producen elevadas cantidades de TGF β . Otras de las citoquinas producidas por las APC van a presentar por sí mismas un

carácter proinflamatorio con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lamina propria*, células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la reacción inflamatoria. La activación de macrófagos y células epiteliales conlleva la producción por su parte de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio. También son producidas citoquinas antiinflamatorias como consecuencia de la activación de macrófagos y células epiteliales, como la IL-1RA o la IL-11, que son igualmente incapaces de frenar la masiva inflamación en los pacientes de EII. Así, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa dando lugar a la inflamación crónica.

En la mucosa se produce una alteración de la microcirculación, debido a la acción de los mediadores inflamatorios que provocan vasodilatación e hiperemia, lo que favorece la dilatación arteriolar y la consiguiente salida del líquido hacia el intersticio, provocando un edema [588]. Los mismos mediadores inflamatorios van a dañar la función de barrera del endotelio. La contracción de las células endoteliales y el aumento de la permeabilidad vascular empeoran dicha situación, ya que permiten la extravasación de proteínas. A continuación se produce la adhesión de leucocitos a la pared endotelial y la subsecuente migración de dichas células hacia la mucosa intestinal, en la que participan las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de neutrófilos y células endoteliales, como las selectinas o las moléculas de adhesión endotelial [589]. Los leucocitos en el intersticio interaccionan con diversas sustancias dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno [590-592], que van a provocar el daño del epitelio y del intersticio de la mucosa. El paso final en este proceso de migración celular es la formación de abscesos en las criptas.

La preservación de la integridad funcional de la mucosa intestinal depende de la capacidad de la misma para defenderse de agentes luminales nocivos y de la reparación cuando existe una lesión. Existe pues un equilibrio entre los mecanismos destructivos y reparativos. El primer paso en el restablecimiento de la continuidad de la superficie epitelial dañada es la restitución, en la que las células epiteliales migran hacia el margen de la herida o lesión [593, 594]. A continuación, la proliferación celular permitirá la sustitución de las poblaciones celulares que se han perdido como consecuencia de la lesión en cuestión. Las poblaciones celulares que se encuentran a nivel subepitelial pueden modular la reparación del daño epitelial de forma indirecta mediante la producción de factores solubles y moléculas de la matriz extracelular, pero además pueden tener un efecto directo debido a la existencia de poros en la membrana basal que permiten la migración de células, por ejemplo desde la *lamina propria*.

El proceso inflamatorio va a inducir una serie de modificaciones de la biología y función de las células epiteliales intestinales. Los síntomas clínicos asociados a

la EII debidos a la alteración del epitelio son la diarrea, la pérdida de peso, la malnutrición y los cambios en la homeostasis de fluidos y electrolitos. Por otro lado, la alteración de la función de la barrera epitelial permite o facilita la estimulación del sistema inmune local por parte de los antígenos lumenales [595, 596], y por tanto favorece el mecanismo causante en primer término de la inflamación. Existe una relación recíproca entre el epitelio intestinal y el proceso inflamatorio a nivel de la mucosa, pudiendo verse afectados uno y otro en ambos sentidos. Así, durante la inflamación es posible que moléculas implicadas en el daño de la mucosa asociado a la inflamación (citoquinas, factores de crecimiento...) alteren la función de células epiteliales, así como la interacción entre células inmunes y células epiteliales intestinales puede alterar la función epitelial, lo que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, las células epiteliales intestinales pueden contribuir a la respuesta inmune que se desarrolla en la inflamación, ya que los enterocitos actúan como células presentadoras de antígenos [597].

La motilidad intestinal también sufre alteraciones en la colitis, de forma general puede decirse que la motilidad se encuentra disminuída en dicha patología [598]. La inflamación y los mediadores producidos provocan modificaciones en las terminaciones nerviosas del sistema nervioso entérico [599, 600] del mismo modo que el sistema nervioso entérico puede modular la respuesta inflamatoria [601], al igual que lo hacen el sistema nervioso autónomo o el central [599].

Además de la inflamación intestinal, la EII lleva consigo una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la "respuesta de fase aguda", la caquexia o pérdida de peso [602, 603], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [604] o la fiebre [605]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [606-614]; alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria; o leucocitosis [615]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, y puede ser que el mayor riesgo observado en algunos estudios se deba a uso de terapia inmunosupresora y no a la propia enfermedad [616-618].

La EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. Dicho riesgo es tanto mayor como la duración, la extensión y la severidad de la EII [619-621]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear κ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [622], ya que controla la transcripción de genes que codifican para moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y que han demostrado una

relación con el desarrollo de cáncer, como la enzima inducible ciclooxigenasa2 [623, 624] o la citoquina proinflamatoria TNF- α [625, 626]. Así mismo, las rutas que se encuentran por encima de la activación de NF κ B pueden jugar un papel importante en el desarrollo del proceso maligno, como por ejemplo la interacción entre los TLR y sus respectivos ligandos que, en ciertos casos dan lugar a la activación de dicho factor de transcripción.

5. Vías de señalización relacionadas con la EII.

5. 1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B).

El factor de transcripción nuclear **NF κ B** está implicado en el control de la expresión de diversos genes inducibles relacionados con la inflamación y la proliferación [627, 628].

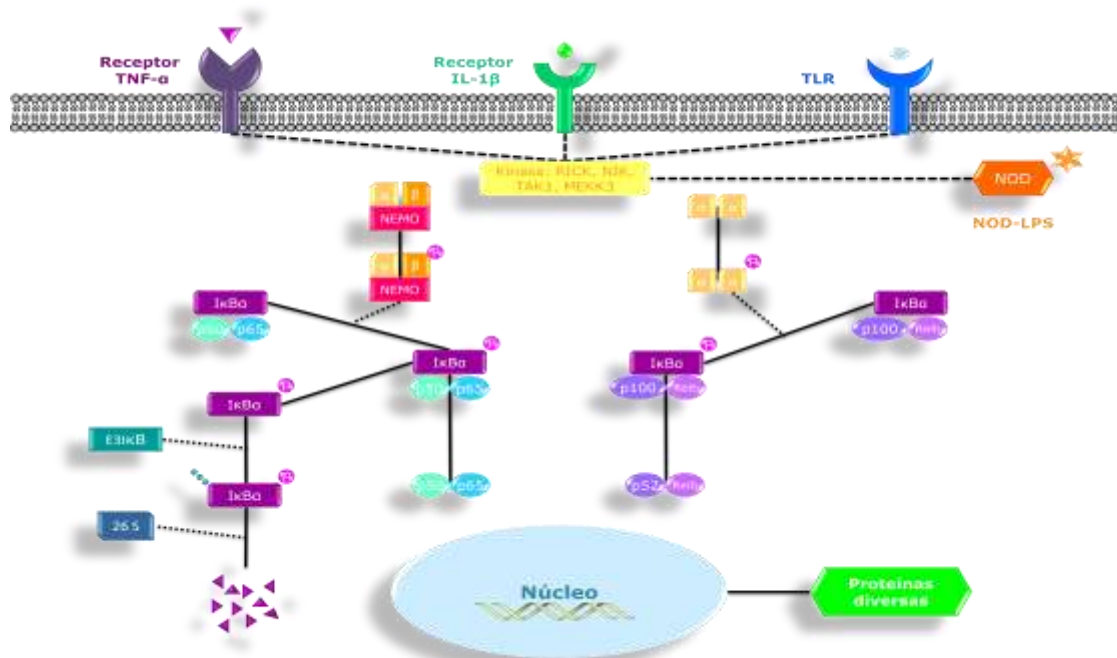


Figura 2: Activación de NF κ B. Se representan ambas vías de activación, la vía clásica (p50-p65) y la vía alternativa (p100-Relb). La familia NF- κ B o Rel está constituida por 5 péptidos diferentes que se unen entre sí formando dímeros, siendo el prototipo de éstos el formado por p50/p65 (Rel A). El dímero inactivo se localiza en el citosol y es retenido en él debido a su unión a una proteína inhibidora llamada I κ B (α , β o ϵ), que impide la translocación al núcleo. Podemos distinguir dos vías para la activación de NF κ B, la vía clásica y la vía alternativa, aunque en ambos casos el resultado final es la traslocación nuclear del NF κ B. En la vía clásica, también conocida como canónica, como consecuencia de la activación por diversos estímulos (citoquinas, agentes que provocan daños a nivel del DNA, o microorganismos), se produce la fosforilación de I κ B gracias a la intervención del complejo de kinasa de I κ B, complejo IKK que está formado por dos subunidades catalíticas (α , β o γ) con capacidad kinasa y una molécula adaptadora llamada NEMO. Como consecuencia, I κ B fosforilada deja libre el dímero de proteínas Rel y sufre un proceso de poliubiquitinación por E3I κ B y la posterior degradación proteolítica por la subunidad 26S del proteasoma. La retirada de I κ B deja expuestas las señales de localización nuclear del dímero y éste viaja al núcleo, donde interacciona con los elementos reguladores de NF- κ B en los promotores de diversos genes que se traduce en la trans-activación de los mismos. En la vía alternativa, NEMO no es absolutamente indispensable en la activación del factor de transcripción.

Existen diversos datos que demuestran un papel crucial de NF- κ B en el proceso inflamatorio que caracteriza a la EII. Modelos experimentales de colitis en animales muestran una activación de este factor de transcripción, y el bloqueo de NF- κ B mediante diferentes estrategias supone una mejora del estado

de los animales y de la colitis [629-631], así como en modelos celulares [632]. Por otro lado, la expresión, así como el estado de activación de NFκB, se encuentran incrementados en biopsias humanas de pacientes con EII [629, 633]. Aunque la inducción en la producción de mediadores proinflamatorios como consecuencia de la activación de NFκB a nivel de células epiteliales intestinales es un hecho demostrado [634], en los últimos años se ha descubierto un posible papel protector en la activación de dicho factor de transcripción en el epitelio intestinal, ya que su inhibición provoca un empeoramiento de la EII en modelos experimentales con ratones transgénicos [635, 636].

5.2. Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

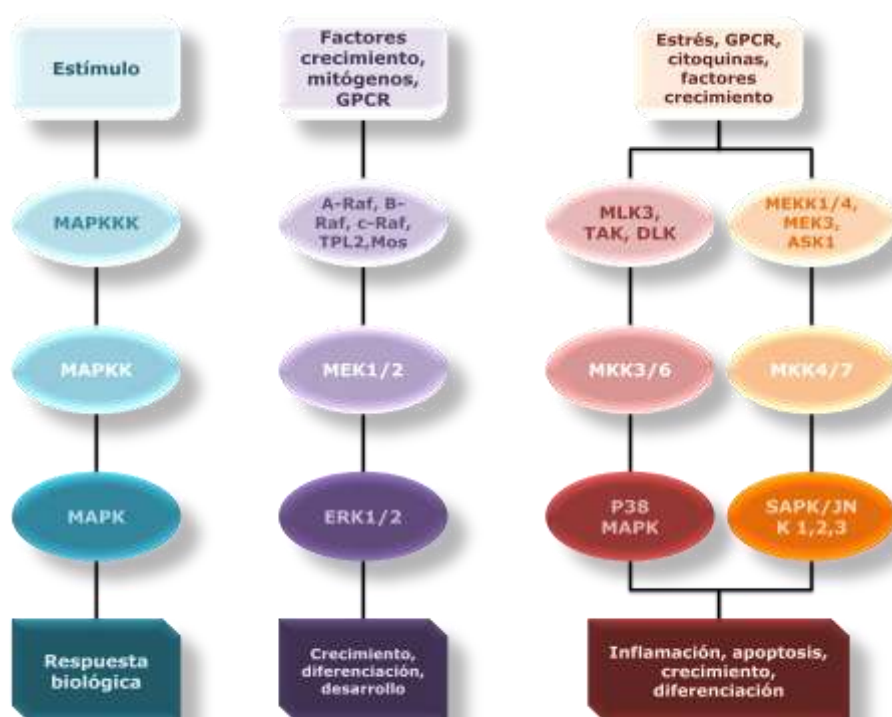


Figura 3: Cascada de fosforilación y kinasas implicadas en la activación de MAP-kinasas. La familia de MAPk está compuesta por una serie de proteínas intracelulares con actividad de quinasas y cuya regulación se basa igualmente en estas reacciones de fosforilación. El estrés físico, algunas citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento activan estas vías mediante la actividad de las quinasas de MAPK que se encuentran corriente arriba en la vía. Puede considerarse como una cascada de tres reacciones de fosforilación, en la que las quinasas de quinasas de MAPK (MAP3K) fosforilan a las quinasas de MAPK (MAP2K), éstas hacen lo propio con las MAPK, que finalmente fosforilan al correspondiente sustrato.

Dentro de la superfamilia **MAPK** (mitogen-activated protein kinases), existen tres familias diferentes: p42/44 extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAP, c-Jun NH2-terminal kinase (JNKs) y p38 MAPK, con capacidad para regular varias funciones celulares. La regulación llevada a cabo por p38 sobre la respuesta a citoquinas y mediadores proinflamatorios es relevante [637]. La inhibición de la fosforilación llevada a cabo por la quinasas p38 da lugar a la reducción en la producción de citoquinas por parte de macrófagos [638], y ha

demostrado ser eficaz en varios modelos animales de inflamación [639]. La activación de JNK a nivel de mucosa intestinal de pacientes con EII se produce fundamentalmente en zonas con enfermedad activa y se localiza en células intestinales, macrófagos y linfocitos [640, 641]. Además, el uso de inhibidores de JNK sólo parcialmente específicos supone una mejora en modelos experimentales de colitis por DSS [640, 642].

5. 3. JAK-STAT.

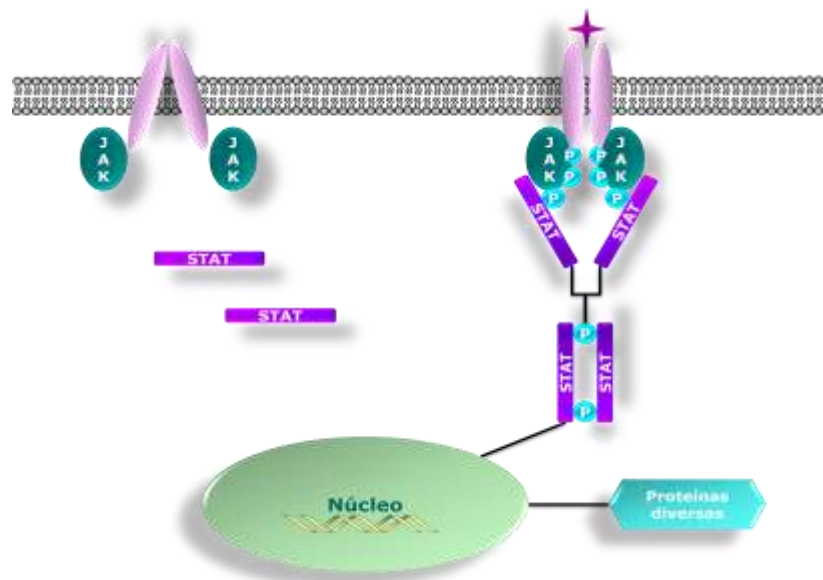


Figura 4: Activación de la vía JAK/STAT. JAK se encuentra asociado al lado citoplasmático del receptor, y cuando se une el ligando del mismo y se produce la dimerización del receptor, JAK sufre un proceso de transfosforilación que implica su activación. JAK en su estado activado fosforila residuos de tirosina del receptor, lo que supone la unión de STAT, que va a sufrir igualmente un proceso de fosforilación que le permite la formación de dímeros de STAT que van a quedar libres para viajar al núcleo.

La interacción de una citoquina con su receptor desencadena una serie de modificaciones a nivel citoplasmático y nuclear que constituyen la vía de señalización de dicha citoquina. El complejo **JAK/STAT** participa en dicho proceso. La participación de los distintos miembros de la familia STAT en la respuesta a citoquinas es específica en algunos casos, como STAT-1 e IFN- γ , STAT-4 e IL-12 o STAT-6 e IL-4; pero no siempre es así, como queda demostrado en el caso de STAT-5, el cual participa en la respuesta a una gran variedad de citoquinas y otros mediadores. La modulación de la actividad de STAT y la consecuente aparición de inflamación intestinal en modelos animales ha demostrado la participación de dicha vía en la EII, aunque dicha modulación depende de la subunidad concreta de STAT y de la citoquina implicada en su activación [643, 644].

5.4. PPAR- γ .

Con una gran importancia en la fisiología del adipocito y en el proceso de sensibilidad a la insulina, **PPAR- γ** forma parte de una familia de receptores nucleares de hormonas, y puede ser activado por una gran variedad de ligandos lo que da lugar a una modulación de la transcripción de diferentes genes [645, 646]. Una vez activados, PPAR- γ forma dímeros con el receptor retinoide X (RXR) para unirse a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en los genes diana.. Ensayos en animales demuestran un efecto antiinflamatorio de las tiazolidindionas, ligandos de PPAR- γ , en modelos de colitis en animales [647]. Igualmente, se están llevando a cabo los primeros ensayos clínicos con rosiglitazona y asociaciones de la misma con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) en el tratamiento de la EII [648].

6. Modelos experimentales de EII.

Los modelos experimentales se diseñan con unas condiciones genéticas (especie, raza y cepa) y ambientales (condiciones mantenimiento durante el protocolo de experimentación) controladas, lo que permite el estudio de los múltiples procesos y mecanismos que dan como resultado la EII. Sin embargo, no existe hoy en día un solo modelo que sea capaz de reproducir de forma exacta la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos.

Según lo anteriormente expuesto, son muchos los modelos experimentales que se utilizan hasta la fecha en el estudio de la EII, y pueden ser clasificados en tres categorías fundamentales y en otras categorías accesorias o secundarias:

- a) Merma en la actividad de linfocitos T reguladores: modelo de transferencia CD4⁺ CD45RB^{high}; ratones deficientes en IL-10; modelo de transferencia de médula ósea o transgénicos para la cadena ξ del TCR (ξ 26); ratones deficientes para la cadena alfa del receptor de células T o TCR (receptor de células T); ratones deficientes de TGF- β .
- b) Excesiva respuesta efectora por parte de células T: ratones transgénicos STAT-4; ratones transgénicos IL-7; ratones *knock in* para TNF- α ; ratones deficientes en A-20; transgénicos para la proteínas B7 relacionado con Fc; ratones transgénicos para el ligando de CD40; modelos espontáneos de colitis (ratones C3H/HeJBir; ratones SAMP1/Yit).
- c) Perturbaciones a nivel del epitelio: ratones deficientes en *mdr1a*; ratones mutantes quiméricos para N-caderina doble negativo; ratones deficientes en *Ga12*; ratones deficientes en el ITF; ratones deficientes en *keratina-8*; modelos químicos o estrés ambiental (DSS, TNBS, oxazolona).

- d) Otros: ratas transgénicas HLA-B27/B2M; ratones deficientes en WASP; ratones transgénicos para el receptor células T linfopénicos; ratones transgénicos para fucosiltransferasa.

Colitis por ácido trinitro-bencenosulfónico en ratas (TNBS): puede considerarse en cierto modo un modelo híbrido, ya que aunque el daño se provoca mediante la administración de un agente químico que va a inducir una lesión a nivel del epitelio intestinal, también conlleva un exceso en la reacción inmune mediada por células T. A pesar de esta consideración, se engloba dentro de categoría de perturbaciones a nivel del epitelio. La colitis provocada por TNBS fue descrita por Neurath en 1995 y es considerada como un modelo de EC, ya que se caracteriza por una inflamación transmural, pérdida de peso y diarrea, y una respuesta de tipo Th1 exacerbada dirigida por niveles elevados de IL-12 [649]. La inducción de la colitis en roedores se lleva a cabo mediante la administración en forma de enema de una solución de TNBS en etanol al 50%. Previamente, Morris y colaboradores pusieron de manifiesto la importancia del vehículo de dicho preparado intrarrectal, es decir la solución de etanol, ya que permite la ruptura de la barrera epitelial en la mucosa intestinal, y favorece el contacto del sistema inmune a nivel de la mucosa con la flora entérica [650]. Mientras que el TNBS provoca una reacción inflamatoria regulada por células T y B, actuando como hapteno al unirse de forma covalente a péptidos propios. La administración de una dosis única da lugar a una necrosis aguda de la pared colónica debido al estrés oxidativo, seguida de una inflamación de la mucosa, caracterizada por la producción de citoquinas de tipo Th1 [651]. En la mayoría de los casos, la cronicidad en este modelo sólo se consigue a través de un protocolo con administraciones repetidas y periódicas, o mediante un proceso de presensibilización y se caracteriza por la producción de IL-2 e IL-17 [652]; aunque se habla de tres tipos de modelos, agudo, estable y crónico, las condiciones no están sistemáticamente definidos hasta la fecha. En esta reacción inflamatoria, la mucosa va a presentar un infiltrado caracterizado por la presencia de linfocitos T CD4⁺ que liberan grandes cantidades de IFN- γ e IL-12, pero no IL-4 [649] y de células productoras de IgG e IgM [653]. Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de inhibir la colitis de tipo Th1 desarrollada en este modelo, lo cual queda demostrado en un experimento en el que la administración oral de TNBS previa a la inducción de la colitis inhibe el desarrollo de la enfermedad, debido a la inducción de células CD4⁺ reguladoras en la *lamina propria* con capacidad para producir TGF- β [653, 654].

Colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS): en este modelo descrito por Okayasu en 1990 [655] la inflamación colónica se consigue mediante la administración en el agua de bebida de un polímero sintético, el sulfato de dextrano sódico o DSS, en un porcentaje variable. Normalmente, aunque los protocolos pueden diferir en casos concretos, se realizan ciclos en los que se alterna el DSS con el agua de bebida regular. Además del modelo agudo, en el que se lleva a cabo un solo ciclo, podemos conseguir una colitis crónica

mediante la repetición de ciclos, ya que la enfermedad puede mantenerse en el tiempo. Este modelo crónico puede dar lugar en último término a la aparición de cáncer colorrectal mediante la asociación del DSS a un agente carcinógeno como el azoximetano, de forma similar a lo que ocurre en el caso de la displasia y la CU [656]. La colitis se caracteriza por una lesión extensiva, depleción completa de las criptas y una regeneración lenta del epitelio colónico. En el modelo de inflamación aguda, los animales experimentan diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso; mientras que desde el punto de vista histopatológico se observa un daño a nivel de las criptas y de las células epiteliales, infiltración de granulocitos y células mononucleares, edema tisular y ulceraciones. La inflamación colónica, al menos en el caso del modelo agudo, no depende de la respuesta inmune adquirida, y por tanto es inducible independientemente de linfocitos, ya que se produce incluso en animales modificados genéticamente que no poseen este tipo celular (SCID) [657]. Juegan un papel crucial las citoquinas producidas por macrófagos, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y la flora bacteriana comensal [658]. En cambio, en la fase crónica se ha demostrado la participación de linfocitos CD4+ en zonas de curación, los cuales producen IFN- γ e IL-4 [659]. De este modo, aunque las alteraciones producidas se asemejan a la colitis ulcerosa, es decir, una respuesta de tipo Th2 [660, 661], los últimos datos indican una respuesta mixta Th1/Th2.

7. Tratamiento de la EII.

La etiología, al menos parcialmente desconocida, de la EII impide el establecimiento de una estrategia terapéutica específica frente a una diana farmacológica etiopatogénica en su manejo. Así, en la práctica clínica se emplean varios fármacos que pertenecen a diferentes grupos farmacológicos y que poseen o desarrollan una acción con un carácter inespecífico. El abanico de posibilidades terapéuticas es cada vez más amplio, aunque ninguno de los principios activos usados actualmente es eficaz ni seguro de forma universal, por lo que la investigación en este campo es muy intensa.

7.1. Aminosalicilatos.

El ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), también llamado mesalazina, y diversos fármacos que contienen y liberan dicha molécula han demostrado ejercer un efecto antiinflamatorio en la EII, de forma preferente en CU, y se han empleado desde hace mucho tiempo, como ocurre en el caso de la sulfasalazina (5-ASA unido a sulfapiridina) [662]. Los aminosalicilatos son útiles, en concreto, en la inducción y en el mantenimiento de la remisión en CU, siendo menos útil en el caso de EC [663]. Dicho efecto depende de la porción 5-ASA [664, 665], que en el caso de la sulfasalazina va a ser liberada de la sulfapiridina en el colon por medio de las azoreductasas de la flora intestinal, lo que implica que no sea útil en la EC que se manifieste en el intestino delgado. Para evitar este problema, se han desarrollado formas de liberación controlada de mesalazina.

Nombre genérico	Especialidad	Liberación del 5-ASA
Sulfasalazina	Salazopirina	Colon
Olsalacina	Rasal	Colon
Mesalacina	Claversal	Íleon (pH>6)
	Lixacol	Íleon distal y colon (pH>7)
	Pentasa (microgránulos)	Intestino delgado y colon

Tabla 2: Fármacos y especialidades farmacéuticas de aminosalicilatos utilizados en el tratamiento de la EII.

Aunque no está completamente dilucidado, el mecanismo del efecto antiinflamatorio de los aminosalicilatos no se debe fundamentalmente a la modulación de síntesis de prostaglandinas, como ocurre en el caso de los salicilatos [666, 667]. El mecanismo parece residir en la alteración del factor de transcripción NFκB y la consecuente modificación en la producción de determinados mediadores inflamatorios como citoquinas, moléculas de adhesión o enzimas. Así, aminosalicilatos como la sulfasalazina bloquean la actividad NFκB mediante la inhibición de la degradación de IκBα [668-670], mientras que la molécula de 5-ASA en su forma libre impide la fosforilación de RelA [671]. A esto ha de sumarse la capacidad para eliminar ROS y la inducción de la apoptosis [672-676]. Por otro lado, los aminosalicilatos pueden poseer mecanismos que contribuyen al efecto antiinflamatorio y que son independientes de la porción 5-ASA, como el bloqueo de la unión de receptores de citoquinas *in vitro* ejercido por la sulfasalazina [677] o la olsalazina [678]. Otros efectos son la inhibición de la producción de leucotrienos quimioatrayentes en CU por parte de 5-ASA [679]; o la capacidad de protección frente al daño celular y a la apoptosis inducida por estrés oxidativo ejercida por los aminosalicilatos sobre el epitelio intestinal [680, 681] y el aumento de la proteína de choque térmico [682]. El efecto final será una reducción en el tráfico leucocitario [683].

Los aminosalicilatos, y por tanto el 5-ASA, actúan tópicamente en el intestino en el caso de la EII, y su eficacia depende de la concentración alcanzada en el lumen [684-686]. Para ello, el fármaco ha de llegar intacto al lugar de la inflamación, es decir, al intestino, normalmente en una región distal (íleon/colon). Aunque la administración rectal en forma de supositorio o enema es una opción, las dos estrategias principales en este caso son la formulación en formas de liberación controlada que contienen el 5-ASA unido a resinas que lo liberarán a un determinado valor de pH o bien de forma gradual; o la síntesis de moléculas que contienen la porción 5-ASA unida a otras moléculas mediante un enlace de tipo azo, que será degradado por las bacterias intestinales gracias a la actividad azo-reductasa que éstas poseen. Todo esto es necesario para impedir la absorción prematura del 5-ASA. En ambos casos, la mayor parte de la fracción 5-ASA será liberada a nivel del íleon terminal o el colon (o a nivel del intestino delgado, en el caso de ciertas formulaciones de liberación controlada o sostenida) y por tanto la concentración sistémica es menor. La metabolización del 5-ASA se efectúa mediante N-acetilación por parte de la enzima N-

acetiltransferasa-1 a nivel del epitelio intestinal [687, 688], seguida por una conjugación de fase II con ácido glucurónico en el hígado.

Los aminosalicilatos son fármacos bien tolerados, y los efectos adversos ligados a la fracción 5-ASA son moderados y reversibles: mareos, fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas o erupciones cutáneas [689, 690]. Existen ciertos efectos adversos propios de la sulfasalazina debidos a la porción de sulfapiridina, como oligospermia [691] o deficiencia de folato [692]. Existen otros efectos adversos más graves, pero poco frecuentes; así como la posibilidad de nefrotoxicidad debido a niveles elevados de salicilatos en sangre como consecuencia de altas dosis de aminosalicilatos [693, 694].

Como ya se ha mencionado, la eficacia de los aminosalicilatos depende de la llegada de una alta concentración de 5-ASA al lugar de acción. Según esto, los supositorios, geles, espumas, y enemas de 5-ASA se emplean en proctitis o proctosigmoiditis o en el control de la enfermedad que atañe al colon distal en casos de pancolitis. En casos de CU con mayor extensión a lo largo del intestino grueso se emplearán las formas de liberación modificada o las moléculas con enlaces de tipo azo. Y en casos de EC que afecta al intestino delgado, puede ser útil la preparación en la que se produce una liberación gradual de 5-ASA (Pentasa). En cualquier caso, siempre ha de emplearse la mayor dosis tolerada, disminuyéndola en casos de enfermedad quiescente o período de remisión.

7. 2. Glucocorticoides.

Los glucocorticoides son moléculas sintetizadas mediante la sustitución sobre la estructura del esteroide natural cortisol, siendo la prednisolona y su profármaco la prednisona, junto con la 6-metil prednisolona los más empleados en el tratamiento de la EII, aunque las preparaciones a base de budesonida también se utilizan bastante, ya que este fármaco sufre un rápido fenómeno de primer paso, y su baja biodisponibilidad (10-20%) permiten la llegada de una menor cantidad a la circulación sistémica y minimizando las reacciones adversas, al menos cuando se utilizan dosis bajas. Otra opción para disminuir la aparición de efectos adversos es la administración tópica en forma de supositorios, enemas o espumas.

Los glucocorticoides en cantidades suprafisiológicas ejercen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores [695, 696]. Estos esteroides se introducen en la célula por difusión para unirse al receptor de glucocorticoides citoplasmático, que está unido a la proteína de choque térmico de 90 kDa. El complejo formado sufre una serie de cambios conformacionales que permiten la liberación del glucocorticoide unido al receptor de la citada proteína, permitiendo así la translocación al núcleo, donde el complejo interacciona a través del dominio dedo de zinc con los elementos de respuesta a glucocorticoides de múltiples genes, modulando así la transcripción de los mismos. Además, los receptores de glucocorticoides activados pueden interactuar con otros factores de transcripción en el núcleo y modularse entre ellos de forma recíproca. Entre

los genes modulados se encuentran muchos que codifican proteínas con un claro papel en la respuesta inmune y por tanto, en la inflamación, y de ahí se deriva su efecto antiinflamatorio en la EII. Se produce una desviación hacia una respuesta de tipo Th2, un aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias como TGF- β e inhibición de la producción de citoquinas de tipo Th1, de moléculas de adhesión y de enzimas implicadas en la reacción inflamatoria.

La administración prolongada conlleva la aparición de efectos adversos de diverso tipo: metabólicos, inmunitarios, cardiovasculares, cutáneos, osteoarticulares, hormonales, neuropsiquiátricos u oculares. El riesgo se incrementa conforme aumenta la duración de exposición al fármaco y la dosis administrada [697]. Ciertos efectos adversos de los glucocorticoides poseen una especial relevancia en el caso de la EII, como la hiperglucemia, la esteatohepatitis no alcohólica o el riesgo elevado de osteoporosis [698, 699]. En el caso de la osteoporosis, las medidas de prevención incluyen el calcio y la vitamina D, los estrógenos en las mujeres menopáusicas y los bisfosfonatos.

La dosis ideal de glucocorticoides en CU o EC no está establecida sistemáticamente, porque la experiencia individual determina la práctica clínica en este sentido. Aquellos pacientes que presenten la enfermedad con un grado de actividad moderado o grave deben ser tratados en primer lugar con glucocorticoides (por vía intravenosa en los casos graves) para promover la remisión y reducir los casos mortales en la CU severa [700]. Tras la respuesta al tratamiento, la dosis será disminuida gradualmente hasta la retirada del fármaco para evitar efectos adversos por el tratamiento prolongado o la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, utilizando la terapia alternante cuando sea adecuada. En cualquier caso, un porcentaje elevado de los que responden necesitan cirugía al año. La administración rectal de glucocorticoides puede ser beneficiosa ya que supone menores efectos sistémicos, como en el caso de la budesonida en forma de enema [701].

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

7.3. Azatioprina y 6-mercaptopurina.

La 6-mercaptopurina y su profármaco la azatioprina son antimetabolitos púricos que se utilizan en el tratamiento del cáncer y que han demostrado propiedades inmunosupresoras. El metabolismo del fármaco puede llevarse a

cabo por tres vías diferentes, dos de las cuales dan lugar a metabolitos inactivos, mientras que la tercera, catalizada por la enzima hipoxantina fosforribosil transferasa, da lugar a los nucleótidos 6-tioguanina, que son los metabolitos activos [702]. Estos productos se acumulan intracelularmente e impiden la síntesis de purinas y ácidos nucleicos y la reparación del ADN, lo que conlleva una inhibición de la división y proliferación celular, siendo éste el mecanismo probable de su acción inmunosupresora.

En cuanto a la farmacocinética, la 6-mercaptopurina y su profármaco son rápidamente eliminados del plasma, mientras que los nucleótidos de 6-tioguanina que se acumulan intracelularmente presentan una vida media de eliminación de varios días [703]. El comienzo del efecto necesita un período de varias semanas debido al tiempo necesario para alcanzar una estabilidad en la cinética de los nucleótidos de 6-tioguanina, por lo que durante ese tiempo es necesario un tratamiento con otros fármacos para paliar los síntomas agudos. La biotransformación de la 6-mercaptopurina es llevada a cabo, al menos en parte, por la tiopurina metiltransferasa [704], y la variabilidad interindividual en la actividad de dicha enzima debida a determinantes genéticos hace que existan variaciones en la cantidad de nucleótidos que se acumulan intracelularmente.

Los principales efectos adversos debidos a la azatioprina y a la 6-mercaptopurina pueden clasificarse en dos categorías: alergias, que se manifiestan con pancreatitis, fiebre, erupciones, náuseas, diarrea o hepatitis; o toxicidad relacionada con la dosis que puede dar lugar a depresión a nivel de médula ósea y leucopenia, anemia o trombocitopenia, con un mayor riesgo de infecciones oportunistas o neoplasmas. El incremento en el riesgo de padecer cáncer no está confirmado.

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

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

7.4. Metotrexato.

Otro fármaco empleado en el tratamiento del cáncer es el metotrexato, cuya estructura es análoga a la del ácido fólico y por tanto actúa como sustrato de la enzima sintasa de folilpoliglutamato, que adiciona restos de ácido glutámico a dicho compuesto [705], lo que favorece la retención del metotrexato a nivel intracelular e incrementa la afinidad del fármaco para unirse a diversas enzimas

diana [706, 707]. El metotrexato actúa como un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa, mientras que los metabolitos poliglutamados del mismo son inhibidores de enzimas que se encuentran corriente abajo de dicha enzima en la vía metabólica del ácido fólico [708, 709]. Globalmente, pues, el metotrexato impide las reacciones sintéticas dependientes de ácido fólico. El efecto antiproliferativo y citotóxico responsable del uso del metotrexato en el cáncer a dosis elevadas no es el responsable fundamental del efecto antiinflamatorio, sino que éste se debe a la inducción de apoptosis de linfocitos T y la inhibición de la activación de los mismos. Su acción es más rápida que con otros inmunosupresores, por lo que se emplea en casos de falta de respuesta a azatioprina o 6-mercaptopurina.

Debido al riesgo de hepatotoxicidad la administración semanal por vía subcutánea es la más utilizada. Así, es rápidamente eliminado en su forma original a nivel renal, mientras que los metabolitos poliglutamados se acumulan intracelularmente en diferentes tejidos, incluida la mucosa intestinal. La exposición prolongada al fármaco puede ocasionar toxicidad, siendo los efectos adversos clasificados en tres categorías: efectos antiproliferativos relacionados con la dosis en médula ósea, epitelio intestinal y folículos pilosos; reacciones idiosincrásicas de hipersensibilidad o de tipo alérgico; y daño hepático debido a los efectos acumulativos de la exposición prolongada. La aparición de los primeros determina la necesidad de disminuir la dosis y de la coadministración de ácido fólico [710]; mientras que las reacciones alérgicas (erupciones y pneumonitis) desaparecen tras la retirada del tratamiento. Al igual que en el caso de los glucocorticoides existe la posibilidad de resistencia a metotrexato, debida a un incremento en la expresión de la enzima diana, o a incremento en la salida del fármaco desde el medio intracelular [711].

7.5. Ciclosporina y tacrólimo.

Estas dos moléculas con diferente origen comparten un mecanismo inmunosupresor similar, ya que se unen a proteínas citoplasmáticas dando lugar a complejos que inhiben a la calcineurina fosfatasa por la que se impide la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT), que regula la transcripción de citoquinas relevantes en la activación de los linfocitos T, IL-2 e IFN- γ [712], bloqueando la activación de dichas células inmunes.

La pobre absorción de la ciclosporina determina su formulación farmacéutica en forma de microemulsión, mientras que el tacrólimo es menos dependiente de la presencia de bilis para su absorción y es más potente que la anterior. Ambos presentan un estrecho margen terapéutico, con aparición de nefrotoxicidad, así como infecciones oportunistas y procesos malignos. Su uso debe restringirse a pacientes seleccionados de forma concomitante al inicio de otros inmunosupresores más seguros, con un seguimiento de los niveles sanguíneos para la dosificación y monitorización de la posible toxicidad. Así, esta opción

terapéutica debe considerarse como un período de transición hacia el tratamiento con otro inmunosupresor con un mejor perfil de seguridad.

7. 6. Agentes biológicos o terapia biológica.

Los avances biotecnológicos de los últimos años han permitido el desarrollo de posibles dianas terapéuticas en la EII, y en otras enfermedades inflamatorias de carácter crónico como la artritis reumatoide, obtenidas por técnicas de biología molecular. La mayoría de estos fármacos pueden ser considerados "agentes biológicos" o "terapia biológica", materiales biológicos o modificadores de la respuesta biológica, como genes, células, tejidos, vacunas, sueros, y agentes humorales. La principal diferencia con respecto a los tratamientos o fármacos tradicionales es la interferencia con una diana única, lo que hace que la eficacia de dichas moléculas refleje la importancia patogénica de la diana en cuestión. Tres grupos pueden establecerse dentro de la terapia biológica:

- neutralización de citoquinas proinflamatorias: concretamente, TNF- α , IL-1 β [713], o el eje IL-12/IL-18/IFN- γ . El grupo más ampliamente estudiado es el formado por las moléculas que interfieren con las acciones biológicas del factor de necrosis tumoral o TNF (ver más adelante).
- aplicación de citoquinas antiinflamatorias: fundamentalmente la administración de IL-10 [714, 715] o de IL-11 recombinante humana.
- interferencia con la activación celular o el tráfico celular: diversas estrategias se recogen en este punto, como los anticuerpos anti-CD4, con resultados poco prometedores, debido a su toxicidad; anticuerpos anti- α_4 [716]; inhibidores de vías de transducción de señal, fundamentalmente MAPquinasas, como el SB203580, que inhibe p38, o NF κ B, mediante diversas estrategias como el bloqueo de la degradación de I κ B o de la producción de p65.

Terapia anti-TNF- α : Dentro de este grupo terapéutico para la EC existen moléculas sintéticas con actividad anti-TNF- α , que se van a unir a dicha citoquina en su forma soluble o unida a la membrana lo que impide la unión a su receptor, y por tanto la ejecución de sus actividades biológicas [717-721]. El infliximab es un anticuerpo quimérico monoclonal de humano y ratón; el CDP571 es un anticuerpo monoclonal humanizado; y el etanercept es una proteína recombinante humana de fusión que contiene una parte del receptor para TNF. El adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano, lo que evita las reacciones frente a las fracciones procedentes de otra especie, y por tanto es muy útil en pacientes que producen anticuerpos frente al infliximab.

Los principales efectos adversos son el desarrollo de reacciones en la infusión (con infliximab especialmente) y la inducción de anticuerpos. El más empleado en el caso de EC es el Infliximab, que se emplea en la inducción de la remisión

en pacientes con EC moderada y que son resistentes a tratamientos convencionales, siendo muy útil en el cierre de fístulas. La administración se repetirá de forma periódica para mantener el estado de remisión de la enfermedad. También es útil en el período que transcurre hasta que se consigue el efecto terapéutico cuando comienza un tratamiento con azatioprina o 6-mercaptopurina, ya que el efecto de la molécula anti-TNF no suele durar más de 2-4 meses.

Además de las moléculas con capacidad de unión a TNF- α citadas anteriormente, se han planteado otras estrategias terapéuticas relacionadas que se encuentran en proceso de investigación. Entre ellos, los inhibidores de TNF- α de pequeño tamaño molecular, como los inhibidores de fosfodiesterasas [722-727], la talidomida [728-731] o los inhibidores de la enzima convertidora de TNF- α [732].

7. 7. Terapia génica.

La terapia génica consiste en la introducción de un gen activo y funcional en células somáticas con el fin de expresar o inhibir en ellas una proteína terapéutica, mediante el empleo de un vector vírico [733-737]. Otro ejemplo son los oligonucleótidos antisentido frente a ICAM-1, como el ISIS 2302, cuyos efectos no han podido ser confirmados [524]. La investigación clínica de estos procedimientos se encuentra en un periodo de intensa actividad con el fin de conseguir nuevas estrategias de modo menos costoso y con una eficacia clínica aceptable.

Una vez expuesto el arsenal terapéutico disponible en la actualidad para la EII, a continuación se exponen los algoritmos en el tratamiento de EC y CU de forma independiente.

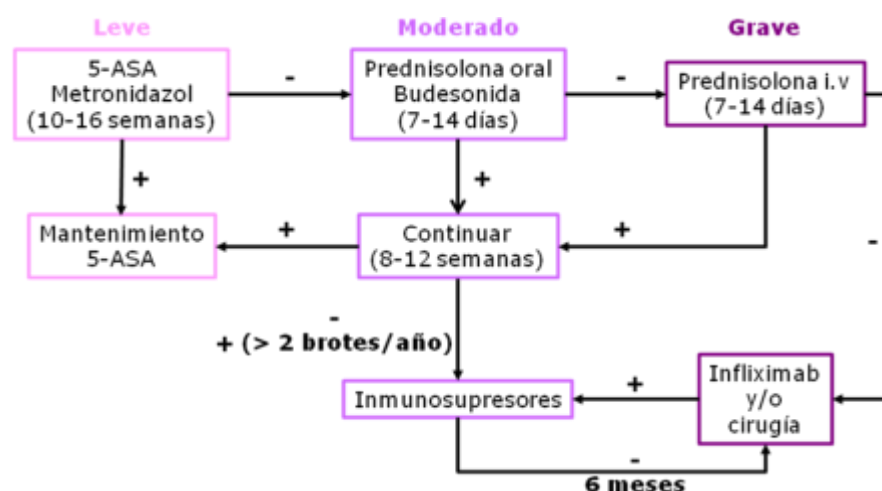


Figura 5: algoritmo de tratamiento en la EC.

A pesar del amplio abanico de fármacos empleados en el tratamiento de la EII, las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad no son totalmente

satisfactorias. En primer lugar, no existe ningún fármaco específico para el tratamiento de esta enfermedad, sino que se utilizan fármacos con carácter

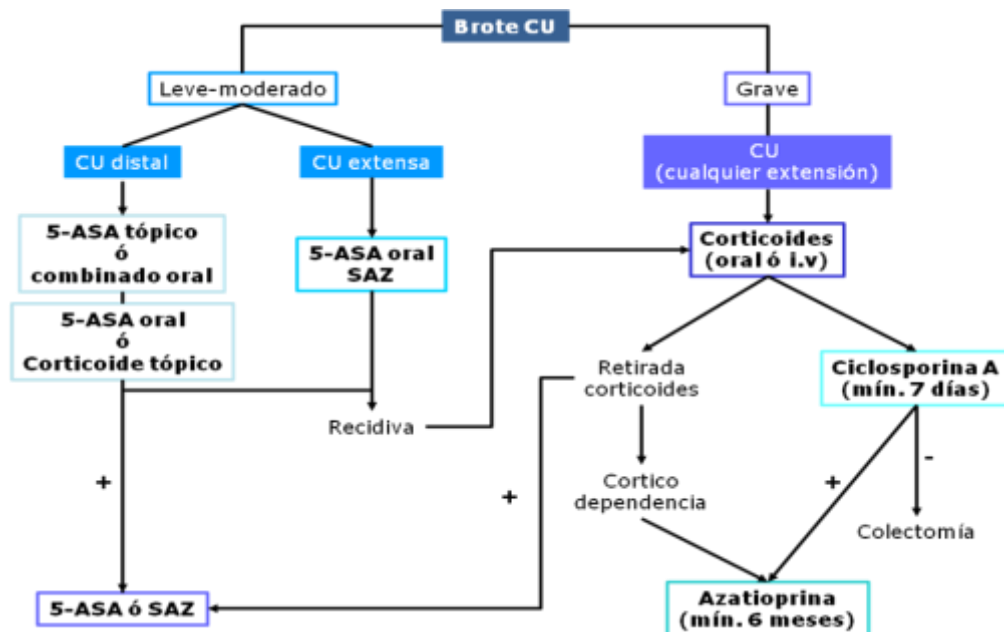


Figura 6: algoritmo de tratamiento en la CU.

antiinflamatorio o inmunosupresor y que, por tanto, van a suprimir la respuesta inmune y las vías inflamatorias de manera global. Esto puede hacer que el individuo presente una merma en la capacidad de defensa, es decir, en su sistema inmune. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos empleados se caracterizan por un amplio espectro de reacciones adversas; y en algunos casos, como en el de los glucocorticoides, dan lugar a fenómenos de dependencia. Además, existen situaciones en las que los pacientes no responden a un determinado fármaco, o incluso se hacen refractarios al mismo. Por todo ello, la farmacología de la EII es un campo de intensa investigación y la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con un mejor perfil de toxicidad está totalmente justificada.

La EII ha sido relacionada con la pérdida de masa ósea y fenómenos de osteopenia y osteoporosis. La explicación a esta asociación ha de basarse no sólo en la genética, sino también en determinadas situaciones que caracterizan a la enfermedad en cuestión como la inflamación sistémica, la malnutrición o el tratamiento con glucocorticoides. Se han llevado diversos estudios en los que se ha demostrado la eficacia de los bisfosfonatos en el tratamiento de la osteoporosis asociada a la EII, o al tratamiento de la misma con glucocorticoides [738-742]. Además de la escasa toxicidad, el posible efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos, junto con su eficacia en las alteraciones del hueso, podría dar lugar a una opción terapéutica interesante en la EII.

II. Prenilación.

1. Generalidades.

La prenilación es un proceso postraducciona en el que la estructura de las proteínas sintetizadas es modificada mediante la incorporación de restos lipídicos de tipo isoprenoide, fundamentalmente de dos tipos, el farnesilpirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPI). Como consecuencia de esta modificación estructural, las proteínas preniladas poseerán comportamientos diferentes en relación a procesos celulares fundamentales, como el anclaje de dichas proteínas a la membrana o la interacción con otras proteínas y en consecuencia sobre funciones como el crecimiento celular, la diferenciación, la función del citoesqueleto y el tráfico vesicular. La síntesis de estos restos isoprenoides se realiza a través de la vía del mevalonato. Una vez sintetizados, se unen de forma covalente a residuos de cisteína próximos al extremo N-terminal de la estructura de las proteínas de la superfamilia de las proteínas G, entre otras [743]. Dentro de estas proteínas G existen dos subtipos, las proteínas G heterotriméricas y las llamadas proteínas GTP-asas de pequeño tamaño molecular, que son proteínas monoméricas que constituyen probablemente el sustrato más importante del proceso de prenilación [744].

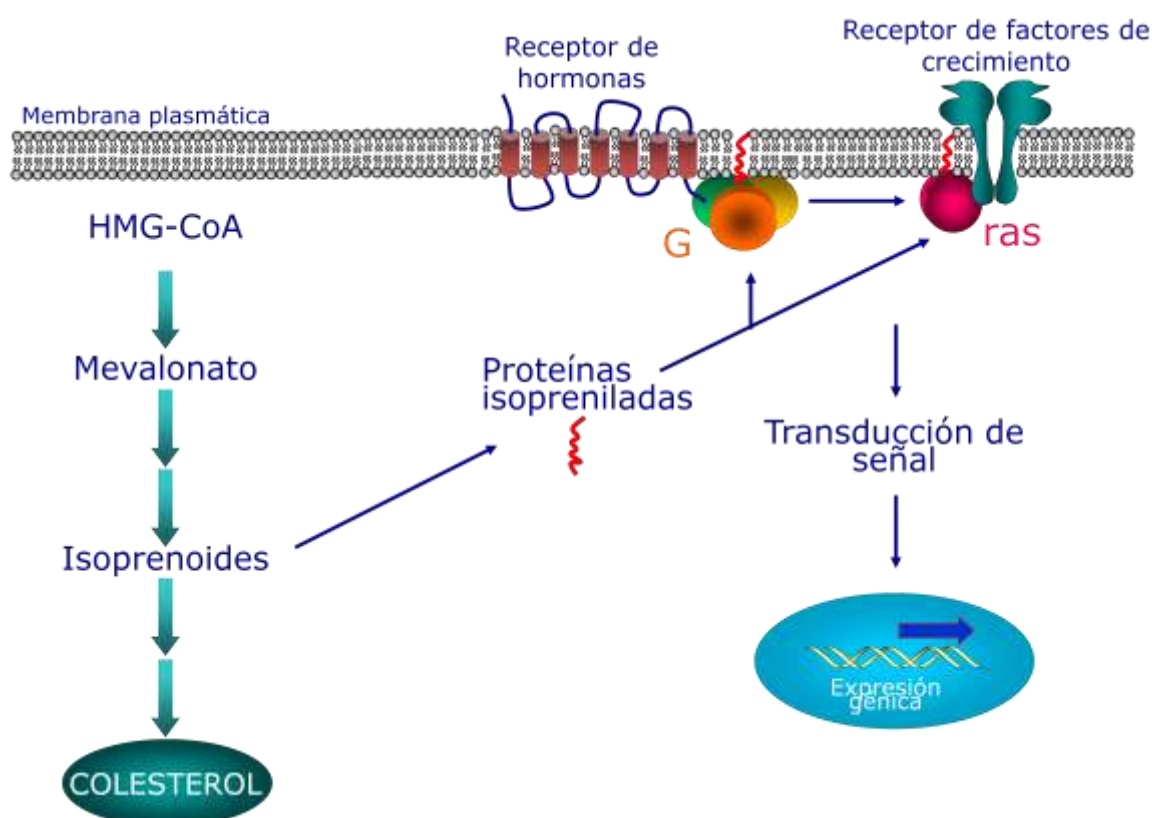


Figura 7: proceso de prenilación de proteínas.

La prenilación de proteínas se descubrió en la década de los 80 como una modificación que sufrían las proteínas G de pequeño tamaño molecular y que era

crítica para su función y localización [745]. En la actualidad se sabe que dentro del abanico de proteínas en el ser humano, alrededor de 300 sufren el proceso de prenilación [746], participando dichas proteínas en diversas vías de transducción de señales relacionadas con el crecimiento celular, la diferenciación, la función del citoesqueleto y el tráfico vesicular. El proceso de prenilación se debe fundamentalmente a la acción de dos enzimas, la farnesil transferasa (FTasa) y las geranylgeranyl transferasas I y II (GGTasas), que catalizan la incorporación de restos farnesilo y geranylgeranilo, respectivamente [746, 747], aunque se han descrito fenómenos de prenilación cruzada que ponen de manifiesto que existen casos en los que no se respeta la especificidad de sustrato de dichas enzimas [743, 748].

Además de la prenilación, existen otros dos procesos postraduccionales que se producen sobre las proteínas y que son llevados a cabo por la endoproteasa Rce-1 y la s-adenosilmetiona-dependiente carboximetilasa [749, 750]. El significado funcional de la prenilación consiste en la modificación de las propiedades de las proteínas preniladas en cuanto a su capacidad para unirse a las membranas, aunque en este sentido otros procesos de incorporación de restos lipídicos a la estructura proteica también pueden ser importantes, como la palmitoilación o la miristoilación [751, 752].

2. Estructura y síntesis de isoprenoides. Vía del mevalonato.

Los isoprenoides derivan de la estructura de cinco átomos de carbono del isopentenil difosfato (IPP) y de su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), que constituyen la estructura básica de este grupo de moléculas que se conoce como unidad isopreno. Las diferentes moléculas isoprenoides se forman mediante la unión de una o varias unidades de isopreno a este núcleo estructural. La síntesis

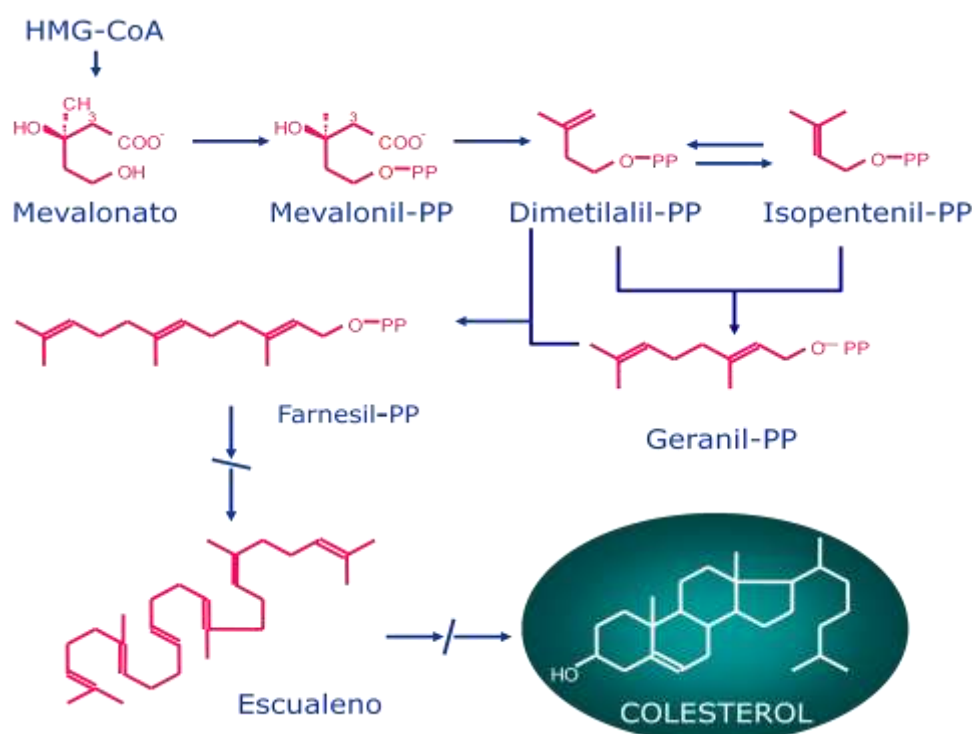


Figura 8: Ruta del mevalonato

Efecto antiinflamatorio de Bisfosfonatos nitrogenados en EII.

de estas moléculas hidrofóbicas se realiza a través de la vía del mevalonato en el caso de animales, hongos y arqueobacterias, la cual convierte el mevalonato en restos isoprenoides, tantos esteroideos como no esteroideos.

En esta ruta biosintética se van a formar como se ha mencionado anteriormente, los dos isoprenoides que participan de forma fundamental en la prenilación de proteínas, el FPP derivado del IPP, de 15 átomos de carbono; y el GGPP, derivado del FPP con 20 átomos de carbono. Pero, además, la vía del mevalonato da lugar a la síntesis de otros lípidos no isoprenoides, como el colesterol. La regulación de la vía es importante para mantener un equilibrio entre la cantidad necesaria de isoprenoides y el exceso en la síntesis de colesterol. El paso limitante de esta ruta es la reacción de hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato catalizada por la HMG-CoA reductasa, aunque la enzima HMGCoA sintasa y el receptor de LDL también cumplen una función reguladora mediante un mecanismo de *feedback* negativo a través de SER-1 (aminotransferasa de fosfoserina-3). Por otro lado, existe otro mecanismo de regulación debido a una mayor afinidad por los productos de esta ruta biosintética por parte de las enzimas que sintetizan los restos no esteroideos. Así, en una situación de escasez de funcionamiento de la ruta del mevalonato, los productos sintetizados se van a derivar hacia la producción de isoprenoides y no a la de colesterol [753]. La inhibición de la ruta del mevalonato implica una menor síntesis de isoprenoides y una inhibición, pues, de la prenilación. El acúmulo de proteínas no preniladas puede desempeñar un papel regulador sobre la ruta biosintética, además de modificar la función de esas proteínas que no pueden ser preniladas [754-757].

3. Enzimas que participan en la prenilación.

Los principales artífices de la prenilación son las preniltransferasas que catalizan la reacción de prenilación propiamente dicha, es decir, la incorporación de los restos isoprenoides a la estructura proteica. La farnesiltransferasa (FT) incorpora restos farnesilo, mientras que la geranilgeraniltransferasa (GGT) hace lo propio con los restos geranilgeranilo. Por otro lado, otras enzimas van a ser cruciales en la prenilación, ya que permiten la síntesis de esos restos isoprenoides que posteriormente serán incorporados. Aunque todas las enzimas que participan en la ruta del mevalonato juegan un papel en la síntesis de los isoprenoides, la farnesil difosfato sintasa (FPPS) y la geranilgeranil difosfato sintasa (GGPPS) son especialmente relevantes ya que son isoprenil pirofosfato sintasas y catalizan el paso final para la obtención de FPP y el GGPP, respectivamente.

La farnesildifosfato sintasa fue descrita por Lynen en 1959, como la enzima encargada de la síntesis del isoprenoide FPP. Para ello, cataliza una condensación secuencial de dos moléculas de IPP con dimetilalildifosfato (DMAPP), de manera que en la primera incorporación se forma el intermediario GPP, y en la segunda se obtiene el FPP, aunque algunos estudios hablan de una

selectividad de la enzima por este último paso, ya que se une preferentemente al GPP y no al DMAPP [758, 759]. La enzima se une a IPP y a DAMPP; con la participación de Mg^{2+} como activador se forma un carbocatión alílico que atrae electrofílicamente a un C de la molécula de IPP lo que da lugar a la formación de un enlace C-C y por tanto, a la unión entre IPP y DAMPP para formar el GPP, que será liberado del sitio activo [760-762]. Su localización ha sido descrita en el citosol [763], mitocondria [764, 765], peroxisomas [766] y cloroplastos [767]. Su estructura se basa en un homodímero de unos 80 kDa [768-771], cuya estructura se caracteriza por la existencia de un hueco llamado "hueco para la síntesis de terpenoides" y por la disposición constituida por diez hélices alrededor de una cavidad central. El sitio activo de cada subunidad se orienta hacia el exterior y en dirección opuesta a la otra subunidad que compone el dímero, de forma que ambos están disponibles para la unión al sustrato, por lo que cada enzima posee dos sitios de unión. A su vez, dentro de cada sitio de unión existe un lugar de acomodación para el sustrato (GPP, DAMPP, o FPP) en la región FARM (first aspartate-rich motif), y otro para IPP en SARM (second aspartate-rich motif) [772, 773]. En los últimos años se ha descrito la interacción entre las dos subunidades del dímero, demostrándose que éstas no actúan como dos elementos independientes [774]. Los mecanismos de regulación de la enzima son aún poco conocidos.

La geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) es una preteína de 34 kDa que cataliza la condensación de FPP con IPP para dar lugar a la formación de GGPP, sustrato de la geranilgeranilación. Aunque su estructura con seis dominios es diferente a la de FPPS, comparte ciertos dominios con ella, lo que permite la actividad enzimática en cuestión, muy similar a la anterior. La principal diferencia radica en la zona próxima a la región FARM, ya que los aminoácidos en las posiciones cuarta y quinta antes de esta región determinan la longitud del producto sintetizado por FPPS y GGPPS [773, 775-779]. Esto se explica porque la existencia de aminoácidos de menor tamaño en esa localización permite la permanencia en el sitio activo del producto sintetizado, lo que implica una posterior elongación, y por tanto, la longitud de la cadena sintetizada será mayor. Su distribución ubicua pone de manifiesto la importancia del GGPP en el organismo [780, 781].

La enzima responsable de la farnesilación, farnesiltransferasa (FT), posee dos sitios de unión, uno de ellos para el FPP que va a ser incorporado y el otro para establecer el contacto con el motivo CAAX del extremo carboxiterminal de la proteína que va a someterse a la prenilación [748]. Así se crea un enlace tioéter entre el isoprenoide y un resto de Cisteína en el motivo CAAX, en el cual A representa un aminoácido alifático de pequeño tamaño. El zinc actúa como ión catalizador [782-785] y se une a la proteína mediante el grupo tiol de alguno de los aminoácidos de la región CAAX [786], pero no participa en la unión a FPP. Para la acción de la enzima la proteína ha de presentar un resto de valina o de leucina en la posición del segundo aminoácido alifático de CAAX [787]. El

aminoácido localizado en X determina el tipo de isoprenoide que va a ser incorporado, de manera que sólo en el caso de metionina, alanina, serina o glutamina la FT es activa, mientras que cuando existe un resto de leucina en dicho lugar, interviene otra enzima, la GGT-I, capaz de incorporar restos lipídicos de mayor longitud [788, 789].

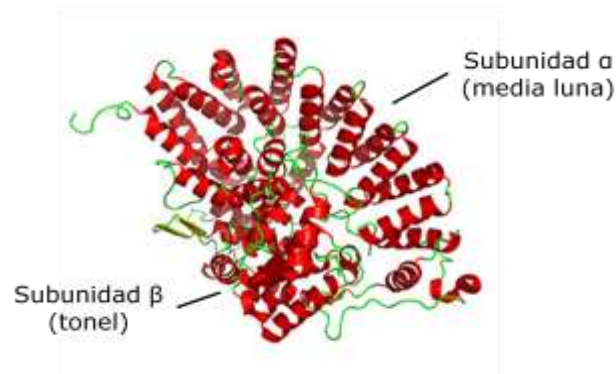


Figura 9: Estructura tridimensional de la enzima farnesiltransferasa. Su estructura heterodimérica formada por las subunidades α (48 kDa) y β (46 kDa) caracteriza a esta proteína, aunque la subunidad α también aparece en la estructura de la GGT-I. Ambas subunidades están compuestas mayormente por hélices α que dan lugar a una disposición característica en forma de media luna que envuelve a la subunidad β , con forma de barril o tonel con una grieta donde se localiza el sitio de unión a FPP y cuya profundidad determina la preferencia de dicha enzima para unirse a FPP y no a GGPP, en función de la longitud de estas moléculas. Igualmente, el sitio de unión con la proteína se localiza en la subunidad β , concretamente en la corona del barril cerca de la interfaz entre las dos subunidades.

La familia de geranylgeranyltransferasas está compuesta por dos tipos de enzimas, la PGGT GGT tipo I y la RGGT o GGT tipo II. La GGT-I es un heterodímero y está ampliamente relacionada con la FT, tanto a nivel estructural ya que comparten la subunidad α , como funcionalmente. En cuanto a la función, cataliza la misma reacción de incorporación de isoprenoides a restos de cisteína de proteínas con dominio CAAX, sólo que en este caso se trata de GGPP y no de FPP. Esto viene determinado, como se ha expuesto anteriormente, por el tipo de aminoácido terminal (X) [790]. Sin embargo, la GGT-II es diferente. El heterodímero en cuestión se caracteriza por una subunidad β que constituye el sitio de unión a la molécula lipídica en forma de barril, similar a la FT; mientras que la subunidad α está formada por un dominio helicoidal similar al de FT, y dos dominios con una función desconocida, un dominio rico en leucina y un dominio de tipo inmunoglobulina [791]. Aunque en un principio se pensó que Rab era el único sustrato para GGT, lo cierto es que Rab no es suficiente para desencadenar la reacción catalizada por esta enzima, sino que es necesario la unión de una proteína llamada REP (Rab escort protein) y la consiguiente formación del complejo Rab:REP [792, 793]. La enzima presenta un lugar de unión a la molécula de GGPP, y cuando se produce esa unión incrementa la afinidad de la enzima para unirse al citado complejo proteico [794, 795]. La unión a dicho complejo da lugar a la incorporación de un resto de GGPP a la proteína Rab a través de un residuo de Cisteína en el extremo N-terminal [796], proceso que puede repetirse en el caso de un segundo resto de cisteína en la estructura proteica, aunque aún no se conoce si en esta segunda prenilación la enzima permanece unida a la proteína monoprenilada o se separa de ella para la siguiente incorporación.

4. Proteínas G: GTP-asas de pequeño tamaño molecular.

Las proteínas G constituyen uno de los principales sustratos de la prenilación. Su función biológica consiste en la transducción de señales

extracelulares hacia el medio intracelular. Como se ha mencionado anteriormente, estas proteínas G pueden clasificarse en dos grupos: proteínas G y GTP-etasas o proteínas G de pequeño tamaño molecular. Las primeras son heterotrimeros en los que la subunidad α se une al nucleótido de guanosina y son activadas mediante la unión de agonistas a receptores de tipo GPCR (receptor acoplado a proteína G), lo que da lugar a diversos segundos mensajeros como el calcio o el AMP cíclico [797-801]. Las proteínas G de pequeño tamaño molecular o "GTP-etasas" en cuya activación se va a llevar a cabo el intercambio de GDP a GTP con el control de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina o GEF. Aunque no son dos familias completamente independientes, ya que se ha demostrado que existe una interacción entre ellas.

La superfamilia de proteínas G de pequeño tamaño también recibe el nombre global de superfamilia Ras, debido a que dicha proteína Ras fue la primera en ser descubierta [802]. Todas ellas se caracterizan por un peso molecular comprendido entre 20 y 29 kDa y por la presencia de motivos de unión a GTP. Está formada por más de 50 miembros en los organismos eucariotas, y dentro de ellas existen 5 subfamilias: Ras/Rap, Rho/Rac, Rab, Sar1/ARF y Ran, con diferentes funciones celulares [803]. La familia Ras/Rap controla la diferenciación y la adquisición del fenotipo final; Rho/Rac, la morfogénesis y los procesos dinámicos relacionados con la actina y el microesqueleto (adhesión y migración celular); Rab, el tráfico vesicular y la expresión génica y liberación de mediadores en la respuesta inmune innata; Ran, la traslocación nuclear y el ensamblaje nuclear tras la mitosis; y Sar/Arf, la morfogénesis y la organización de los microtúbulos. A pesar de esta especificidad, en realidad existe una cierta redundancia en la función de esta familia proteica. Todas ellas actúan como "semáforos" en las vías de transducción de señales mediante el ciclo de intercambio entre las conformaciones unidas a GDP (inactivas) y a GTP (activas) [804-806]. De manera que en la conformación unida a GTP, las GTP-etasas son capaces de transducir señales mediante la unión a proteínas efectoras, afectando así diversos procesos como la regulación del microesqueleto, transporte vesicular, la división, diferenciación, migración y adhesión celular. La regulación de este ciclo se lleva a cabo por tres tipos de moléculas: los GDI (guanosine nucleotide dissociation inhibitor) son inhibidores que se mantienen unidos a las proteínas G en su conformación inactiva, es decir, unida a GDP, para evitar su activación y están regulados por otras proteínas, los GDF (GDP dissolution factor). Una vez que la proteína queda libre de la unión a GDI, son activados los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que catalizan la reacción del GDP a GTP lo que da lugar a la activación de la proteína G y así se ponen en marcha los mecanismos efectoras que se encuentran corriente abajo en la cascada de señalización. Por último, el ciclo debe volver a su estado inactivo, para lo que las GAP (GTP-etasas activating proteins) se unen a la GTP-eta aumentando así su capacidad enzimática para llevar a cabo la hidrólisis del GTP hasta GDP y la consiguiente liberación de un grupo fosfato [807-809]. En general, las GTPetasas suelen formar parte de diversas vías de

transducción de señales, y van a permitir la comunicación entre el medio extracelular y la célula, más concretamente el núcleo, dando lugar a la modificación de la expresión génica, como en el caso de la vía MEK.

5. Prenilación y patologías.

La prenilación y las proteínas moduladas por dicho proceso han sido relacionadas con diversas enfermedades humanas. En el cáncer, se ha observado una mutación en la familia Ras en un porcentaje del 10 al 20% del total de casos en humanos, dichas mutaciones se traducen en una estabilización de la proteína Ras, que se encuentra unida a GTP de forma constitutiva [810] y el estudio de ratones deficientes [811] en la enzima FT ha demostrado que las proteínas farnesiladas, aunque no participan en el inicio de la transformación celular maligna, sí lo hacen en la progresión y mantenimiento de los tumores. También existen varios GEF asociados con el cáncer en humanos. Así, se plantea el potencial uso de los inhibidores de la FT como fármacos anticancerígenos [812, 813] y se están realizando ensayos clínicos con inhibidores tanto de la FT como de GGT [9, 814]. Los resultados hasta el momento demuestran una alta potencia y una baja toxicidad, aunque no todos los tipos de cáncer responden de igual modo.

La prenilación es un proceso importante en enfermedades relacionadas con el hueso, tanto malignas como benignas, y esto queda demostrado con el uso terapéutico totalmente aceptado de los bisfosfonatos en la práctica clínica de varias de estas patologías [815]. Otras enfermedades en las que la prenilación podría ser importante son la phakomatosis pigmentovascularis y la enfermedad vascular. En el último caso, las estatinas constituyen un grupo terapéutico en el que la inhibición de la prenilación podría contribuir de forma indirecta al efecto beneficioso de las mismas sobre función endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación a nivel cardiovascular, aunque hasta el momento no se conoce completamente si dichos efectos, pueden ser independientes de la reducción en la producción de colesterol o no. Todo apunta, no obstante, a la existencia de efectos derivados de la inhibición de la prenilación que no están relacionados con la reducción en los niveles de colesterol. Asimismo, las estatinas son agentes prometedores en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

6. Fármacos que inhiben la prenilación.

La implicación de la prenilación y de las moléculas preniladas en procesos celulares y moleculares fundamentales sustenta la propuesta de la modulación de la misma como diana terapéutica relevante. La inhibición de la prenilación se puede realizar a diferentes niveles, actuando en distintos puntos en la ruta de síntesis de los restos isoprenoides o bien en la propia reacción de prenilación. Según esto, existen varios grupos de sustancias que, por diversos mecanismos, pueden desencadenar una menor tasa de prenilación, lo que conlleva una reducción en la cantidad de proteínas preniladas y, en ciertos casos, un acúmulo de los sustratos de la reacción de prenilación o de otras moléculas que se

encuentran al principio de la ruta biosintética. Entre estos agentes se encuentran las estatinas, los bisfosfonatos, y los inhibidores específicos de la prenilación, el FTI-277 (inhibidor de la farnesil transferasa) y el GGTI-298 (inhibidor de la geranylgeranyl transferasa).

6.1. Estatinas.

Las estatinas son fármacos empleados en el tratamiento de los trastornos metabólicos que dan lugar a niveles elevados de lípidos, y por tanto, en la farmacología cardiovascular [816, 817]. La reducción de los niveles plasmáticos de colesterol se consigue mediante un doble mecanismo: por un lado, las estatinas inhiben la enzima HMGCoA-reductasa, limitante en la vía biosintética del colesterol (vía del mevalonato) y por tanto, disminuyen su síntesis; como consecuencia, por un mecanismo de regulación del colesterol, se aumenta la expresión de los receptores de membrana para el colesterol-LDL, lo que supone una mayor captación de LDL hacia el interior de la célula y, por tanto, una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol. Además, como consecuencia de dicho mecanismo, también se va a inhibir la síntesis de productos isoprenoides, como el FPP o el GGPP, cuya síntesis tiene lugar en pasos intermedios dentro de la vía del mevalonato y que son claves en el proceso de prenilación de proteínas, [818]. La inhibición de este mecanismo postranscripcional va a afectar fundamentalmente a las proteínas GTP-asas de pequeño tamaño molecular, como la familia Rho o Ras, afectándose así diversos procesos a nivel de la pared vascular [819-822], pero también en leucocitos [823] y en el hueso [824].

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de otros efectos ejercidos por las estatinas que son independientes de la modificación en los niveles de colesterol, y que pueden contribuir a la reducción en el número de eventos coronarios. Estos efectos no relacionados con la modificación del perfil lipídico de las estatinas se deben a la acción de dichas sustancias sobre el endotelio vascular y las células de músculo liso [825-827], así como los monocitos-macrófagos [828-831]. Dado la importancia del componente inflamatorio en la enfermedad cardiovascular, el carácter inmunomodulador de las estatinas es uno de los más relevantes para el desarrollo del efecto beneficioso de las mismas a este nivel [7].

Relacionado con su carácter inmunomodulador, en los últimos años se ha estudiado el efecto beneficioso de las estatinas en diversos modelos experimentales de EII. En estudios *in vivo*, algunas estatinas mejoran la colitis inducida por sulfato de dextrano sódico en ratón, como la simvastatina y atorvastatina [2, 832], la rosuvastatina [4] o la pravastatina [6]; de igual forma, ha sido demostrado su efecto beneficioso en el modelo de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico, como en el caso de la simvastatina [3], o en menor medida, la fluvastatina [5], o en ratas sometidas a inflamación colónica por ácido acético, en el caso de la pravastatina [1]. Más allá de los efectos

inmunomoduladores relacionados con la fisiología cardiovascular anteriormente expuestos, los resultados *in vitro* demuestran la capacidad de inhibición de la simvastatina sobre el NFκB en células epiteliales intestinales, lo cual da lugar a una modulación de la producción de quimioquinas como la IL-8 [2], o la inducción de apoptosis [833]. Un estudio muy reciente demuestra la capacidad de la simvastatina y de los inhibidores de la geranilgeranilación para inhibir la diferenciación de células Th17, y aumentar la cantidad de células reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ [834]. Por otro lado, todos estos efectos pueden explicar el carácter protector de ciertas estatinas como la pitavastina, fluvastatina y simvastatina en diversos modelos experimentales de cáncer de colon en ratón [833, 835, 836].

6.2. FTI-277 y GGTI-298.

Estas moléculas sintéticas han sido diseñadas como inhibidores específicos del proceso de prenilación, debido a la relevancia biológica del mismo. Su mecanismo consiste en la inhibición de las dos principales reacciones de prenilación. Así, el FTI-277 es capaz de inhibir la incorporación de restos FPP catalizada por la enzima FT, mientras que las reacciones llevadas a cabo por las GGT-I y II van a ser bloqueadas por el GGTI-298. En la actualidad, ambas moléculas se encuentran en fase de investigación preclínica.

La inhibición de la farnesilación se constituye como una diana terapéutica en el cáncer, ya que las proteínas Ras son sustratos de la enzima FT, y el papel de dichas proteínas en el desarrollo de cáncer ha sido científicamente avalado en los últimos años. En la actualidad, los FTI se encuentran en un estadio de investigación preclínica en fase III, con el fin de evaluar su posible utilización como anticancerosos. En un primer momento se ensayaron moléculas que pudieran competir con la proteína para unirse a la enzima, como tetrapéptidos conteniendo la región CAAX [837-839], aunque fueron reemplazados por péptidos en los que la porción alifática de la región CAAX era sustituida por benzodiazepinas o ácido aminometilbenzoico [840-842]. Otros FTI fueron diseñados para competir con el FPP [843-845]. Posteriormente, otras sustancias han sido obtenidas mediante *screening* molecular y posterior optimización de la estructura. Entre los FTI se encuentran el lonafarnib (SCH 66336) [846, 847], tipifarnib (R115777) [848], BMS-214662 [849], L-778,123 [850], FTI-277 y L744832 [851, 852]. En definitiva, los FTI pueden ser clasificados en tres grandes grupos, los que compiten con FPP, con la región CAAX de la proteína o los que lo hacen con los dos de forma simultánea (bisustratos); mientras que el segundo grupo puede ser subclasificado en péptidomiméticos o no peptidomiméticos. Estos compuestos se encuentran en diversos estadios de la investigación preclínica, fase I, II o III.

Las mutaciones del gen de Ras que se asocian al cáncer provocan una constante activación de la proteína que desencadena una proliferación incontrolada. El mecanismo de acción de los FTI como anticancerosos se basa en la inhibición de la farnesilación de las proteínas Ras, lo que implica un bloqueo

de la vía de transducción de señal y por tanto un bloqueo en el crecimiento celular [812, 853, 854]. Los resultados preclínicos demuestran que los FTI son capaces de inhibir el crecimiento de tumores [855, 856] y pueden desencadenar la activación de la apoptosis cuando se combinan con otra señal secundaria [857]. Por otro lado, la asociación de FTI con diversos agentes quimioterápicos supone una mayor inhibición del crecimiento celular y una potenciación de la respuesta apoptótica [858, 859]; además, los FTI permiten un aumento en la sensibilidad a la radioterapia [860]. Los datos de la investigación clínica son prometedores en cuanto al uso de los FTI como tratamiento único en las alteraciones malignas hematológicas, como leucemia aguda o crónica, o síndrome mielodisplástico [861]. Sin embargo, la aplicación como agentes únicos en el caso de tumores sólidos no está totalmente aceptada, existiendo datos interesantes sólo en el caso del tipifarnib en el tratamiento del cáncer de mama [862]. En cambio, los estudios basados en la asociación de los FTI con otros anticancerígenos apoyan el empleo de estas sustancias incluso en el tratamiento de tumores sólidos, siendo especialmente importante la asociación con taxanos o antiestrógenos.

De forma más tardía se han sintetizado inhibidores específicos de la enzima geranilgeraniltransferasa. Estas moléculas sintéticas son peptidomiméticos de tipo CVLL, de forma que compitan con los péptidos susceptibles de sufrir la geranilgeranilación (región CAAX, siendo X un resto de leucina) por la unión a la enzima GGT-I. Éste es el caso de GGTI-298 o GGTI-2154 [863, 864]. Al igual que los FTI, los GGTI son capaces de detener el ciclo celular de células tumorales humanas en la fase G1 [865, 866] y esta capacidad está relacionada con sus propiedades anticancerígenas.

6.3. Bisfosfonatos nitrogenados.

Estos derivados del pirofosfato actúan en un paso intermedio en el proceso de prenilación, ya que son inhibidores de la farnesildifosfato sintasa (FPPS), es decir, en la ruta del mevalonato son capaces de inhibir la síntesis de restos isoprenoides que serían empleados después por las transferasas en la reacción de prenilación propiamente dicha. A diferencia de los bisfosfonatos clásicos, cuentan con un átomo de nitrógeno en su estructura, y esto determina su mecanismo de acción único, basado en la inhibición de la prenilación y no en la inhibición de la apoptosis de osteoclastos. Su utilidad clínica en la inhibición de la resorción ósea está completamente aceptada, y se emplean ampliamente en diversas enfermedades relacionadas con el hueso. La posibilidad de un efecto inmunomodulador de dichas sustancias están siendo estudiada en la actualidad.

7. Prenilación e inflamación.

Como se ha expuesto anteriormente, muchos de los efectos desencadenados por las estatinas son de tipo antiinflamatorio y se relacionan con la inhibición de la prenilación, y por tanto, son independientes de la modificación en los niveles de colesterol. Estos efectos van a afectar de forma preferente al endotelio,

aunque recientemente se ha propuesto efectos antiinflamatorios que pueden ser útiles en otras patologías, como en el caso de la EII. A partir de los resultados obtenidos con las estatinas en diversos modelos inflamatorios, la relación entre la inhibición de la prenilación y la inflamación está siendo intensamente investigada en la actualidad.

Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la geranilgeranilación y la farnesilación da lugar a efectos antiinflamatorios, demostrando la relación entre la prenilación de proteínas y la respuesta inflamatoria. Así, el GGTI-243 es útil en un modelo murino de asma alérgico, provocando una menor infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias [867]. Las GTP-asas de pequeño tamaño de la familia Rho tienen importantes funciones en la migración celular y la regulación del citoesquelético y procesos dinámicos relacionados con la actina, y por tanto, en el tráfico de linfocitos. Estas proteínas sufren normalmente el proceso de geranilación, por lo que la inhibición del mismo puede dar lugar a un bloqueo de la migración de linfocitos, explicando así el efecto antiinflamatorio [868, 869]. Otros datos muestran un efecto proinflamatorio de los GGTI, de manera que el incremento en la producción de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con deficiencia en la kinasa de mevalonato (MKD) se debe fundamentalmente a una inhibición de la geranilación y no a un acúmulo de ácido mevalónico [870], así como en experimentos *in vitro* [871]. La geranilación, pero no la farnesilación, promueve la diferenciación de linfocitos hacia el subtipo Th17 e inhibe parcialmente el desarrollo de linfocitos T reguladores mediante la inhibición de la expresión de SOCS3 [834].

Al igual que en el caso de los GGTI, los estudios realizados con los FTI han demostrado la asociación de la farnesilación con la respuesta inflamatoria. La inhibición de la farnesilación de Ras llevada a cabo por la manumicina provoca una mejora en el daño hepático inducido por acetaminofeno en ratones [872]. Un mecanismo implicado en el carácter antiinflamatorio de los FTI puede estar relacionado con las proteínas Ras, que sufren el proceso de farnesilación. La proteína RET/PTC3 es una oncoproteína cuya activación se produce a través de proteínas Ras dando lugar a la producción de citoquinas. La inhibición de la señalización desencadenada por esta proteína como consecuencia de la inhibición de la farnesilación de Ras puede dar lugar a un efecto antiinflamatorio [873]. El tipifarnib inhibe la producción de citoquinas como IL-6 o IL-1 β y quimioquinas como MCP-1 en modelos celulares de células mononucleares, así como en un modelo *in vivo* de inflamación inducida por LPS por un mecanismo relacionado con la inhibición de NF κ B tras la activación de TLR4 [874]. Esta inhibición de NF κ B también se ha puesto de manifiesto en otros estudios, tanto en modelos de inflamación como en modelos de cáncer [8]. Junto a NF κ B, la activación de MAPk también es dependiente de la farnesilación en el caso de monocitos [875].

III. Bisfosfonatos.

1. Generalidades.

Los bisfosfonatos son un grupo de fármacos que se utilizan en la práctica clínica por su capacidad antirresortiva o de inhibición de la resorción ósea, debido a su actuación sobre los osteoclastos. Esta acción es en parte debida a una unión selectiva de dichas moléculas al hueso derivada de su estructura química.

Aunque los BP fueron sintetizados por primera vez en el siglo XIX y utilizados en diversos procesos industriales, no fueron empleados en medicina hasta la década de los 60. La confirmación de la capacidad de los compuestos de pirofosfato inorgánico para inhibir la mineralización al unirse a cristales de hidroxapatita [876, 877] dio lugar a la búsqueda de compuestos relacionados con la misma acción, pero con mayor estabilidad. Entre los compuestos ensayados, los BP demostraron su afinidad por la matriz ósea [878], así como su capacidad de prevención de la calcificación *in vitro* e *in vivo*, incluso cuando se administran por vía oral, lo que demuestra su mayor estabilidad [879, 880]. En 1969 Fleisch y Francis publican dos estudios en los que se demuestra por primera vez la capacidad de los bisfosfonatos como inhibidores de la disolución de cristales de hidroxapatita [881, 882], al igual que el pirofosfato [883]. Consecuentemente, se comprobó la capacidad antirresortiva de los BP, que se pone de manifiesto en cultivos de hueso *in vitro*, así como *in vivo* en modelos experimentales en animales con unas condiciones óseas normales o con un aumento en la resorción ósea [884-886]. A partir de este momento aumenta considerablemente el estudio de las propiedades farmacológicas y el uso terapéutico de los bisfosfonatos en situaciones patológicas relacionadas con la estructura y la resorción ósea. Así, el primer trabajo clínico se realiza en los años 70, centrado en el empleo del etidronato en diversos trastornos o desórdenes de la calcificación como la miositis osificante progresiva y la enfermedad de Paget [887, 888]. Debido a su gran capacidad de unión al hueso y por tanto su potencial como detector de trastornos óseos, durante esa década se usan los bisfosfonatos en oncología su seguimiento y detección, en el tratamiento y prevención de complicaciones óseas derivadas de procesos cancerígenos, como el mieloma o el cáncer de hueso. La aplicación a partir de la década de los 90 en la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas se justifica por la capacidad de dichos compuestos para disminuir el recambio óseo, con el consiguiente aumento de la densidad mineral del hueso y la reducción del riesgo de fracturas [889-892]. Han sido también empleados en otros tipos de trastornos óseos como la osteoporosis inducida por el tratamiento con glucocorticoides, la osteoporosis masculina y la osteogénesis imperfecta en niños.

2. Estructura química y clasificación.

Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato inorgánico en los que el oxígeno que une los dos grupos fosfonatos se sustituye por un carbono (P-C-P),

lo que les confiere una mayor estabilidad que en el propio pirofosfato, siendo incluso resistentes a la degradación biológica y enzimática. Esta estabilidad hace que los bisfosfonatos no sean metabolizados cuando son administrados por vía oral, y se excretan sin modificación alguna. Esta estructura basada en dos grupos fosfonatos es la responsable de dos características básicas de este grupo de moléculas: la unión al hueso y la capacidad antirresortiva, ya que las alteraciones del núcleo P-C-P no sólo modifican la capacidad de unión a la superficie mineral, sino también la capacidad antirresortiva, aunque es cierto que la modificación de esta última puede ser una consecuencia de una menor fijación del compuesto al hueso. A este núcleo estructural se unen dos sustituyentes a través del átomo de carbono, R_1 y R_2 (Fig. X). La sustitución de R_1 por un grupo hidroxilo o un grupo amino, mejora las características de unión de la molécula al hueso, en comparación a un grupo halógeno, como en el caso del clodronato. Por su parte, la complejidad química en R_2 aumenta la potencia antirresortiva del compuesto, siendo los derivados nitrogenados en R_2 más potentes que los que carecen de este grupo amino [893]. Además, dentro de los compuestos nitrogenados, aquellos que presentan una estructura heterocíclica en R_2 son más potentes que los que sólo presentan una cadena hidrocarbonada nitrogenada [894, 895]. En el caso de R_2 existe la posibilidad de una conformación tridimensional específica que permite la formación de puentes con el calcio del hueso del tipo N-H-O en la superficie de HAP además de los puentes P-C-P y al OH en R_1 , lo que favorece dicha capacidad de unión. Esto sucede en el caso del alendronato, cuya conformación tridimensional permite el establecimiento de dichos puentes de unión con otros átomos de calcio, lo que le confiere una habilidad superior a otras moléculas como el risedronato, que deberían ser superiores en este sentido, debido a la mayor complejidad en el sustituyente en R_2 . Este tipo de conformación también se produce en el caso del zoledronato. Así, la estructura con una máxima potencia antirresortiva está constituida por el núcleo P-C-P, un sustituyente de tipo hidroxilo en la cadena R_1 y un grupo amino en R_2 (en la mayoría de los casos, heterocíclico) en el que el átomo de nitrógeno guarda una distancia concreta con P-C-P, lo que implica una configuración espacial específica [896].

Según las diferencias en esta estructura química, los bisfosfonatos han sido clasificados en dos grupos o familias principales: los bisfosfonatos clásicos o no nitrogenados (etidronato, clodronato o tiludronato), con una capacidad antirresortiva menor; y los bisfosfonatos nitrogenados, que muestran una mayor potencia a nivel de los osteoclastos. Este último grupo puede ser dividido a su vez en alquil-amino bisfosfonatos (pamidronato, alendronato, neridronato, olpadronato e ibandronato) y bisfosfonatos nitrogenados heterocíclicos (risedronato y zoledronato), cuya potencia se ve incrementada con respecto a los anteriores, debido a la mayor complejidad en la sustitución de R_2 . Aunque existen excepciones en cuanto al orden de potencia antirresortiva si se comparan los distintos grupos, como se ha expuesto anteriormente, de una configuración espacial que incremente la potencia del compuesto.

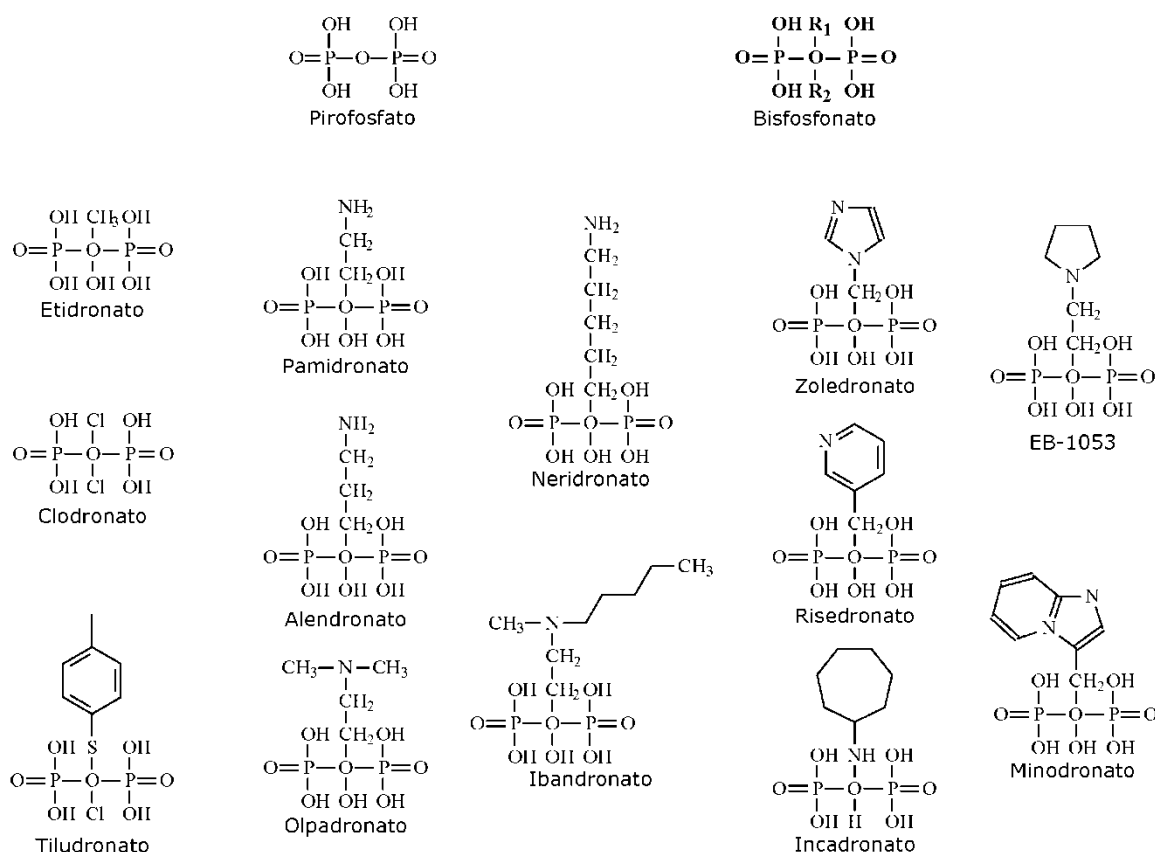


Figure 10: Estructura química de bisfosfonatos derivada del pirofosfato.

3. Mecanismo de acción.

Un aspecto fundamental del mecanismo de acción de los bisfosfonatos es la capacidad de unión de los mismos a la matriz ósea, lo que conlleva un contacto intenso con los osteoclastos. Aunque en un principio se defendió la idea de que dicha capacidad se debía únicamente a la estructura básica P-C-P y a la contribución de un grupo OH en R₁, las diferencias entre las diversas moléculas del grupo demuestran que no es así, ya que todas ellas comparten dicho núcleo estructural [897]. Así, la sustitución, tanto en R₁ como en R₂, puede modificar dicha capacidad de unión a la hidroxiapatita. Junto a estas características químicas o estructurales, las propiedades físico-químicas de los bisfosfonatos pueden modificar la capacidad de unión al hueso, dando lugar a modificaciones en la cinética de adsorción, fundamentalmente en los niveles de saturación. Entre estas propiedades se encuentran la carga molecular y la variación del potencial zeta que la unión del bisfosfonato provoca en la superficie mineral, o la tensión superficial.

En cuanto al mecanismo de acción, la selectividad de los bisfosfonatos por los osteoclastos y la actividad endocítica de estos permite la acumulación en el hueso. En el proceso de resorción ósea, se activa una bomba de protones en la membrana de los osteoclastos que hace que se produzca una acidificación en el espacio subcelular del osteoclasto [898], lo que conlleva la disolución de los

cristales de HAP. A su vez, esa caída en el pH permite la liberación del bisfosfonato de la superficie ósea a la que está unida, de manera que los osteoclastos se encuentran expuestos a una elevada concentración del compuesto. Hoy día se considera que las acciones de los bisfosfonatos sobre los osteoclastos se deben a fenómenos intracelulares, que van a provocar modificaciones en el reclutamiento, proliferación, actividad resortiva y muerte celular programada de estas células. Además de actuar sobre osteoclastos maduros induciendo la apoptosis y reduciendo así el número de ellos [899-901], los BP van a prevenir la formación de osteoclastos [902-904]. Por otro lado, no sólo afectan a la biología de los osteoclastos, sino que estas sustancias también inducen la apoptosis en macrófagos, como se muestra en estudios en líneas celulares murinas y humanas [905-908]. Un punto controvertido es la acción de los bisfosfonatos sobre los osteoblastos, que van a ser activados tras la exposición a concentraciones nanomolares de bisfosfonatos, produciendo factores inhibidores de los osteoclastos [909-912].

Las moléculas deben introducirse en el osteoclasto mediante un proceso de endocitosis en fase fluida [913], localizándose a continuación en vesículas a partir de las cuales serán movilizados hacia el citosol, a través de la acidificación de dichas vesículas [914]. Como consecuencia, estas células sufren una serie de modificaciones morfológicas, como la desaparición del borde plegado o las alteraciones en el citoesqueleto. Una vez dentro del osteoclasto, los bisfosfonatos van a actuar según dos procedimientos principales. Por un lado, las moléculas no nitrogenadas van a promover la inducción de la apoptosis de los osteoclastos mediante el acúmulo de un metabolito tóxico (nucleótido del tipo App-Cp) como consecuencia de la actuación de la enzima aminoacil-t-RNA sintetasa, que permite que los bisfosfonatos sean incorporados a análogos no hidrolizables del ATP. Estos metabolitos tóxicos van a modificar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, dando lugar a la activación de caspasas y a la consecuente muerte celular programada [915, 916]. Por otro lado, la actuación de los bisfosfonatos nitrogenados sobre la vía del mevalonato es la responsable de su capacidad antirresortiva. Estas moléculas van a actuar como sustratos análogos de los bifosfatos isoprenoides, produciendo la inhibición de la enzima peroxisómica farnesil difosfato sintasa (FPPS), que es la responsable de la síntesis del farnesil difosfato que, a su vez, es el sustrato para la síntesis de geranylgeranyl bifostato. Ambos isoprenoides participan en la prenilación de las GTPasas de pequeño tamaño molecular, que como ya hemos expuesto anteriormente modula la funcionalidad de las mismas en el osteoclasto. Asimismo, dicho mecanismo de acción conlleva el acúmulo de proteínas no preniladas, así como de IPP, precursor del FPP; lo cual puede estar implicado en el mecanismo de acción de la inhibición de la resorción ósea y en la aparición de efectos adversos de los bisfosfonatos, respectivamente. De esta forma, la acumulación de IPP parece ser la causa de la reacción de fase aguda que provocan los bisfosfonatos nitrogenados cuando se administran por vía intravenosa, y que es un efecto adverso típico de dichos fármacos. Esta reacción

da lugar a la aparición de fiebre y de síntomas gripales. El mecanismo de este fenómeno, que suele ser transitorio, se debe a la inhibición de la FPPS a nivel de células mononucleares en el torrente circulatorio, fundamentalmente monocitos que da lugar al acúmulo de IPP. Éste, por un mecanismo desconocido aún de presentación, se une a un receptor que se expresa en linfocitos T γ - δ humanos, provocando su activación, la liberación de TNF- α y la reacción aguda en cuestión.

De forma similar a lo que ocurre en el caso de los bisfosfonatos clásicos, las moléculas nitrogenadas pueden causar la apoptosis de osteoclastos, pero de forma secundaria a la inhibición de la prenilación. Así, el bloqueo de la funcionalidad de la FPPS da lugar a acúmulo de IPP, que puede condensarse con AMP para dar lugar al metabolito tóxico Apppl, que actuará igualmente a nivel de la membrana mitocondrial provocando la activación de la cascada de caspasas y la consiguiente apoptosis.

Además de su conocido y bien caracterizado efecto sobre los osteoclastos, los bisfosfonatos pueden actuar sobre otras células relacionadas con el sistema óseo. Así, el uso de bajas concentraciones de bisfosfonatos inhibe la apoptosis de osteocitos [917] por un mecanismo en el que se produce la apertura de los hemicanales de conexina 43, lo que provoca la activación de ERK [918]. Este efecto sobre osteocitos es independiente en términos de potencia de la acción sobre osteoclastos, y podría explicar parcialmente la eficacia antifractura de estos fármacos. En contraposición, el efecto de los bisfosfonatos sobre osteoblastos aún no se ha demostrado de forma evidente. Se cree que la posible activación de osteoblastos mediada por los bisfosfonatos [919] se debe a acciones indirectas sobre el ciclo de remodelado por la inhibición de la resorción ósea.

El objetivo en el empleo de los bisfosfonatos en la inhibición de la resorción ósea es la obtención de nuevos fármacos con una mayor potencia y una menor capacidad de inhibición de la mineralización debido a su unión a la superficie ósea mineral [897]. Desde el etidronato hasta el zoledronato, el avance en este sentido ha sido espectacular, con una mejora notable en el índice terapéutico de este grupo de fármacos. Se han llevado a cabo estudios de capacidad antirresortiva de las diferentes moléculas en varias especies animales (ratón, conejo, perro, cerdo, oveja y mono) y utilizando diversos modelos animales. Estos experimentos han permitido establecer un principio importante en la farmacología de los bisfosfonatos: el principio de la dosis total [920, 921], por el que es especialmente importante la dosis total administrada del fármaco y no lo es tanto el establecimiento de un régimen estricto de dosificación. Los primeros ensayos en humanos destinados a validar este principio se están desarrollando con resultados prometedores, permitiendo en algunos casos la administración semanal o incluso mensual del tratamiento. Uno de los riesgos del tratamiento con estos fármacos es su acumulación en el hueso y la posibilidad de reducción del metabolismo óseo debido a tratamientos prolongados, como ocurre en este

tipo de enfermedades. Aunque este fenómeno se ha observado tanto en animales como en humanos [922], las dosis necesarias para que se produzca son muy elevadas, muy por encima de las que se utilizan hoy en día en terapéutica, por lo que el riesgo en este sentido es pequeño.

4. Farmacocinética y características farmacológicas.

El comportamiento farmacocinético de los BP se caracteriza por una absorción intestinal reducida, en torno al 1-4%, y una migración hacia el hueso. Junto a la adsorción selectiva de los bisfosfonatos a la superficie mineral del hueso, otro aspecto importante de estas sustancias es la retención en dicha estructura, siendo ésta mayor en pacientes con enfermedades en las que la tasa de recambio óseo está aumentada. De este modo, se considera que de la cantidad absorbida de un determinado bisfosfonato, dos tercios van a ser captados y retenidos en el hueso, mientras que el otro tercio se eliminará sin ser metabolizado a través de la orina. Esta eliminación urinaria puede verse modificada obviamente por afectación de la función renal, pero también por la capacidad de los bisfosfonatos para unirse a proteínas específicas, como la fetuina [923, 924]. La vida media de eliminación de estos fármacos nunca coincide con la duración de sus efectos, debido a la retención de los mismos a nivel óseo, que puede prolongarse y además depende de procesos como el remodelado y la resorción [913]. Por otro lado, una vez que termina la administración del fármaco, la cantidad acumulada en el hueso pasará al torrente circulatorio para ser excretada, y en ese proceso puede ser re-captada por el hueso y prolongar así aún más su permanencia en el organismo [925, 926]. La liberación del bisfosfonato del hueso se realiza mediante dos procesos: desorción química, cuando la cantidad de bisfosfonato en los fluidos que rodean a la superficie mineral en la que éste se haya secuestrado es baja; y resorción osteoclástica, siendo la unión del fármaco a la HPA un proceso fisicoquímico reversible [897].

Una característica clínica que permite una diferenciación entre los distintos bisfosfonatos es la capacidad para reducir el riesgo de fracturas óseas, lo cual es fundamental en el tratamiento de pacientes osteoporóticos. Esta habilidad depende del tipo de hueso, existiendo diferencias importantes entre huesos no vertebrales y vértebras entre las distintas moléculas; así como el tiempo necesario para la aparición de dicho efecto. Otro aspecto importante es la modificación de la densidad mineral ósea, que se debe básicamente a dos procesos: el rellenado de los espacios de remodelado en un primer momento y de forma rápida y, más lentamente, la supresión del recambio óseo.

Los bisfosfonatos usados en clínica hasta el momento pueden ser clasificados de menor a mayor en términos de potencia, según su:

- Afinidad mineral: clodronato, etidronato, risedronato, ibandronato, alendronato, pamidronato y zoledronato.

- Inhibición de la enzima FPPS: etidronato, clodronato, pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato y zoledronato.
- Efecto de la unión del bisfosfonato a la hidroxiapatita en la carga superficial (potencial zeta): risedronato, clodronato, etidronato, zoledronato, ibandronato y alendronato.

5. Aplicaciones terapéuticas.

Los bisfosfonatos fueron los primeros fármacos en los que se demostró una actividad inhibidora de la resorción ósea, y por ello han sido y continúan siendo empleados en diversas enfermedades que se caracterizan por un actividad resorptiva excesiva, como la enfermedad de Paget, la enfermedad ósea metastásica u osteolítica, la hipercalcemia derivada de procesos malignos o la osteoporosis. Los bisfosfonatos que han sido autorizados para el uso clínico son etidronato, clodronato, tiludronato, pamidronato, alendronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, olpadronato y neridronato.

El etidronato, el primer BP sintetizado con una estructura no nitrogenada que favorece la inhibición de la mineralización frente a la acción antiresorptiva, se usa pues como inhibidor de la calcificación en casos de FOP (fibrodisplasia osificante progresiva o miositis osificante) o para evitar calcificaciones ectópicas como en la sustitución completa de la cadera, o después del daño de la médula espinal. Las dosis utilizadas de etidronato para este tipo de aplicaciones son muy elevadas y nunca coinciden con las que se emplean en el caso de osteoporosis.

La capacidad de unión de los bisfosfonatos a la superficie mineral ósea determina su utilización en medicina en la detección de metástasis y lesiones óseas, es decir, como marcador óseo en técnicas para obtener imágenes a través de radionúclidos [927].

La enfermedad de Paget se caracteriza por un exceso de osteoclastos, tanto en términos cuantitativos como de actividad, debido al menos aparentemente a una apoptosis defectuosa de estas células. En la patogénesis se habla de un componente genético, la mutación de secuestrosoma (SQSTM1) que participa en la vía de activación de NFκB [928], junto con un componente viral [929]. En cualquier caso, la capacidad de los bisfosfonatos para inducir la apoptosis de los osteoclastos explica su aplicación terapéutica en la Enfermedad de Paget, y de hecho esta entidad patológica fue la primera en la que se emplearon estos fármacos como inhibidores de la resorción ósea [930, 931]. Hoy en día los BP pueden ser considerados como el tratamiento de elección en esta enfermedad [932], y el pamidronato por vía intravenosa, empleado durante un largo periodo de tiempo [933], ha dado paso a otros bisfosfonatos más potentes como el risedronato o el zoledronato [934-936].

En el campo de la oncología los bisfosfonatos tienen una relevancia clínica importante. La liberación de determinados factores por parte de tumores da

lugar en muchos casos a hipercalcemia y destrucción del hueso. Los bisfosfonatos inhiben la resorción ósea y la destrucción ósea asociada a la existencia de tumores en modelos experimentales de cáncer [937]. Además, estos fármacos disminuyen el crecimiento de estos tumores por un mecanismo doble, un efecto indirecto por modificación de la liberación de factores de crecimiento al actuar sobre la matriz ósea [938, 939], y una acción directa sobre las células tumorales basada en la inducción de la apoptosis [940]; estos efectos podrían estar relacionados con la acción de los bisfosfonatos sobre la vía del mevalonato. La efectividad de este grupo farmacológico en los problemas óseos derivados de procesos malignos ha quedado demostrada [941], y es por esto por lo que se emplean en dichas situaciones clínicas [942-944]. Diversos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de los bisfosfonatos para reducir el número de SER (eventos relacionados con el esqueleto) en un amplio abanico de tipos de cáncer, como mieloma [945], mama [946, 947], próstata [948], pulmón, riñón y otros tumores sólidos. En oncología, los bisfosfonatos de elección son el zoledronato [949], pamidronato, clodronato e ibandronato [950, 951]. Este tratamiento supone incluso una mejora en la supervivencia [952-954]. El empleo de dosis elevadas puede conllevar la aparición de una complicación, la osteonecrosis de las articulaciones.

Por último, los bisfosfonatos constituyen el tratamiento más importante en la osteoporosis, en el que se emplean el etidronato [890, 955, 956], alendronato [889, 957, 958] y risedronato [891, 959]. En mujeres postmenopáusicas, los bisfosfonatos aumentan la masa ósea y disminuyen la tasa de fracturas [960], al mismo tiempo que incrementan la osteomineralización [961]. En pacientes con tratamiento basado en glucocorticoides, disminuyen la pérdida de hueso [962, 963]. En niños que sufren de osteogénesis imperfecta, aumentan la masa ósea [964, 965]. Las alternativas terapéuticas en el caso de la osteoporosis son la paratohormona, tratamiento anabolizante que administrado de forma intermitente aumenta la formación ósea y disminuye el índice de fracturas; la calcitonina, desplazada actualmente por los bisfosfonatos; el raloxifeno, modulador selectivo de los receptores estrogénicos, cuyo uso se limita a algunas mujeres en la posmenopausia inmediata; el ranelato de estroncio, con carácter antirresortivo pero también osteoformador, capaz de disminuir las fracturas osteoporóticas por un mecanismo desconocido; o el denosumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al ligando del receptor RANK (RANKL) que se encuentra aún en fase de investigación. Junto al tratamiento farmacológico principal, en la osteoporosis se utiliza calcio y vitamina D.

En la actualidad la investigación clínica en este campo se basa en la búsqueda de modificaciones del régimen terapéutico, como la administración intermitente, la utilización de la vía oral o la intravenosa, la duración del tratamiento, la combinación con otros fármacos, así como el uso extendido en el tiempo.

6. Bisfosfonatos e inflamación (Enfermedad Inflamatoria Intestinal).

Clásicamente los bisfosfonatos han sido clasificados, según la presencia o ausencia de nitrógeno en su estructura, en dos grupos: bisfosfonatos clásicos y moléculas nitrogenadas, con carácter proinflamatorio es tas últimas. Este carácter proinflamatorio se debe a la reacción de fase aguda que provocan los bisfosfonatos nitrogenados cuando son administrados por vía parenteral, y que no se observa ni en su administración por vía oral ni en el caso de bisfosfoantos no nitogenados [941, 966, 967]. Esta reacción se basa en la producción de citoquinas proinflamatorias, fundamentalmente IL-1, IL-6 y TNF- α y puede deberse a la activación de diferentes tipos celulares, como monocitos, macrófagos o linfocitos T γ/δ [968].

En la actualidad, la aplicación de los bisfosfonatos nitrogenados en la EII se basa únicamente en la capacidad antirresortiva de estos fármacos y en el tratamiento de la osteoporosis o las alteraciones óseas desencadenadas en esta patología o como consecuencia del tratamiento de la misma con glucocorticoides. Sin embargo, sólo ha sido descrito el efecto antiinflamatorio propiamente dicho del alendronato en el modelo de TNBS en rata [10]. Algunos estudios muestran la capacidad de los bisfosfonatos, por ejemplo ibandronato, para frenar el desarrollo de cáncer colorrectal asociado o secundario a CU [969].

I. Reactivos.

Todos los reactivos empleados, excepto aquéllos en los que se indique lo contrario, han sido suministrados por Sigma[®] (Madrid, España). Los bisfosfonatos fueron suministrados por Molekula[®], excepto en el caso del alendronato que fue empleado en el ensayo de colitis inducida en ratas por ácido trinitrobencenosulfónico, donde además se empleó una especialidad farmacéutica comercial (Fosamax[®], Merck). Según los datos suministrado por la empresa (Molekula[®]), la pureza de los bisfosfonatos es de 98,9% para alendronato, 98,7% para etidronato, 99,2% para ibandronato, 99,4% para pamidronato, 99,32% para risedronato, y 99,6% para zoledronato.

II. Experimentos *in vivo*.

1. Animales de experimentación.

En los experimentos *in vivo* así como *ex vivo*, se emplearon ratas Wistar hembras, con un peso medio comprendido entre los 175 y los 225 g, suministradas por Harlan Laboratories[®], Barcelona España. Dichos animales fueron mantenidos en jaulas de makrolon y sometidos a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Panlab A04, Panlab[®], Barcelona, España), y agua *ad libitum*. 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 EEUU.

2. Diseño experimental *in vivo*.

Se han llevado a cabo experimentos *in vivo* utilizando dos modelos de colitis diferentes, TNBS y DSS. En el caso del modelo de TNBS se han realizado dos tipos de tratamientos, por vía oral e intraperitoneal, incluyendo a los tres bisfosfonatos estudiados. La SAZ fue incluida como patrón al ser un fármaco

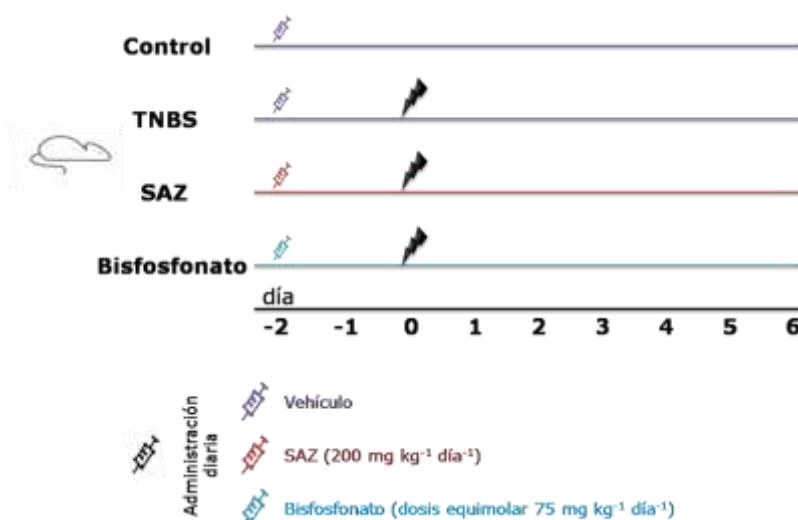


Figura 11: Diseño experimental en el modelo de colitis por TNBS.

empleado en la práctica clínica en la EII y se administró por vía oral. El DSS sólo fue utilizado como modelo secundario y sólo en el caso de las sustancias con carácter antiinflamatorio en el modelo de TNBS. Todos los experimentos fueron realizados al menos 2 veces con un $n=10$ en la mayor parte de los grupos experimentales.

Tras un período de aclimatación de 7 días, las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en los correspondientes grupos experimentales, existiendo en todos los casos un grupo no colítico o control y un grupo colítico (TNBS o DSS), en los modelos de colitis, junto con el grupo tratado con bisfosfonato (vía oral o vía intraperitoneal, según el caso). En ambos modelos de colitis, todos los grupos experimentales fueron sometidos a la inducción de colitis, excepto el grupo control. Además de los grupos citados, en el modelo de TNBS se utilizó la sulfasalazina administrada por vía oral como modelo de fármaco antiinflamatorio utilizado en la EII en humanos. La administración oral de los distintos tratamientos se realizó mediante sonda nasográstica, utilizando un volumen de administración de 1 ml por animal y por día; mientras que en el caso de la administración intraperitoneal, el volumen de inyección fue de 0,2 ml. Los vehículos utilizados para la administración oral e intraperitoneal fueron metilcelulosa al 1% (P.V⁻¹) y solución salina estéril, respectivamente. Estos vehículos fueron administrados igualmente a los grupos control y colítico (TNBS o DSS, según el caso). Se llevó a cabo un pretratamiento, en el que la administración de las sustancias a examinar comenzó dos días antes de la inducción de la colitis, que se indujo bien por administración de TNBS o por sustitución del agua de bebida por una solución de DSS. En el caso del modelo de TNBS, la administración de los fármacos se realizó durante 8 días, mientras que en el caso del DSS ésta se prolongó debido a las necesidades del modelo en cuestión hasta un total de 12 días. Las dosis administradas fueron calculadas por equivalencia entre los distintos bisfosfonatos en función del peso molecular, así se utilizaron $75 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el alendronato, $83 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el ibandronato, y $80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el pamidronato. En el caso de la Sulfasalazina, se utilizó una dosis de $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. El control diario del peso corporal y del estado general del animal, del consumo de agua y comida y del

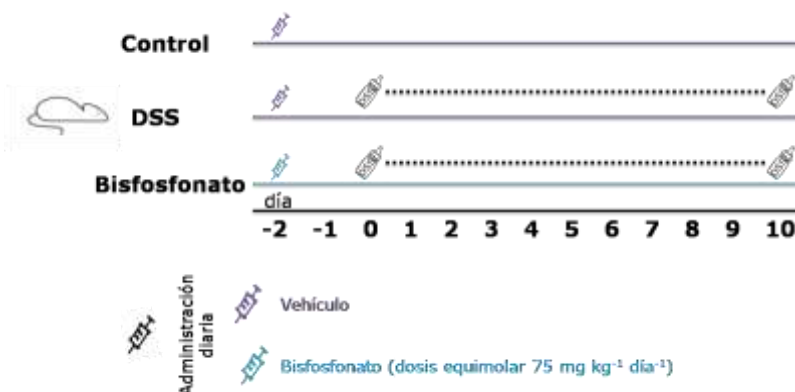


Figura 12: Diseño experimental en el modelo de colitis por DSS.

aspecto de las heces se realizó en todos los modelos empleados. El sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical.

3. Inducción de la colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico.

La colitis fue inducida mediante la administración intrarrectal de una solución de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en etanol al 50% (V V⁻¹). La cantidad administrada fue de 10 mg de TNBS por rata en un volumen de 0,25 ml. Para ello se sometió al animal a anestesia con halotano. La inducción de la colitis se llevó a cabo dos días después del comienzo del tratamiento de los animales con los bisfosfonatos. Durante el desarrollo del protocolo experimental, los consumos de agua y comida así como la modificación del peso corporal fueron registrados diariamente. El sacrificio de las ratas se realizó 6 días después de la inducción de [970]la colitis.

4. Inducción de colitis por sulfato de dextrano sódico (DSS).

La colitis se indujo mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) en el agua de bebida. Para ello se utilizó una concentración entre el 3 y el 5% (m V⁻¹) de DSS, según la evolución de los animales a lo largo del desarrollo experimental; en un principio se administró un 5% de DSS hasta que los animales mostraron signos de caquexia y diarrea (día 5), entonces se disminuyó hasta un 3% la concentración de DSS administrada. Se realizó igualmente un pretratamiento de dos días, es decir, la colitis se indujo dos días después del comienzo del tratamiento. Se llevó a cabo un control diario del peso corporal, del consumo de agua y comida y del estado general del animal, así como de la posible presencia de sangre en heces y de la consistencia de las mismas. Según estos parámetros se calculó un índice de actividad de la enfermedad (DAI), según fue descrito por Stucchi y colaboradores en 2000 [970]. El período de administración de DSS fue de 10 días, tras el cual los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

5. Tratamiento *in vivo* en animales sanos.

Tras el período de aclimatación, los animales de experimentación se distribuyeron en dos grupos experimentales, un grupo control y un grupo tratado con pamidronato (n=4, para cada grupo). Las ratas Wistar fueron tratadas diariamente por vía oral con la misma dosis de pamidronato empleada en los modelos de colitis (80 mg kg⁻¹ día⁻¹). También se empleó como vehículo metilcelulosa al 1%, que fue administrada al grupo control. Se llevaron a cabo tres experiencias diferentes, en las que dicha administración se realizó durante 3, 5 y 8 días, respectivamente. Se llevó a cabo un control diario del peso corporal y del consumo de agua y comida. Al final del tratamiento, tras el sacrificio de los animales, se obtuvieron diversos órganos del animal: colon, duodeno, íleon, hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos; así como una muestra sanguínea para la obtención del plasma. A partir de los tejidos anteriormente nombrados, se procedió a la extracción de proteínas (ver punto 2

del apartado F de esta sección). En el caso del bazo y de los ganglios linfáticos mesentéricos, se obtuvieron las células mononucleares según el protocolo que se describe más adelante (ver punto 3 del apartado D de esta sección), y se procedió a su conteo y cultivo para la determinación de la producción de citoquinas. Por otro lado, inmediatamente después del aislamiento de las células mononucleares (sin incubación), se aisló el contenido proteico de las mismas, para su posterior utilización en diversos ensayos de Western Blot, es decir, para el estudio de la expresión proteica (ver punto 3 del apartado F de esta sección).

6. Obtención de plasma sanguíneo.

La extracción de sangre se realizó en la bifurcación aorto-femoral en el momento del sacrificio. Se utilizó heparina como anticoagulante (5000 UI ml⁻¹). La sangre así obtenida fue sometida a una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C, para obtener así el plasma. Las muestras obtenidas fueron conservadas a -80° C hasta su posterior uso.

III. Estudio del tejido colónico.

1. Cuantificación del daño colónico.

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

Tabla 3: Cálculo del índice de daño macroscópico (IDM). Se incluyen hasta 7 parámetros con una puntuación comprendida entre 0 y 24.

Inmediatamente después de la muerte del animal, el colon fue extraído y se limpió para eliminar los restos de heces y de grasa adherida al mismo, y se mantuvo sobre una superficie refrigerada hasta su posterior congelación. Las muestras colónicas fueron pesadas, y la longitud fue determinada al someterlas a un peso constante de 2 g. El daño colónico macroscópico fue calculado basándonos en diversas características propias de la colitis: adhesiones, cicatrices, fragilidad, dilatación proximal, necrosis, deformación, obstrucción intestinal, hiperemia y fibrosis. Según éstos un observador ajeno al experimento estableció un índice de daño macroscópico con una escala comprendida entre 0 y 24 (Tabla 3). El colon fue dividido en cinco segmentos longitudinales para la determinación posterior de diversos parámetros; de igual modo, se obtuvieron dos segmentos transversales y adyacentes al daño que se emplearon para las pruebas histológicas y para la extracción de ARN respectivamente. Las muestras colónicas así obtenidas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso, a excepción de la muestra obtenida para el estudio histológico (protocolo descrito a continuación).

2. Histología.

Uno de los segmentos colónicos transversales obtenidos tras el sacrificio fue fijado utilizando para ello formaldehído al 4% (P.V⁻¹). A partir de estas muestras, se realizaron secciones de un grosor aproximado de 5 µm con el empleo de un micrótopo. Las secciones microscópicas fueron montadas en portas y sometidas a una tinción rutinaria con hematoxilina-eosina, para el estudio de la morfología y disposición del tejido colónico. La toma de imágenes se realizó con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos.

3. Determinación de la actividad mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina en colon.

Una muestra de colon fue homogenizada en un tampón que contenía Tris Base (50 mM) y HTAB al 0,5% (P.V⁻¹). Una vez centrifugado el homogenado, el sobrenadante resultante fue empleado para la determinación de actividades enzimáticas en colon. La determinación de la actividad mieloperoxidasa, como marcador de infiltración neutrofílica, se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico basado en el uso de o-dianisindina y H₂O₂, según describió Krawisz en 1984 [971], con mínimas modificaciones. Los resultados fueron expresados como Unidades (µmol.min⁻¹)/g de tejido húmedo. Igualmente, la actividad fosfatasa alcalina fue determinada usando para ello un método espectrofotométrico descrito por Sánchez de Medina y colaboradores en 2004 [972]. En dicho protocolo, el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima es el p-nitrofenilfosfato sódico. Los resultados se expresan en este caso como mUnidades/mg de proteína.

4. Análisis del transcriptoma colónico: extracción de ARN, hibridación del microarray y análisis de datos.

Este análisis se realizó en el modelo de colitis por TNBS, cuando el pamidronato se administró por vía oral. El ARN se extrajo mediante la homogenización de muestras de tejido colónico con Trizol reagent (Invitrogen, Barcelona, España) y purificación con columnas de afinidad "RNeasy" (Qiagen, Madrid, España). La cantidad e integridad del ARN fue determinada mediante a relación de la relación de absorbancia a 260/260 nm y electroforesis en gel de agarosa al 1% (P.V⁻¹), respectivamente. Los procedimientos de etiquetado de las muestras, hibridación, marcaje y escaneado fueron llevados a cabo mediante protocolos estándar de Affymetrix (www.affymetrix.com). El análisis del microarray fue realizado por Progenika Biopharma (Bilbao, España) utilizando 18 GeneChip Rat Expression Array 230 2.0 microchips (Affymetrix). En la normalización y el análisis estadístico se empleó el programa informático GeneSpring v7.1 (Agilent Technologies, Las Rozas, España). El análisis funcional de rutas bioquímicas fue llevado a cabo mediante los programas Ingenuity Pathway Analysis y GEDI software (<http://www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm>). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza seguido del test *a posteriori* de Tukey post-hoc test y la corrección de Benjamini y Hochberg, con el fin de disminuir la aparición de falsos positivos. Se han tenido en cuenta las recomendaciones MIAME [973] para poder disponer de forma detallada de la información necesaria para la comprensión, interpretación, reproducción y comparación de nuestros resultados. Los resultados se expresan como ratio de incremento con respecto al grupo control. En algunos casos, además se proporciona la ratio de incremento frente al grupo colítico o TNBS. A dichos datos se puede acceder a través de la base de datos de "European Bioinformatics Institute Arrayexpress" (<http://www.ebi.ac.uk>, reference E-MEXP-873).

IV. Experimentos *in vitro*.

1. Diseño experimental *in vitro*.

En todos los experimentos *in vitro*, excepto en aquéllos en los que se indica, se llevó a cabo el mismo protocolo experimental. Los bisfosfonatos y FTI-277 fueron disueltos en PBS estéril; mientras que en el caso de la mevalonina y el GGTI-298 se empleó dimetilsulfóxido (DMSO). En los casos en los que fue necesario, la cantidad de DMSO añadida a los distintos grupos experimentales fue igualada, utilizando como concentración máxima 1:1000 para dicho disolvente. Las concentraciones empleadas en la mayoría de los casos fueron 100 µM para los bisfosfonatos, 1 µM para FTI-277, 3 µM para GGTI-298 y 5 µM para mevalonina. En algunos experimentos se realizó un estudio del efecto de los bisfosfonatos en función de la concentración empleada, en cuyo caso además de la concentración de 100 µM, se utilizaron las de 10 y 1 µM. Los tratamientos

(bisfosfonatos y controles) fueron añadidos al cultivo una hora antes que el estímulo correspondiente. El tiempo de incubación depende del tipo celular, así como de la técnica a realizar, y por tanto, se especifica en cada caso.

2. Cultivo de líneas celulares de enterocitos.

Las tres líneas celulares de epitelio intestinal empleadas (Caco-2, HT29 e IEC18) fueron obtenidas del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada. En todos los casos se empleó como medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml] y estreptomycin [0,1 mg/ml]) y anfotericina B (2,5 µg/ml). Los diversos cultivos se mantuvieron en una atmósfera con el 5% de CO₂ y a 37° C. Las células fueron mantenidas en placas de 78 cm² hasta su confluencia. El medio de cultivo fue renovado cada 2-3 días. Los estímulos empleados fueron LPS (1 µg/ml) en el caso de IEC18 y HT29, mientras que la IL-1β (10 ng/ml) fue empleada para la estimulación de la línea celular Caco-2. El tiempo de estímulo fue diferente en función de la determinación a realizar. Así, en el caso de la expresión de IL-8 o COX2, así como de la inhibición de la prenilación, fue de 24 horas; mientras que en el estudio de las vías de transcripción, la exposición al estímulo fue sólo de 30 minutos.

3. Cultivos primarios de células mononucleares.

Tras el sacrificio de los animales, se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos que fueron dispuestos en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado con antibióticos (100 mg.l⁻¹ de estreptomycin, 100000 U.l⁻¹ de penicilina) y anfotericina B (2,5 mg.l⁻¹) como antifúngico. Una vez que se eliminó la grasa adherida a dichos órganos, éstos fueron presionados mecánicamente con ayuda de unas pinzas para la obtención de una suspensión celular. La lisis de los eritrocitos fue realizada durante 30 minutos a 4° C mediante una solución con una composición 0.15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, 0,1 mM de Na₂EDTA·2H₂O, pH=7,3. Las células mononucleares aisladas se dispusieron en un medio de cultivo completo, en este caso Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado con suero bovino fetal (10%), L-glutamina (2mM), antibióticos (1%: penicilina [100 U/ml], estreptomycin [0,1 mg/ml]) y anfotericina B (2,5 µg/ml) y 0,05 mM de β-mercaptoetanol. Tras el conteo celular, 0,5 millones de células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 1 millón de células/ml (determinación de citoquinas); o 15 millones de células en placas de 6 pocillos y una densidad celular de 5 millones de células/ml (expresión proteica o extracción de ARN). El cultivo se realizó durante 24 o 48 horas en un ambiente controlado a 37° C y con un 5% de CO₂ atmósfera, para la determinación de citoquinas y la expresión proteica y génica, respectivamente. La estimulación de las células obtenidas se realizó mediante la adición al cultivo de la lectina concanavalina A (5 µg/ml) o LPS (1 µg/ml). Las muestras obtenidas en los diversos experimentos, tanto

sobrenadantes como contenido proteico o ARN aislado, fueron mantenidas a -80°C hasta su utilización.

4. Purificación celular magnética.

Para la obtención de poblaciones purificadas de linfocitos T y macrófagos, se empleó el sistema de separación magnética en columnas (Miltenyi). Una vez obtenida la suspensión de células a separar siguiendo el procedimiento habitual (esplenocitos en este caso), esta suspensión fue filtrada utilizando un filtro de 70 μM (cell strainer BD Falcon™ Ref 352350), para obtener así una suspensión monocelular con la que poder proceder a la separación. A continuación se llevó a cabo una selección negativa sobre dichas células utilizando anticuerpos adecuados y posteriormente bolitas magnéticas marcadas correctamente para su unión a los anticuerpos utilizados en el paso anterior. En el caso de los linfocitos T, se utilizaron dos anticuerpos biotinilados, anti-CD11b (1:200) y anti-CD161.a (1:200), y un anticuerpo marcado con ficoeritrina (PE), el anti-CD45RA (1:200); mientras que en el caso de los macrófagos, el anticuerpo anti-CD11b fue sustituido por anti-CD3 biotinilado (1:150). Las bolitas magnéticas empleadas estaban marcadas con estreptavidina por un lado, y anti-PE, por el otro. Tras el marcaje, se procedió a pasar la muestra por la columna magnética LD (tipo de columna con una capacidad de hasta 500 millones de células totales y diseñadas para la selección negativa); la población enriquecida en linfocitos T o macrófagos, según el caso, es aquella que pasa a través de la columna. La pureza de la población obtenida fue comprobada mediante citometría de flujo utilizando un FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU). Los linfocitos T fueron estimulados durante 48 horas con concanavalina A (5 $\mu\text{g/ml}$); mientras que para la estimulación de macrófagos se empleó LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas). Tras el cultivo, los sobrenadantes obtenidos por centrifugación fueron mantenidos a -80° C hasta su posterior utilización para la determinación de diversos parámetros.

5. Cocultivo en Transwell™ de enterocitos-linfocitos T.

Se llevaron a cabo cocultivos de IEC-18 (enterocitos) y linfocitos T purificados a partir de esplenocitos de rata en Transwell™ (Corning Life Sciences®, Nueva York EEUU). En estos experimentos se utilizaron placas de 6 pocillos que incluían soportes con policarbonato como material permeable, con un tamaño de poro de 0,4 μm y un diámetro de 24 mm. Para ello, los enterocitos se dispusieron en el compartimento superior, es decir, sobre el material permeable del soporte, hasta que se alcanzó la confluencia. En ese momento, los linfocitos T se colocaron en el compartimento inferior del Transwell™, es decir, sobre la propia placa de cultivo. El cocultivo se mantuvo durante 72 horas en una atmósfera de CO₂ (5 %) y a 37° C. Los linfocitos fueron estimulados con concanavalina A (5 $\mu\text{g/ml}$), la cual fue añadida en el compartimento inferior. En cambio, todos los tratamientos fueron añadidos en el compartimento superior, es decir, en contacto únicamente con los enterocitos.

En algunos casos, la línea de epitelio intestinal IEC-18 fue pretratada con pamidronato 24 horas ó 5 días antes de ponerse en contacto con los linfocitos; una vez transcurrido ese tiempo, se sometió a 3 lavados con solución de sales equilibrada (solución Hank's) y se añadió medio nuevo al compartimento superior. El sobrenadante obtenido en el compartimento inferior se congeló a -80°C hasta la determinación de la concentración de distintas citoquinas mediante ELISA.

6. Ensayo de diferenciación de linfocitos hacia Th1.

El ensayo en cuestión se realizó en placas de 24 pocillos y se emplearon linfocitos T purificados (ver punto 4 del apartado D de esta sección). El cultivo consistió en 0,5 millones por pocillo con una densidad celular de 1 millón.ml⁻¹. La polarización hacia el subtipo Th1 se llevó a cabo mediante la adición al cultivo de IL-12 de rata a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 ng/ml), 24 horas antes del estímulo de las células con concanavalina A. El pretratamiento de una hora con pamidronato se realizó antes del tratamiento con IL-12. Así, 24 horas después de añadir la citoquina en cuestión, las células fueron estimuladas con concanavalina A (5 µg/ml) y se incubaron durante 48 horas más. Los sobrenadantes obtenidos fueron mantenidos a -80° C hasta su posterior utilización en la determinación de la secreción de IFN-γ e IL-2.

V. Toxicidad y viabilidad celular.

1. Determinación de la adhesión por cristal violeta.

Los experimentos se llevaron a cabo sobre monocapas confluentes de enterocitos sembrados en placas de 24 pocillos. Dicha técnica se empleó como medida indirecta de la toxicidad de las diversas sustancias empleadas sobre dichas células, valorándose la capacidad de las mismas para disminuir la de adhesión de las células epiteliales. Tras el lavado de las células con PBS, fueron sometidas a tinción y fijado con una solución de cristal violeta al 0,2% (P.V⁻¹) en una solución etanólica al 2% (V.V⁻¹) durante 30 minutos. A continuación se eliminó el exceso del colorante mediante varios lavados con PBS y las células teñidas fueron lisadas con una solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% (P.V⁻¹) (30 minutos en agitación). La solución obtenida fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, y se determinó la absorbancia del sobrenadante obtenido a 540 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje del valor de densidad óptica obtenido para las células no tratadas o grupo control.

2. Medida de la actividad enzimática Láctico deshidrogenasa.

A través de una técnica espectrofotométrica, se determinó la actividad láctico-deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de los diversos cultivos celulares, como medida de toxicidad celular. Para ello se determinó la desaparición del cofactor β-NADH a 340 nm, consumido en la reacción que convierte el ácido pirúvico (añadido como reactivo a la concentración de 25 mM)

en ácido láctico, y que es catalizada por dicha enzima. Como estándar se empleó LDH de músculo de ternero, y los datos fueron expresados como $\text{mU}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3. Determinación de la proliferación por incorporación de timidina tritiada.

Las células mononucleares (esplenocitos) fueron dispuestas en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 2 millones de células por ml y un total de 1 millón de células en cada pocillo. Junto con los diferentes tratamientos y la concanavalina A, las células fueron expuestas a [^3H]-timidina ($1\ \mu\text{Ci}\ \text{mL}^{-1}$; GE Healthcare, España) durante 48 h. Tras dicho período de incubación, las células fueron recolectadas y sometidas a varios lavados con una solución de ácido tricloroacético al 10% (V.V $^{-1}$). Seguidamente, se realizó la lisis celular mediante una solución 0,3 N de NaOH que contiene SDS al 1% (V.V $^{-1}$) 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 Tri-Carb. Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm).

VI. Técnicas generales.

1. Determinación de la secreción de citoquinas.

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

2. Extracción y cuantificación del contenido proteico.

Las proteínas colónicas fueron obtenidas tras la homogenización mecánica en tampón de lisis frío, el cual contiene Igepal CA-630 al 1%, HEPES-Na 20 mM pH 7,5, EGTA 10 mM, β -glicerofosfato 40 mM, MgCl_2 25 mM, ortovanadato sódico 2mM, y una mezcla de inhibidores de proteasas añadida de forma extemporánea (fenilmetilsulfonil fluoruro, aprotinina, pepstatina A y fenantrolina) junto con un inhibidor de fosfatasas, el orto-vanado sódico. En el caso de las muestras procedentes de cultivos celulares, utilizando el mismo tampón descrito, éstas fueron sometidas a ultrasonidos para la lisis celular. El homogenado resultante en ambos casos, se sometió a una centrifugación a 10.000 rpm para la eliminación de los restos de membranas celulares. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas celulares y fue conservado a $-80^\circ\ \text{C}$ hasta su utilización.

para el estudio de expresión proteica. El contenido proteico total fue medido mediante el método del ácido bicinchonínico [974], para lo que se empleó albúmina sérica bovina como estándar.

3. Western blot.

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron calentadas a 95° C durante 5 minutos junto con el tampón de carga, cuya composición es SDS 312 mM, glicerol 50% (V.V⁻¹), 2-mercaptoetanol 1% (V.V⁻¹), EDTA sal trisódica 22,5 mM, Tris 220 mM y trazas de azul de bromofenol (pH=6,8). Tras la separación de las proteínas mediante la electroforesis en gel de acrilamida, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF (según el anticuerpo primario empleado). Las membranas fueron bloqueadas durante 1,5 horas a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T. Un control de carga rutinario se realizó mediante la exposición de la membrana a una solución de ácido acético al 1% (V.V⁻¹) que contiene Rojo Ponceau al 0,5% (P.V⁻¹) de. A continuación, se realizó la exposición al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4° C. Las diluciones empleadas de los distintos anticuerpos son: α -Actina (1:500); iNOS (1:2500); COX2 (1:3000); Rap1A (1:1000); PCNA (1:1000); fosfo-ERK (1:2500); fosfo-JNK (1:2000); fosfo-I κ B α (1:2500); fosfo-p38 (1:1000); Foxp3 (1:1000); fosfo-STAT4 (1:1000); todos ellos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (m.V⁻¹). Como control de carga, todas las membranas fueron expuestas a un anticuerpo frente α -actina; dicho anticuerpo fue obtenido a través del Prof. Jim Jung-Ching Lin del Departamento de Ciencias biológicas de la Universidad de Iowa. El anticuerpo secundario de la especie apropiada según el anticuerpo específico empleado, estaba conjugado a peroxidasa, de modo que las bandas fueron detectadas usando un reactivo para el aumento de la quimioluminiscencia (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Image J.

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

El ARN total de las distintas muestras fue obtenido usando Trizol Reagent[®] (Invitrogen), siguiendo para ello las recomendaciones del fabricante. Tras el análisis de la integridad del ARN aislado mediante electroforesis en gel de agarosa (1% P.V⁻¹), la cuantificación del contenido de ARN de las distintas muestras se llevó a cabo a través utilizando un Nanodrop[®] que determina la absorbancia a 260 y 280 nm. Una cantidad total de 1 μ g de ARN por muestra fue retrotranscrito para la obtención del ADN complementario, mediante el empleo de la enzima transcriptasa inversa, según las indicaciones del fabricante (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories[®], California, EEUU). El ADN complementario se mantuvo congelado a -20° C hasta su uso, mientras que el ARN se conservó a -80° C.

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

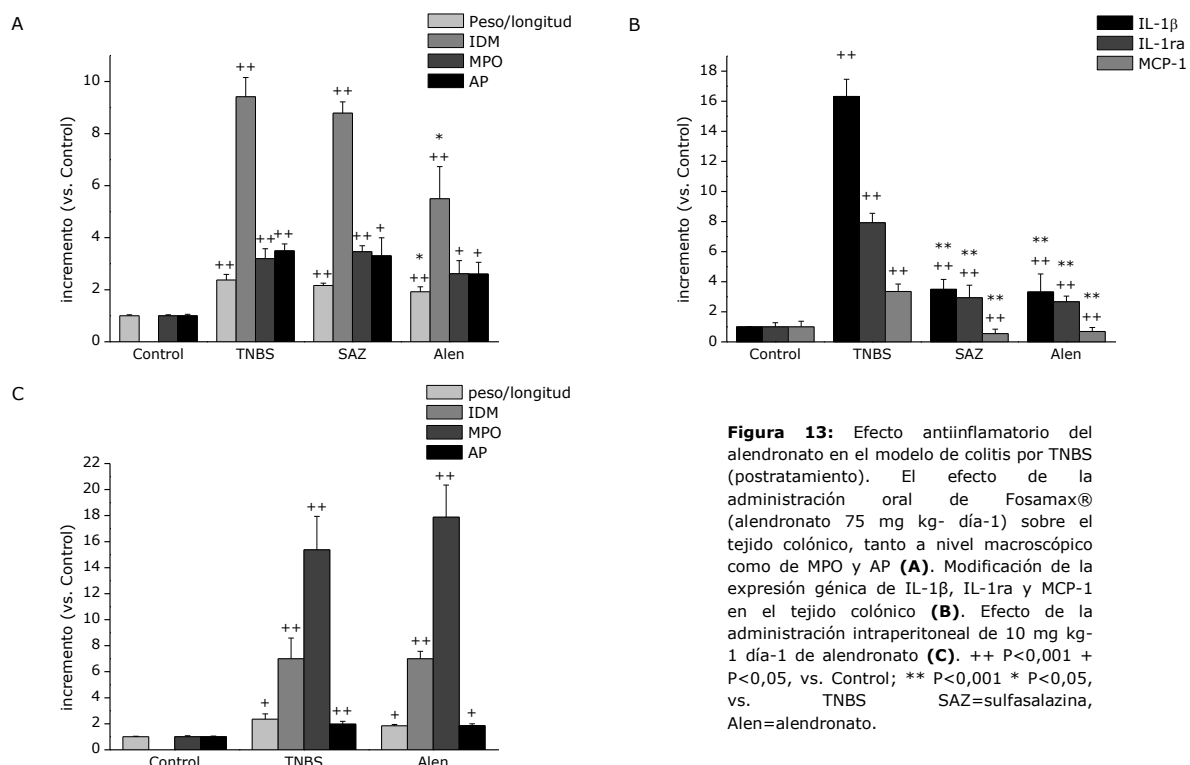
La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Syber Green como fluoróforo (iQ™ SYBR® Green Supermix, Biorad Laboratories, California, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. En algunos casos se empleó ROX como fluoróforo de referencia (iTaq™ SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad Laboratories, California, EEUU). El gen de referencia elegido fue la subunidad 18S del ARN ribosómico y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos. Las siguientes secuencias (5'-3') o primers fueron empleadas: para IL-1 β , AAT GAC CGT TTC TTT GAG GCT G/CGA GAT GCT GCT GTG AGA TTT; para factor de necrosis tumoral (TNF), TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG/ CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA; para Foxp3, CTG CTT GGC AGT GCT TGA GAA/CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT; para IL-10, AGT CAG CCA GAC CCA CAT G/TGC TCC ACT GCC TTG CTT TT; para IL-17, TGG ACT CTG AGC CGC AAT GAG G/GAC GCA TGG CGG ACA ACA GAG G; para IL-23 p19, GCA CAC TAG CCT GGA GGA GTG CA/AGA TGT CCG AGT CCA GCA GG; para IL-6, GCT CTG GTC TTC TGG AGT TCC G/TTG GAT GGT CTT GGT CCT TAG CC; para TGF- β , ACT GGC GAG CCT TAG TTT G/CGT GGC TTC TAG TGC TGA CG ; para 18S, CCA TTG GAG GGC AAG TCT GGT G/CGC CGG TCC AAG AAT TTC ACC; para IFN- γ , TTC ATT GAC AGC TTT GTG CTG G/AAC AGT AAA GCA AAA AAG GAT GCA TT; para IL-4, GAG AAC GAG CTC ATC TGC/CTT TCC AGG AAG TCT TTC.

VII. Análisis estadístico.

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM). Para determinar la significancia estadística, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un test de significancia *a posteriori* (Fisher LSD). La significancia estadística se consideró para un valor de $P < 0,05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante la plataforma informática SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

En estudios preliminares se valoró el efecto antiinflamatorio del alendronato en el modelo de colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico en ratas, en un protocolo experimental curativo, esto es, un post-tratamiento, en el que la administración del fármaco comienza un cierto tiempo después de la inducción de la colitis, concretamente 2 horas². Los resultados obtenidos demuestran un potencial efecto antiinflamatorio de esta sustancia en el modelo experimental.

El tratamiento con alendronato (25 o 75 mg kg⁻¹ día⁻¹) da lugar a una disminución del índice de daño macroscópico (IDM) (Fig. 13.A) y de la pérdida de peso (sólo en el caso de la dosis 25 mg kg⁻¹ día⁻¹). Esto se asoció a una reducción considerable de los niveles de ARNm de IL-1β, MCP-1 y el antagonista del receptor de IL-1β (IL-1ra) (Fig. 13.B). La magnitud del efecto beneficioso fue comparable a la observada con el tratamiento con sulfasalazina (suministrada a una dosis entre 6-20 veces mayor, es decir, 500 mg kg⁻¹ día⁻¹). Así, el postratamiento con sulfasalazina redujo la relación entre los niveles de ARNm de IL-1β/IL-1ra y MCP-1 de forma similar al alendronato, y además disminuyó la actividad fosfatasa alcalina colónica (25 mg kg⁻¹ día⁻¹), pero no fue capaz de modificar la pérdida de peso o el score IDM. La administración intraperitoneal de alendronato, por el contrario, carece de efectos beneficiosos (Fig. 13.C) [10].



A partir de estos datos, se planteó un estudio con un repertorio ampliado de bisfosfonatos nitrogenados. En este caso, y para demostrar un efecto preventivo en la colitis, se empleó un pretratamiento, en el que la administración comienza

² La elección del postratamiento se basó en la bibliografía publicada hasta la fecha referente al estudio del efecto de las estatinas en modelos preclínicos de EII.

dos días antes de la inducción de la colitis. Los bisfosfonatos elegidos fueron ibandronato y pamidronato, junto al ya estudiado alendronato. La primera aproximación se realizó mediante la colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS); al cual se añadió posteriormente y como modelo secundario el modelo inducido por la ingesta en el agua de bebida de sulfato de dextrano sódico (DSS). Una vez elegido el bisfosfonato con un mejor perfil antiinflamatorio, en este caso el pamidronato, se llevó a cabo un estudio en profundidad del mecanismo de acción de dicho fármaco. Para ello, se realizó un análisis del transcriptoma colónico en el modelo de colitis por TNBS, comparando la modificación ocasionada por el tratamiento con pamidronato con la que se produce como consecuencia del tratamiento con un fármaco de uso clínico, la sulfasalazina. La dilucidación del mecanismo de acción se completó mediante la valoración de la modulación de la función de diversas poblaciones celulares en animales de experimentación sanos, así como mediante ensayos en modelos celulares, tanto cultivos primarios como líneas celulares, tratando de abarcar todos los tipos celulares fundamentales en la respuesta inmune y en la reacción inflamatoria.

I. Efecto antiinflamatorio de bisfosfonatos nitrogenados en la EII.

1. Efecto del pamidronato en el modelo de colitis por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico.

1.1. Efecto del pamidronato por vía oral.

El tratamiento de los animales colíticos con SAZ o pamidronato da lugar a una menor pérdida de peso, si se comparan éstos con el grupo colítico no tratado, o grupo TNBS. Así, el peso se estabilizó a partir del segundo día en los grupos tratados con SAZ y pamidronato; y, aunque no se alcanza una mejoría del peso corporal con respecto al grupo TNBS, el análisis estadístico demuestra que al menos, existe una tendencia en este sentido (en el día 6, $P=0,118$ para pamidronato; $P=0,231$ para SAZ) (Fig 14.A).

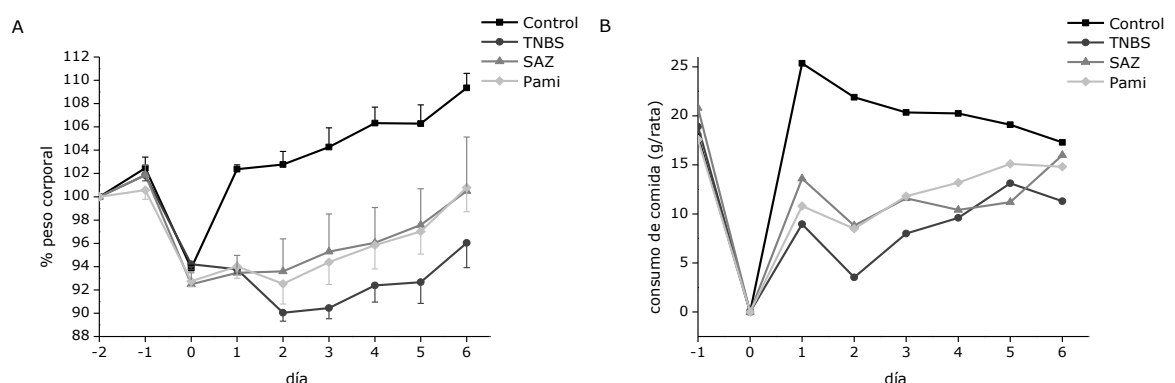


Figura 14: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. **(A)** Peso corporal, % del peso inicial. (++) para TNBS, SAZ y pamidronato en los días 1 y 2; ++ para TNBS y pamidronato, y + para SAZ en los días 3 y 4; ++ para TNBS, y + para SAZ y pamidronato en los días 5 y 6). **(B)** Consumo de comida, gramos de comida consumidos por animal al día. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++, $P<0,001$ y +, $P<0,05$, vs. Control.

Esta mejora en el estado de los animales se traduce en un mayor consumo de comida, acercándose en el caso del pamidronato al consumo de los animales no colíticos en el punto final del tratamiento. (Fig. 14.B).

A nivel colónico, el examen macroscópico corrobora el efecto beneficioso tanto de la sulfasalazina como del Pamidronato, con un menor daño colónico, tanto en lo que se refiere al engrosamiento o edema (valorado mediante el cálculo de la relación peso/longitud del colon), como en la longitud del daño colónico o en el IDM (Fig. 15.A, B y D). En este último caso, los parámetros que se ven modificados de forma satisfactoria por el pamidronato son la hiperemia, la necrosis y la fibrosis. La sulfasalazina se comporta de forma similar, aunque no es capaz de disminuir la puntuación en cuanto a la fibrosis dentro del IDM (Fig. 15.C).

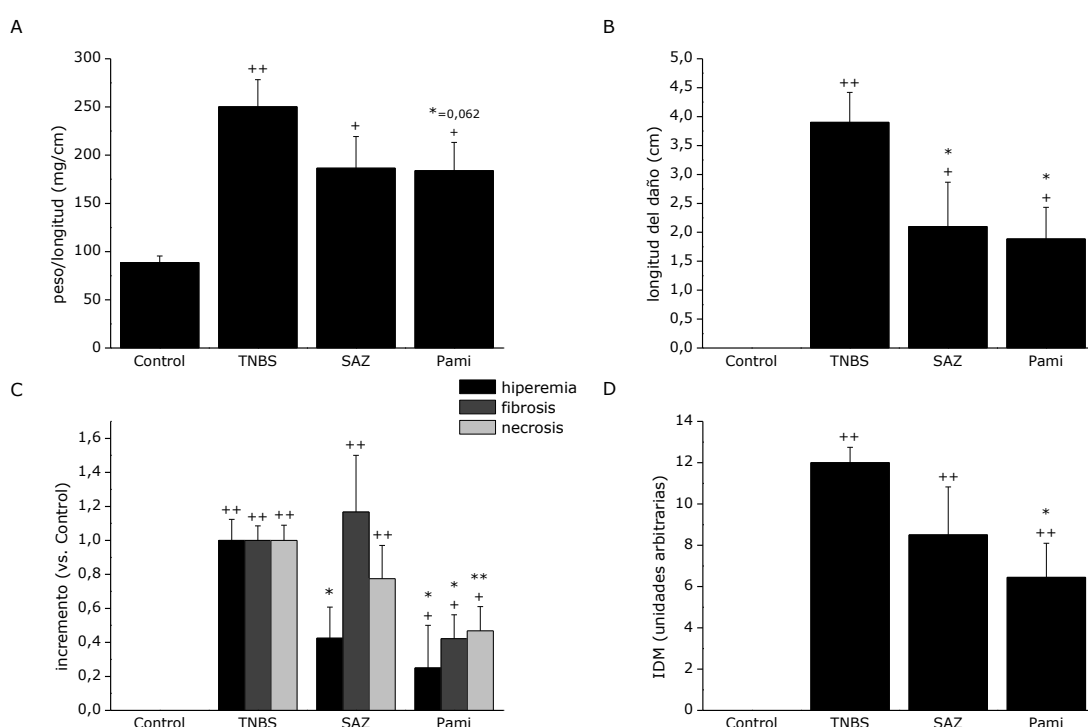


Figura 15: Daño macroscópico colónico. **(A)** Relación entre el peso y la longitud colónicas. **(B)** Longitud del daño colónico. **(C)** Parámetros modificados por pamidronato dentro del cálculo de IDM. **(D)** IDM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Pami (pamidronato).

El estudio histológico también muestra la mejora que se produce en la colitis debido al tratamiento con SAZ y, sobre todo, con pamidronato (Fig. 16). La colitis inducida por TNBS provoca una pérdida de la arquitectura epitelial, junto con una dramática infiltración celular a nivel de mucosa y submucosa. Tanto SAZ como pamidronato disminuyen notablemente la infiltración en la submucosa; sin embargo, el daño en las criptas epiteliales y la mejora de la infiltración en la mucosa son notablemente más patentes en el caso del pamidronato. Algunos de los individuos tratados con pamidronato muestran una arquitectura en el tejido intestinal muy similar a la de un individuo sano.

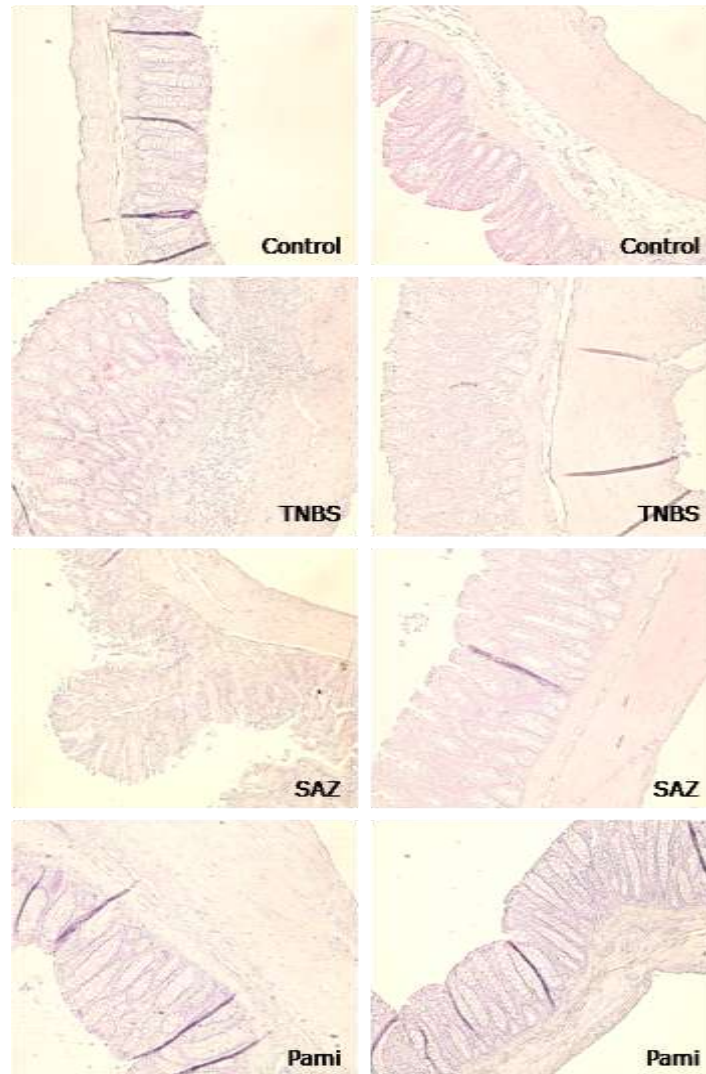


Figura 16: Cortes histológicos del tejido colónico. Tinción de hematoxilina-eosina, se muestran dos individuos representativos de cada grupo experimental.

Las determinaciones bioquímicas realizadas en el tejido colónico muestran la inhibición de la actividad MPO, tanto en el caso de la SAZ como del pamidronato, lo que implica una menor infiltración neutrofílica a nivel de dicho tejido. Sin embargo la actividad AP sólo se ve inhibida por Pamidronato que es capaz de inhibir la actividad

enzimática basal, así como la sensibilidad al inhibidor levamisol, parámetro relacionado con un cambio de isoforma de la enzima (Fig. 17). Sin embargo,

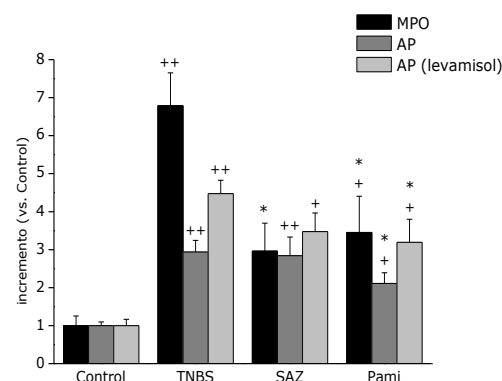


Figura 17: Actividades enzimáticas en el tejido colónico: MPO (U/g tejido), AP (mU/mg proteína) y sensibilidad a levamisol de AP (% de inhibición de la actividad AP). Los datos están referidos al grupo control (tanto por uno) se representan como media \pm SEM; los valores del grupo control son $39,071 \pm 4,974$ para MPO; $430,822 \pm 44,728$ para AP; y $76,02 \pm 5,99$ para la inhibición ejercida por levamisol. ++ $P < 0,001$, + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, vs TNBS. Pami=Pamidronato.

ninguno de los tratamientos es capaz de modificar la expresión de iNOS o COX2 (Fig. 18).

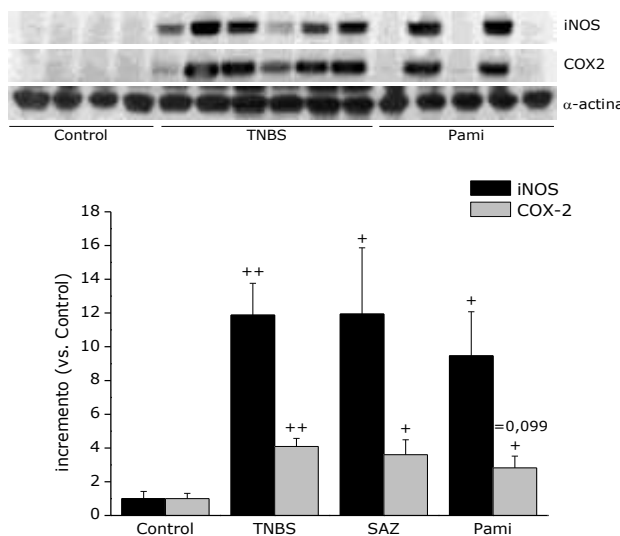


Figura 18: Expresión de iNOS y COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot. Los valores han sido referidos a la expresión de α -actina. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++ P<0,001, + P<0,05, vs. Control; ** P<0,001, *<0,05, vs TNBS. Pami=Pamidronato.

El análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real muestra la tendencia del pamidronato a normalizar la expresión de la mayor parte de los genes ensayados (IL-23, TGF- β incluidos) (Fig. 19). La variabilidad interindividual impidió en este caso la detección de diferencias significativas, con excepción de la IL-1 β , inhibida por pamidronato. Cabe destacar que en el caso del IFN- γ , la tendencia que se observa es un aumento en la expresión, lo cual no coincide con el efecto de la SAZ (Fig. 19.B). Las otras dos excepciones están constituidas por el Foxp3 y la IL-17, cuya expresión no se modifica con respecto al grupo colítico (Fig. 19.C). En otros casos,

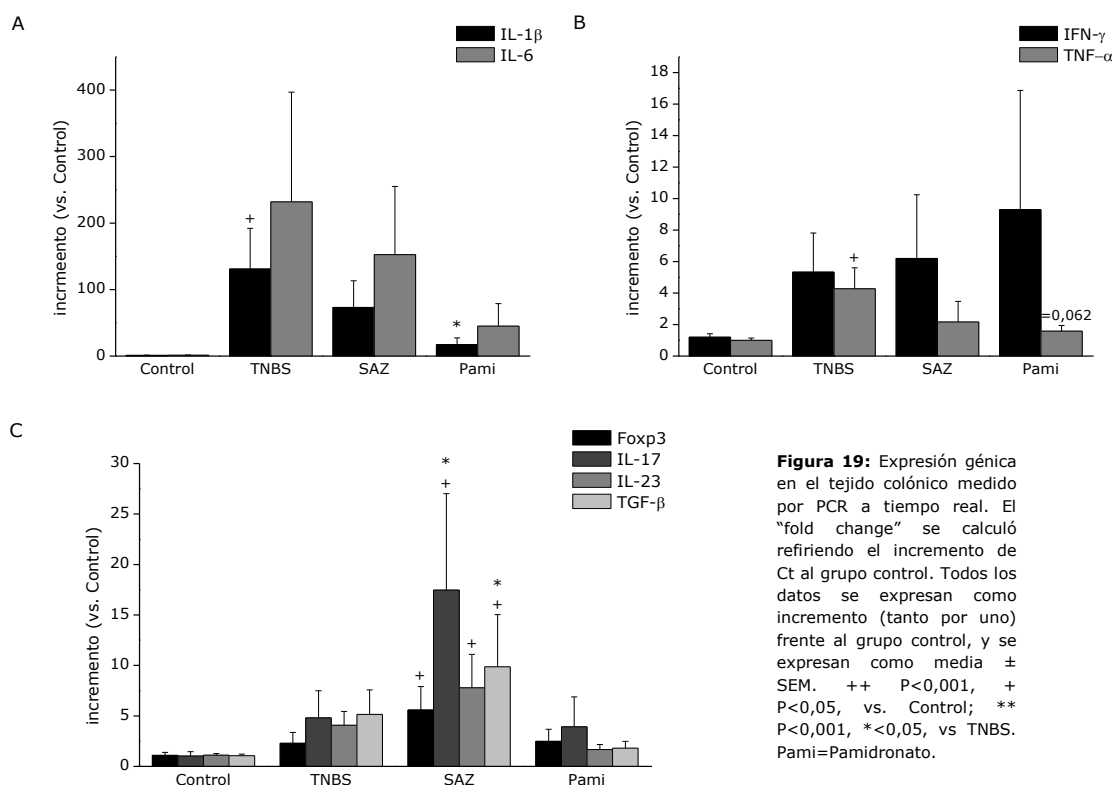


Figura 19: Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real. El "fold change" se calculó refiriendo el incremento de Ct al grupo control. Todos los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control, y se expresan como media \pm SEM. ++ P<0,001, + P<0,05, vs. Control; ** P<0,001, *<0,05, vs TNBS. Pami=Pamidronato.

como en la IL-6 o el TNF- α , los valores obtenidos en el grupo de pamidronato desde el punto de vista estadístico no son significativos cuando se comparan con el TNBS pero tampoco lo son al ser comparados con el grupo no colítico (Fig. 19.A y B). En el caso de la sulfasalazina, la normalización con respecto al grupo control no se cumple en una serie de genes como son Foxp3, IL-17, IL-23 y TGF- β , cuyos valores se encuentran por encima de los del grupo colítico o TNBS (Fig. 19.C).

Se ha estudiado la producción de citoquinas por parte de células mononucleares obtenidas a partir de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de los animales participantes en el experimento; para ello, las células fueron estimuladas con la lectina Con A (Fig. 20). En el caso de los esplenocitos, las células aisladas a partir de los animales colíticos producen una menor cantidad de TNF- α . Por el contrario, las células de los ganglios linfáticos mesentéricos del grupo TNBS secretan más TNF- α que el control, además se observa una tendencia ($P=0,093$) a un incremento de la liberación de IFN- γ (Fig. 20). La producción de IL-2 no se afecta significativamente. El tratamiento con Pamidronato aumenta la secreción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α en esplenocitos comparado con el grupo TNBS, en tanto que no se registró efecto alguno sobre células de ganglios linfáticos mesentéricos (Fig. 20.A). El comportamiento de la sulfasalazina es opuesto, de forma que no hay efecto sobre las células esplénicas, pero sí sobre nódulos linfáticos mesentéricos, produciendo una disminución de IFN- γ , aunque sin alcanzar la significación estadística.

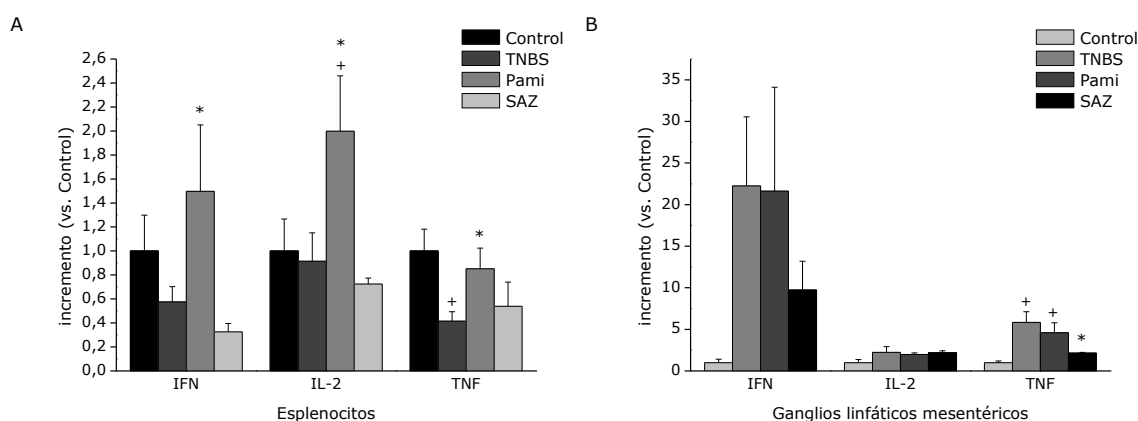


Figura 20: Producción de citoquinas por parte de esplenocitos (A) y células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos (B) estimuladas con concanavalina A (5 μ g/ml). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control, media \pm SEM. ++ $P < 0,001$, + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$, * $< 0,05$, vs TNBS. Pami=Pamidronato

1.2. Efecto del pamidronato por vía intraperitoneal.

El efecto antiinflamatorio demostrado por el pamidronato cuando éste se administra por vía oral desaparece al cambiar la vía de administración y realizar la administración por vía intraperitoneal. La dosis empleada en la inyección intraperitoneal se calculó considerando un 1% de biodisponibilidad de los bisfosfonatos cuando se administran por vía oral [975, 976], y por

tanto el 1% de la dosis administrada en la vía oral es la que se administra por vía intraperitoneal ($0,8 \text{ mg kg día}^{-1}$).

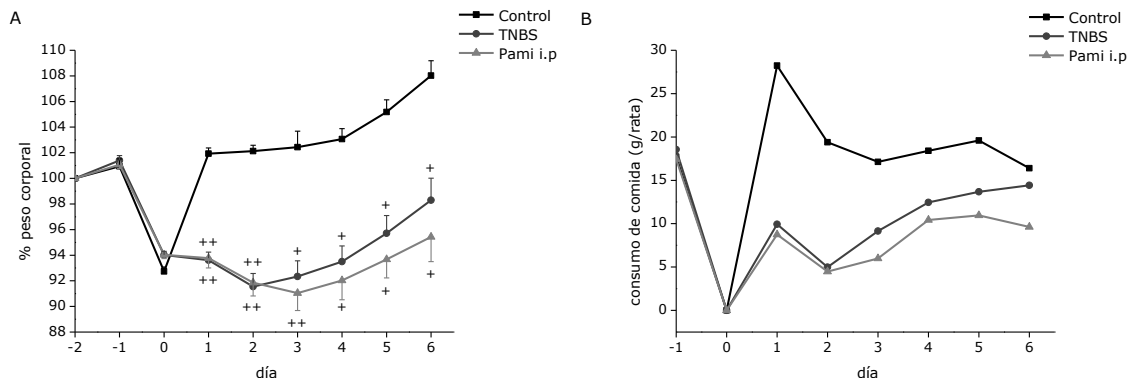
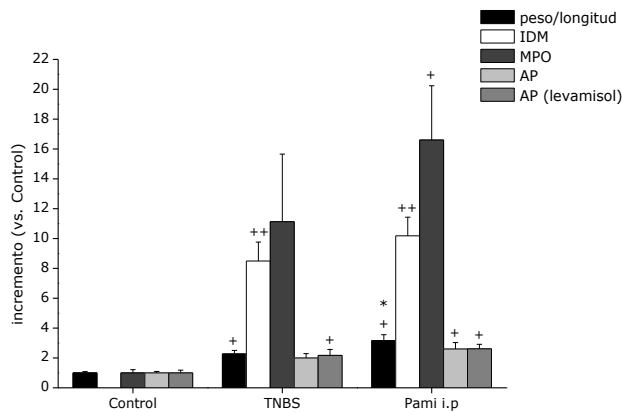


Figura 21: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. **(A)** Peso corporal, % del peso inicial. **(B)** Consumo de comida, gramos de comida consumidos por animal al día. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++, $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control.

Figura 22: Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico: relación peso/longitud, IDM, MPO, AP y sensibilidad de ésta al inhibidor levamisol. Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente al grupo control, excepto en el caso del IDM (unidades arbitrarias). $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Pami=Pamidronato.



El estado de las ratas tratadas con pamidronato no difiere sustancialmente de aquéllas que no han recibido tratamiento alguno (grupo colítico). El tratamiento

intraperitoneal no modificó la pérdida de peso experimentada por los animales tras la inducción de la colitis y, por tanto, no normalizó la ingesta de comida (Fig. 21.A y B). A nivel macroscópico, el daño colónico es similar al del grupo colítico, así como la infiltración neutrofílica (MPO) y la expresión de AP (Fig. 22). Tampoco se observa una mejora a nivel microscópico en el estudio histológico (Fig. 23). La producción de citoquinas (IL-2, IFN- γ y TNF- α) en células mononucleares obtenidas de ganglios linfáticos mesentéricos estimuladas con Con A no es modificada por el tratamiento con pamidronato por vía intraperitoneal (no mostrado).

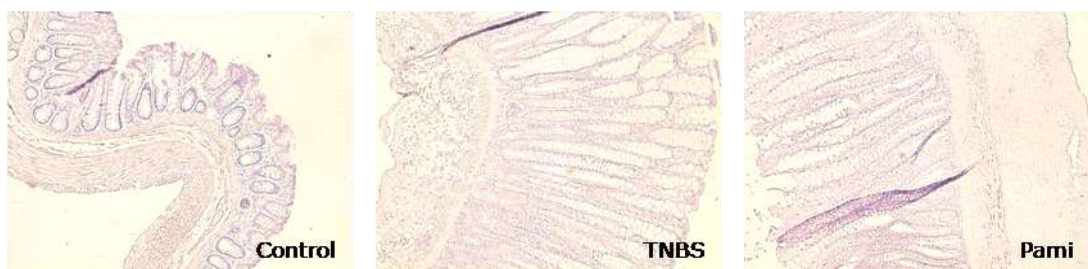


Figura 23: Tinción de hematoxilina-eosina realizada en cortes histológicos de colon en el tratamiento con Pamidronato intraperitoneal en la colitis por TNBS. Se muestra un individuo representativo de cada grupo experimental.

2. Efecto del pamidronato en el modelo de colitis por sulfato de dextrano sódico.

El pamidronato se ensayó en un segundo modelo preclínico de EII, el modelo de colitis en rata inducida por sulfato de dextrano sódico. Este modelo difiere mecanísticamente del anterior en que la inflamación se desarrolla como consecuencia de la alteración de la barrera epitelial por el DSS. El pamidronato se administró únicamente por vía oral, ya que la vía intraperitoneal demostró no ser eficaz en el modelo de TNBS. La dosis empleada fue la misma que en el modelo de TNBS, es decir, 80 mg kg día⁻¹.

Durante el desarrollo del experimento, no se observó mejoría alguna en cuanto a consumo de comida o índice de actividad de la enfermedad (DAI); de hecho, la evolución es muy similar a la de los animales que forman parte del grupo colítico o DSS (Fig. 24).

El análisis del tejido colónico tampoco da señales de un efecto antiinflamatorio en este modelo experimental por parte del pamidronato ya que, como se muestra en la Fig. 25, el daño colónico es similar al comparar el grupo tratado con pamidronato con el grupo DSS, tanto desde el punto de vista macroscópico (IDM y relación peso/longitud), como en lo que se refiere a las actividades enzimáticas determinadas en dicho tejido, esto es, mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina (Fig. 25).

El estudio histológico mediante la tinción hematoxilina-eosina, sin embargo, muestra un menor daño en el colon procedente de los animales que recibieron el pamidronato, comparado con el grupo colítico no tratado (DSS). En la colitis se observa una destrucción del epitelio con acortamiento de las criptas y pérdida de la arquitectura epitelial; a esto hay que sumar la infiltración a nivel de la mucosa y de la submucosa especialmente. El tratamiento con pamidronato da lugar a un

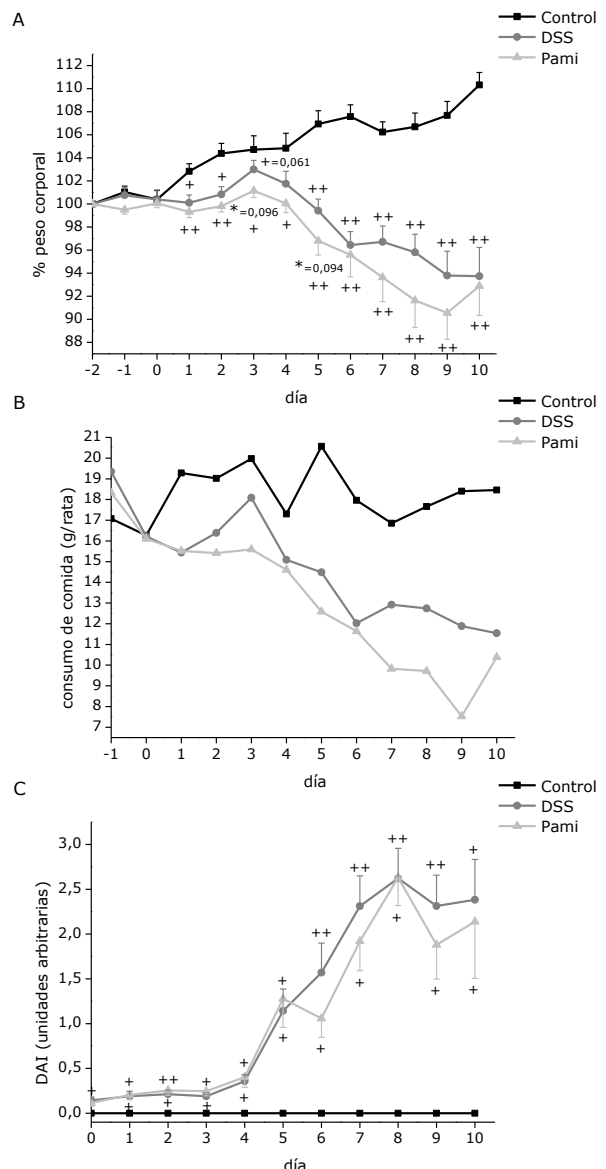


Figura 24: Evolución de los animales en el modelo de colitis por DSS. (A) Peso corporal. (B) Consumo de comida. (C) Índice de actividad de la enfermedad (DAI). Los datos se expresan como media \pm SEM. $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Pami=Pamidronato.

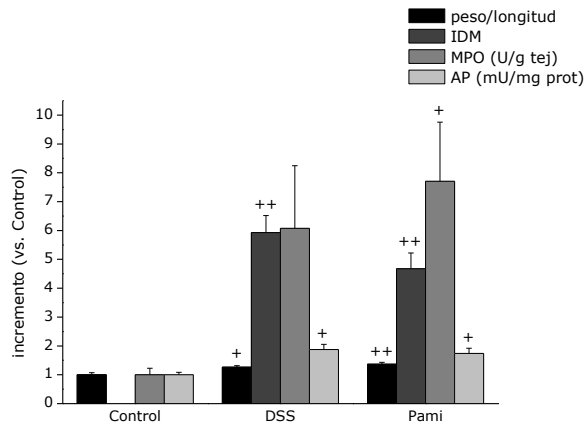


Figura 25: Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el modelo de colitis por DSS: relación peso/longitud, IDM, MPO y AP. Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente al grupo control, excepto en el caso del IDM (unidades arbitrarias). ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. ** $P < 0,001$ y * $P < 0,05$, vs. TNBS. Pami=Pamidronato.

menor daño epitelial; el epitelio presenta una arquitectura prácticamente normal y la destrucción del mismo sólo se observa en zonas concretas del tejido. Además, se observa

una menor infiltración celular, lo que se pone de manifiesto especialmente a nivel de la capa submucosa (Fig. 26).

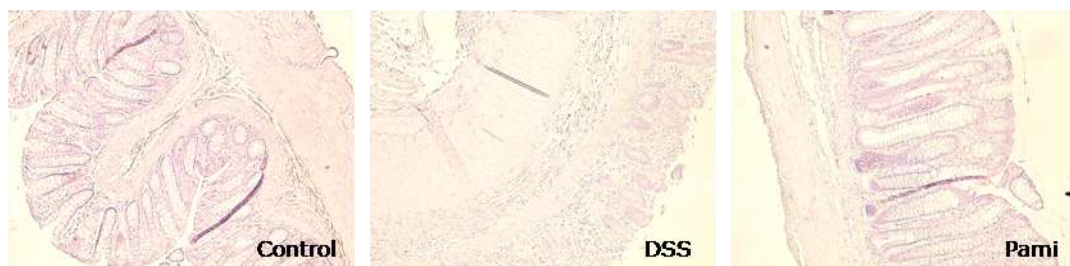


Figura 26: Tinción de hematoxilina-eosina realizada en cortes histológicos de colon en el tratamiento con Pamidronato intraperitoneal en la colitis por DSS. Se muestra un individuo representativo de cada grupo experimental.

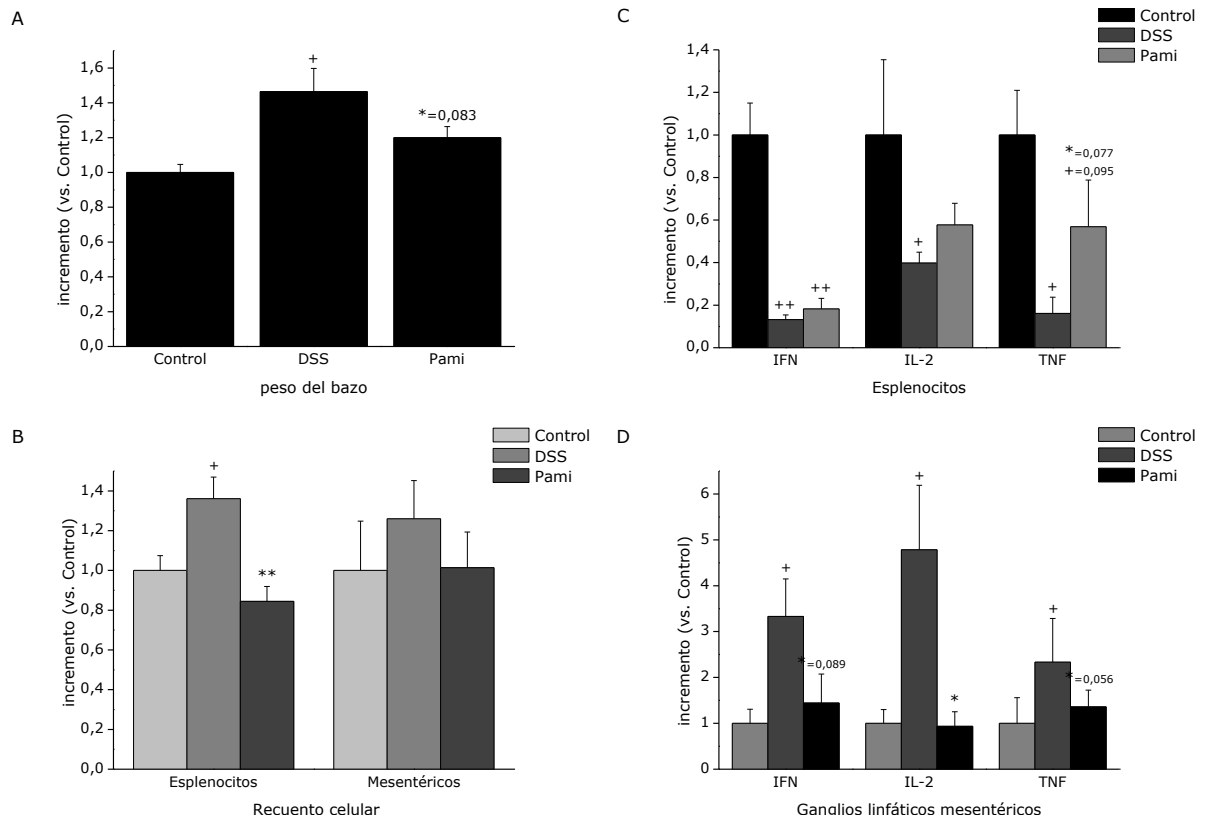


Figura 27: Análisis de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. **(A)** Peso del bazo. **(B)** Recuento celular (millones de células totales). **(C y D)** Producción de citoquinas por las células mononucleares estimuladas con concanavalina A (5 μ g/ml). La secreción (pg/ml) del grupo control fue **(C)** 9787,611 \pm 146,707, IFN- γ ; 1145,107 \pm 407,708, IL-2; 279,986 \pm 58,807, TNF- α . **(D)** 4803,343 \pm 1470,549, IFN- γ ; 427,399 \pm 127,808, IL-2; 97,093 \pm 24,331, TNF- α . Los resultados se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente al grupo control. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. ** $P < 0,001$ y * $P < 0,05$, vs. TNBS. Pami=Pamidronato.

El estudio de las poblaciones de los órganos linfoides, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, demuestra un efecto inmunomodulador del pamidronato en el este modelo de colitis, que si bien no se pone de manifiesto a nivel colónico desde el punto de vista macroscópico, sí que coincide con el efecto beneficioso observado a nivel microscópico en el estudio histológico. El pamidronato disminuye la esplenomegalia así como el número de células mononucleares de bazo (Fig. 27.A y B). A nivel digestivo la tendencia es la misma, aunque los datos no son tan patentes desde el punto de vista estadístico (Fig. 27.B). Así, al estudiar la producción de citoquinas por las células mononucleares estimuladas con concanavalina A se observa que, de forma similar a lo que ocurre en el modelo de TNBS, la inducción de la colitis conlleva un aumento de la producción de citoquinas en las células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos, y una disminución de la misma en el caso de los esplenocitos. El efecto inmunomodulador del pamidronato se pone de manifiesto especialmente en el caso de las células de ganglios mesentéricos, ya que inhibe totalmente el incremento en la producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α , normalizando los valores con respecto al grupo control (Fig. 27.D). A nivel del bazo, el efecto es mucho más modesto, observándose únicamente una tendencia a incrementar los valores de TNF- α , pero sin alcanzar la significancia estadística (Fig. 27.C).

3. Efecto del alendronato en el modelo de colitis por ácido trinitrobencenosulfónico.

3.1. Efecto del alendronato por vía oral.

El postratamiento con alendronato no combate la pérdida de peso o la anorexia que caracterizan a los animales con colitis por TNBS (Fig. 28.A y B).

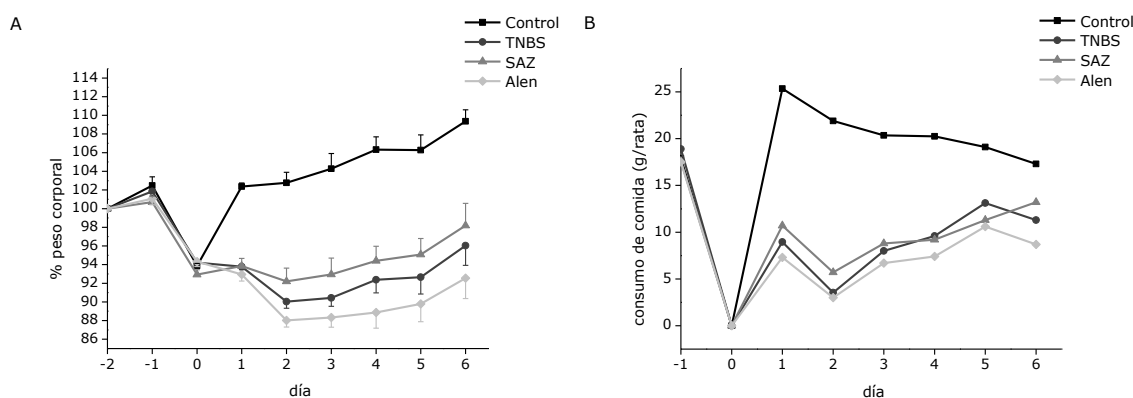


Figura 28: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. **(A)** Peso corporal. $P < 0,001$ para TNBS, SAZ y Alendronato vs. Control en los días comprendidos entre el día 1 y el día 6. **(B)** Consumo de comida. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. SAZ= sulfasalazina. Alen=alendronato.

El análisis macroscópico del tejido colónico muestra que ni la sulfasalazina ni el alendronato ejercen un efecto antiinflamatorio significativo. Si bien la sulfasalazina muestra una cierta tendencia a disminuir ambos parámetros, la relación peso/longitud del colon y el daño del mismo (Fig. 29).

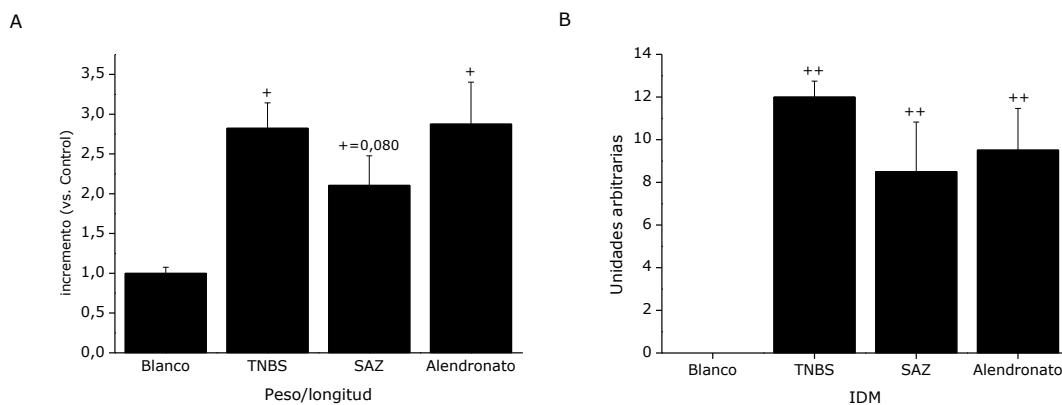


Figura 29: Daño macroscópico del tejido colónico. **(A)** Relación peso/longitud (mg/cm). **(B)** IDM. Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control, media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS.

El alendronato no produjo tampoco una modificación significativa de MPO ($P=0,235$) o AP, mientras que la SAZ dio lugar a una bajada sustancial de la actividad MPO (Fig. 30).

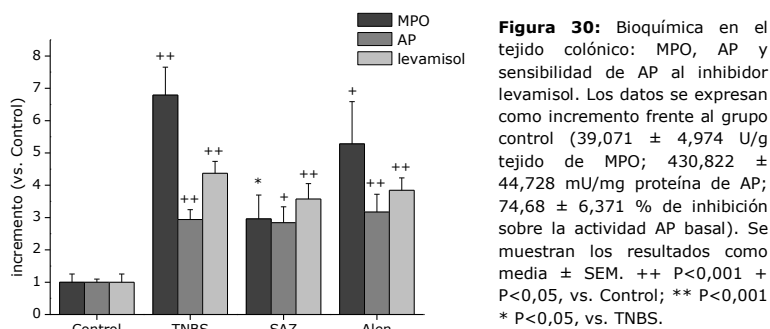


Figura 30: Bioquímica en el tejido colónico: MPO, AP y sensibilidad de AP al inhibidor levamisol. Los datos se expresan como incremento frente al grupo control (39,071 \pm 4,974 U/g tejido de MPO; 430,822 \pm 44,728 mU/mg proteína de AP; 74,68 \pm 6,371 % de inhibición sobre la actividad AP basal). Se muestran los resultados como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS.

3.2. Efecto del alendronato por vía intraperitoneal.

En otro experimento tratamos de confirmar la ausencia de eficacia del alendronato administrado por vía intraperitoneal. Este experimento está justificado por la dosis relativamente alta utilizada anteriormente [10]. Sin embargo, al igual que entonces, no se produjo ninguna mejora con la administración de alendronato por vía intraperitoneal (0,75 mg kg^{-1} día $^{-1}$, según el cálculo a partir de la dosis oral y de la biodisponibilidad del 1%). La

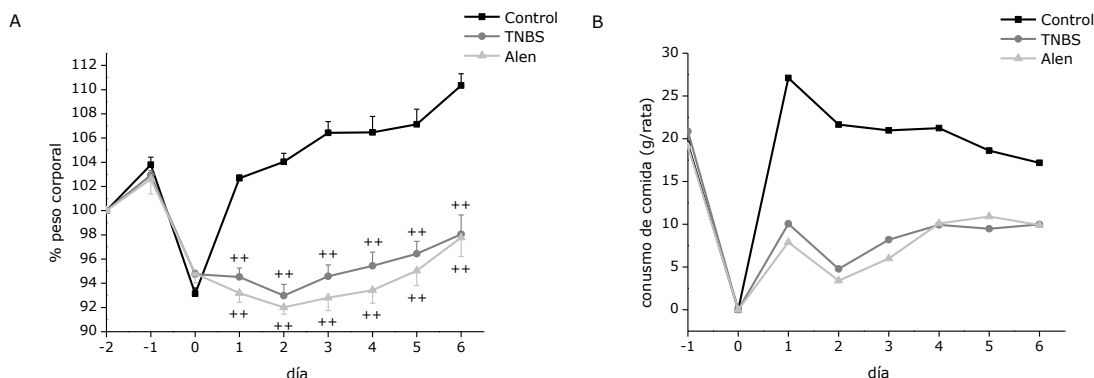


Figura 31: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. **(A)** Peso corporal. **(B)** Consumo de comida. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Alen=alendronato.

pérdida de peso corporal es similar en el grupo colítico y el grupo tratado con alendronato, y dicha pérdida de peso se acompaña de una anorexia en la que la ingesta de alimentos disminuye significativamente en ambos grupos por igual (Fig. 31).

El examen macroscópico y la medida de MPO y AP en el tejido colónico muestran una ausencia de efecto antiinflamatorio cuando el alendronato se administra por vía intraperitoneal (Fig.32).

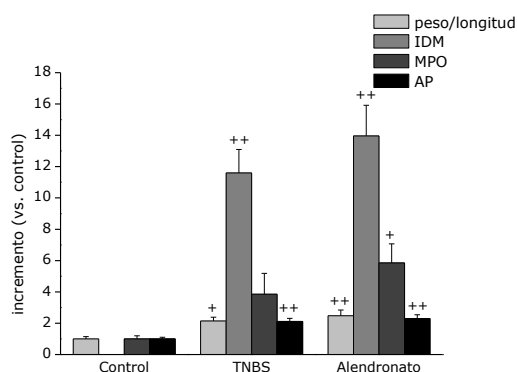


Figura 32: Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el modelo de colitis por TNBS: relación peso/longitud, IDM, MPO y AP. Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente al grupo control, excepto en el caso del IDM (unidades arbitrarias). Los valores para el grupo control son $115,446 \pm 17,356$ mg/cm; $11,6 \pm 1,497$ UA en el IDM; $3,655 \pm 0,718$ U/g tejido de MPO; $114,543 \pm 14,373$ mU/mg de proteína de AP. ++ P<0,001 y +, P<0,05, vs. Control. ** P<0,001 y * P<0,05, vs. TNBS.

4. Efecto del ibandronato en modelo de colitis por ácido trinitrobencenosulfónico.

4.1. Ibandronato por vía oral.

El ibandronato fue administrado por vía oral a la dosis de $83 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Nuestros resultados indican que el ibandronato no sólo carece de efecto terapéutico alguno en este modelo, sino que incluso provoca un cierto empeoramiento del estado general de los animales que reciben dicho tratamiento junto el agente químico encargado de desencadenar el proceso colítico. Este efecto nocivo se pone de manifiesto por una potenciación de la pérdida de peso, llegando a alcanzar la significación estadística a partir del día 5 de tratamiento (Fig. 33.A). Este fenómeno va acompañado por un claro efecto anorexígeno, de modo que en el último día de tratamiento la ingesta de comida es aproximadamente diez veces menor que en el grupo no colítico y cinco veces menor que en el grupo TNBS (Fig. 31.B).

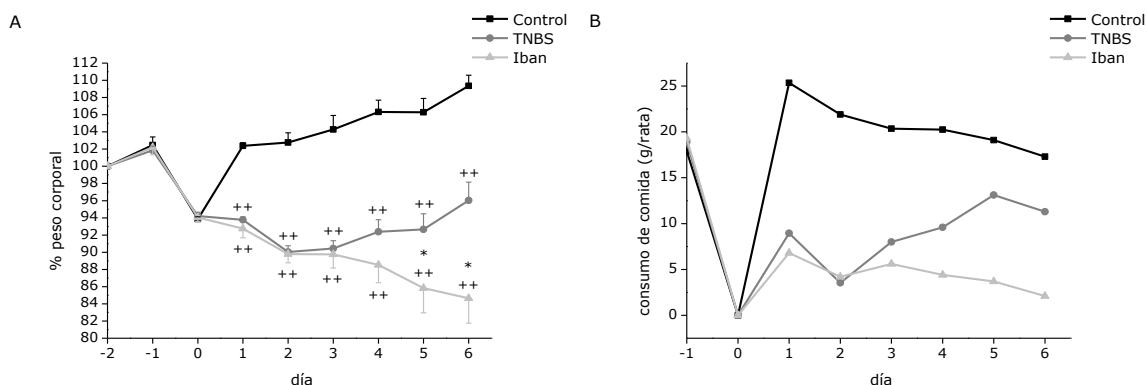


Figura 33: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. (A) Peso corporal. (B) Consumo de comida. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++ P<0,001 + P<0,05, vs. Control; ** P<0,001 * P<0,05, vs. TNBS. Iban=ibandronato.

A pesar de estos resultados, que demuestran un efecto perjudicial del ibandronato, el estado macroscópico del colon es similar al del grupo control,

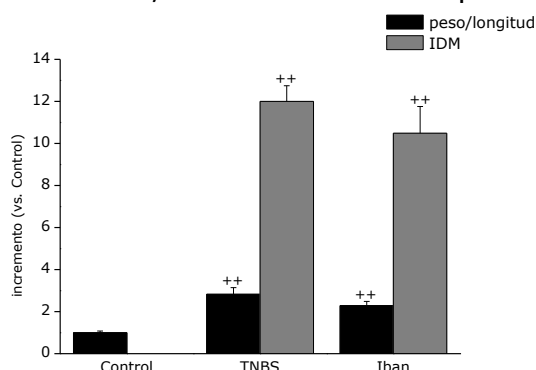


Figura 34: Daño macroscópico del colon. Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento frente al grupo control en el caso de la relación peso/longitud y como unidades arbitrarias en el caso del IDM. ++ $P < 0,001 + P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Iban=ibandronato.

incluso existe una mínima tendencia a la recuperación a nivel de este tejido, como se demuestra en los datos de la relación peso/longitud y del IDM, los cuales muestran el grado de edema y de gravedad del proceso inflamatorio a nivel del tejido (Fig. 34). Así, paradójicamente, la inflamación a nivel colónico parece no verse empeorada por el tratamiento de los animales con ibandronato por vía oral en la colitis inducida por TNBS.

Para verificar los resultados anteriores, se midieron los niveles de MPO y AP en el intestino. Al igual que a nivel macroscópico, el colon de las ratas tratadas con ibandronato muestra niveles comparables a los del grupo TNBS (Fig. 35).

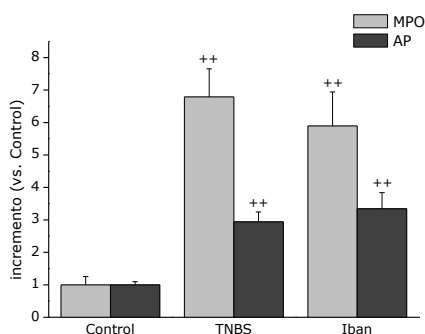


Figura 35: Bioquímica en el tejido colónico: MPO y AP. Los datos se expresan como incremento frente al grupo control ($5,758 \pm 1,468$ U/g tejido de MPO; $146,638 \pm 13,984$ mU/mg proteína de AP). Se muestran los resultados como media \pm SEM. ++ $P < 0,001 + P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Iban=ibandronato.

Los datos obtenidos hasta el momento indican que, a pesar de un empeoramiento del estado general de los animales con un aumento en la pérdida de peso corporal importante, la inflamación a nivel colónico es semejante a la del grupo colítico o TNBS. Esto nos lleva a pensar que puede existir un efecto a nivel

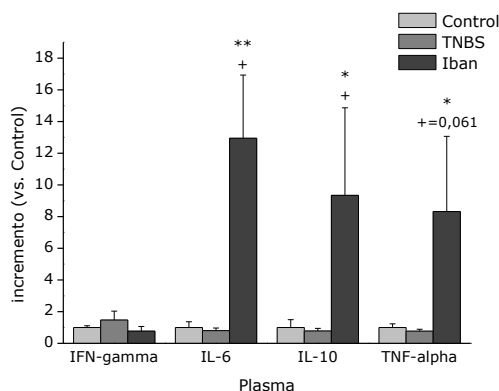


Figura 36: Concentración de citoquinas en plasma. Los valores se han referido a la concentración (pg/ml) en el grupo control ($60,952 \pm 6,588$, IFN- γ ; $14,014 \pm 5,023$, IL-6; $40,112 \pm 19,926$, IL-10; $10,006 \pm 2,364$, TNF- α), y se expresan como incremento (tanto por uno) frente a dicho grupo. ++ $P < 0,001 + P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Iban=ibandronato.

sistémico. Por ello, determinamos los niveles de citoquinas en plasma en las ratas tratadas con ibandronato. La colitis sólo tiene efectos moderados, concretamente un incremento en IFN- γ y una reducción de IL-6, IL-10 y TNF- α , aunque ninguno de estos efectos es estadísticamente significativo. El tratamiento con ibandronato provoca modificaciones sustanciales en los niveles séricos de citoquinas, concretamente, aumenta la IL-6, la IL-10 y el TNF- α , todas ellas características del perfil de citoquinas producido por macrófagos (Fig. 36).

4.2. Efecto del ibandronato por vía intraperitoneal.

Al igual que en el tratamiento con alendronato o pamidronato, el ibandronato carece de efecto antiinflamatorio cuando se administra por vía intraperitoneal. El estado general de los animales no mejora con respecto al grupo colítico pero, a diferencia de lo que ocurre en la vía oral, éste es similar, sin existir un empeoramiento del mismo; al igual que ocurre en la ingesta de comida (Fig. 37).

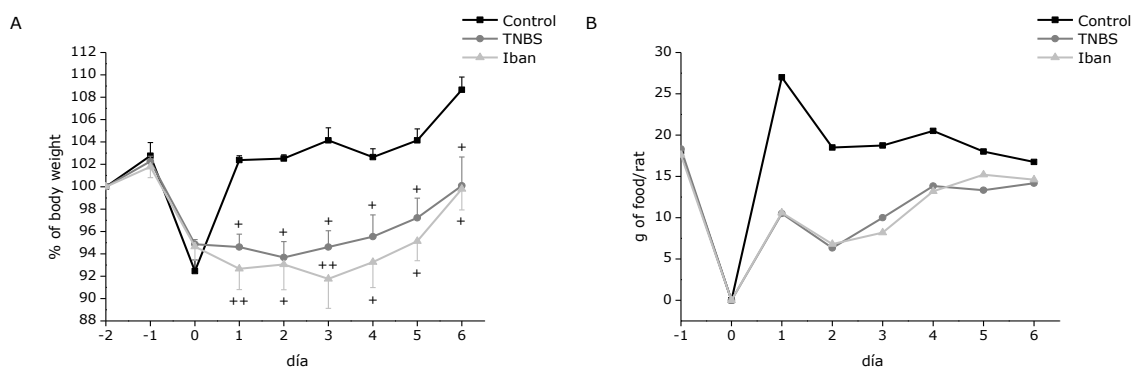


Figura 37: Evolución de los animales en el modelo de colitis por TNBS. **(A)** Peso corporal. **(B)** Consumo de comida. Los datos se expresan como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$, vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$, vs. TNBS. Iban=ibandronato.

Igualmente, no se registran efectos beneficiosos a nivel del colon en el análisis macroscópico y las medidas de MPO y AP (Fig. 38).

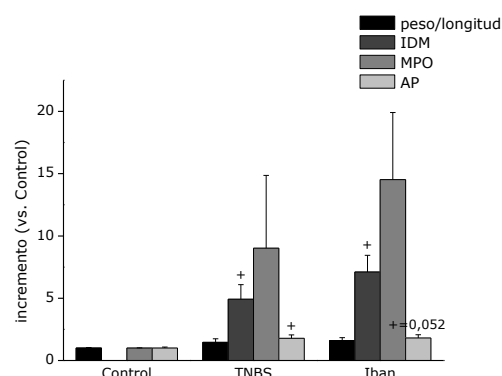


Figura 38: Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el modelo de colitis por TNBS: relación peso/longitud, IDM, MPO y AP. Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente al grupo control, excepto en el caso del IDM (unidades arbitrarias). ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. ** $P < 0,001$ y * $P < 0,05$, vs. TNBS. Pami=Pamidronato.

II. Caracterización del mecanismo de acción del pamidronato.

1. Estudio del transcriptoma colónico.

En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se ha caracterizado el patrón de alteración de la expresión génica en el colon en el modelo de colitis inducida por TNBS. A partir de estos datos, el análisis del transcriptoma colónico permite profundizar en el mecanismo de acción de una sustancia que ha demostrado su capacidad antiinflamatoria en este modelo. Siguiendo esta estrategia, se ha establecido una comparación entre la modificación de la expresión génica desencadenada por el tratamiento con SAZ y con pamidronato. Para ello se han considerados los genes sobreexpresados o reprimidos con respecto al grupo control y al grupo colítico.

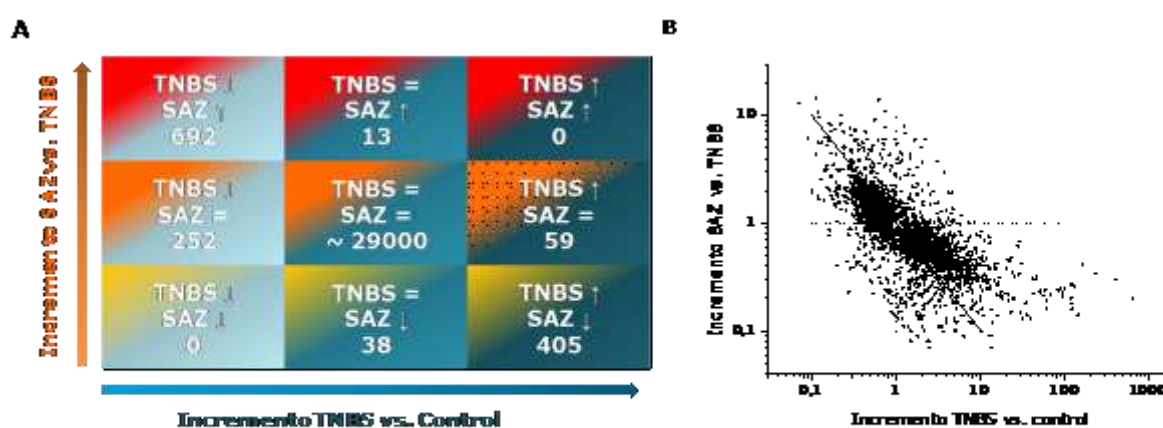
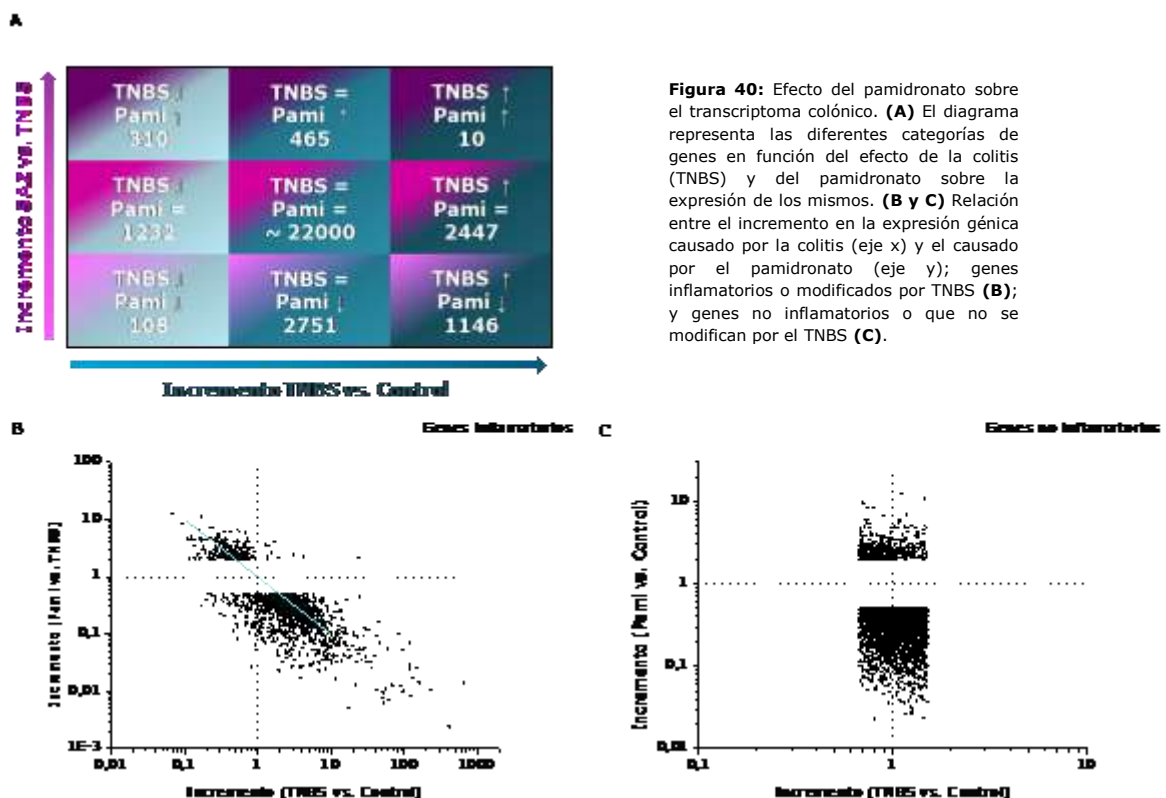


Figura 39: Efecto de la SAZ sobre el transcriptoma colónico. (A) El diagrama representa las diferentes categorías de genes en función del efecto de la colitis (TNBS) y de la SAZ sobre la expresión de los mismos. (B) Relación entre el incremento en la expresión génica causado por la colitis (eje x) y el causado por la SAZ (eje y).

La SAZ (500 mg/kg) da lugar a un marcado efecto antiinflamatorio acompañado de modificaciones considerables sobre la expresión génica a nivel del colon. Además de la normalización de un gran número de genes inflamatorios (genes modificados por TNBS), la expresión de diversos genes implicados en diferentes vías metabólicas y vías de señalización fue alterada por el tratamiento con SAZ. Aunque de forma general y salvo mínimas excepciones, podemos decir que el efecto de la SAZ se basa en la normalización hasta los niveles del grupo control de los genes modulados por la colitis, es decir, un comportamiento típico de su carácter antiinflamatorio (Fig. 39). La validación postgenómica muestra una excelente correlación con los resultados obtenidos en el microarray. Al profundizar en el mecanismo de acción podemos afirmar que la SAZ moduló la expresión de genes regulados por NFκB y la modulación sobre PPAR no es importante. Estos resultados fueron comprobados mediante diversos experimentos de tipo no genómico en los que se demostró que la SAZ es capaz de inhibir la fosforilación de IκBα en líneas celulares de enterocitos y en cultivos primarios de células mononucleares obtenidas del bazo. La conclusión del estudio realizado es que la SAZ ejerce un efecto antiinflamatorio en el modelo de colitis inducida por TNBS en ratas por un mecanismo relacionado con la inhibición de NFκB y no a través de la modulación de PPAR o de acciones antioxidantes.

A continuación analizamos el transcriptoma colónico en modelo de TNBS tras el tratamiento con pamidronato, tratando de compararlo con los resultados obtenidos en el caso de la SAZ. En primer lugar, el número de genes sensibles a pamidronato es muy elevado, incluso mayor que en el caso del TNBS, ya que un total de 4790 genes presentan una expresión alterada con respecto al grupo control. Así, entre los genes no inflamatorios 465 son aumentados por Pamidronato, y 2751 son reprimidos por el bisfosfonato. Dentro de los genes inflamatorios, es decir, aquéllos cuya expresión se ve modificada por la inducción de la colitis, un total de 1574 genes son igualmente modulados por el pamidronato. Al igual que en la SAZ, el pamidronato provoca la normalización de muchos de estos genes inflamatorios, en concreto, 1456. Sin embargo, el comportamiento del pamidronato difiere del de la SAZ ya que existen 118 genes en los que el pamidronato potencia la expresión alterada provocada por el TNBS, esto es, 108 genes disminuidos por TNBS y disminuidos aún más por pamidronato y 10 genes en los que el aumento provocado por TNBS es potenciado por pamidronato. Este análisis preliminar nos indica que el mecanismo de acción y el perfil beneficioso del pamidronato en la colitis inducida por TNBS es completamente diferente al de la SAZ (Fig. 40).



Mediante este análisis genómico se estudió la expresión de marcadores de distintos tipos celulares para establecer una relación entre el efecto antiinflamatorio y una modificación en la infiltración celular en el colon. Los datos obtenidos en el microarray muestran que existe una disminución de la expresión de diversos marcadores de linfocitos, T y B, macrófagos y polimorfonucleares

(PMN), sobre todo en estos dos últimos casos. Sin embargo, la infiltración de células dendríticas y NK no se ajusta a un patrón totalmente definido, sino que la modificación es variable en función del marcador concreto que consideremos (Tabla 4).

Tipo celular	Marcador (gen)	Incremento (Pami vs. TNBS)
Linfocitos T	Thy-1	0,50
	Tcrb	0,51
	Tcrg	1
	Zap70	0,64
	Lck	0,70
Linfocitos B	Ptprc	0,26
	Ms4a1	0,19
	Cd22	0,49
	Cd79b	0,55
Macrófagos y PMN	S100a8	0,01
	Itgb2	0,10
	Cd68	0,11
	Csf1r	0,26
	Cybb	0,41
	Csf2rb1	0,13
	Lcn2	0,05
Células NK	Baat	2
	Ncam1	1,23
	B3gat1	0,66
Células dendríticas	Itgad	0,78

Tabla 4: Modificación en la expresión de marcadores de distintos tipos celulares. El incremento hace referencia al tanto por uno de la expresión cuando se compara el efecto del Pamidronato con el efecto de la colitis.

El impacto del pamidronato sobre el transcriptoma colónico en el modelo de TNBS es considerable, como muestra el amplio espectro de genes cuya expresión está alterada. El siguiente objetivo en el análisis genómico es establecer las vías o rutas biológicas más afectadas por el tratamiento con pamidronato. Para ello se utilizó la plataforma informática Ingenuity[®], la cual IPA permite la valoración de vías de señalización y metabólicas, redes moleculares y procesos biológicos que se encuentran modificados utilizando bases de datos genómicas previamente establecidas.

La respuesta a través de receptores del ácido retinoico es una de las vías con una modificación más importante, tanto en cuanto al número de mediadores implicados como a la magnitud de la modificación en la expresión de los mismos. Entre los genes incluidos en esta ruta, NR1/3 es el segundo gen más incrementado de entre los modificados por pamidronato (incremento 12,41). La proteína codificada es un receptor nuclear. Este gen puede ser considerado como "inflamatorio" ya que se encuentra modificado en el TNBS, pero en este caso, disminuido (incremento 0,067), por lo que el pamidronato tiende a normalizar la expresión de este gen con respecto al TNBS. Otros genes implicados en esta vía

también se encuentran aumentados, como RARG, RXRA, Rxr o FXR ligand-FXR-retinoic acid-RXR- α (Fig. 41).

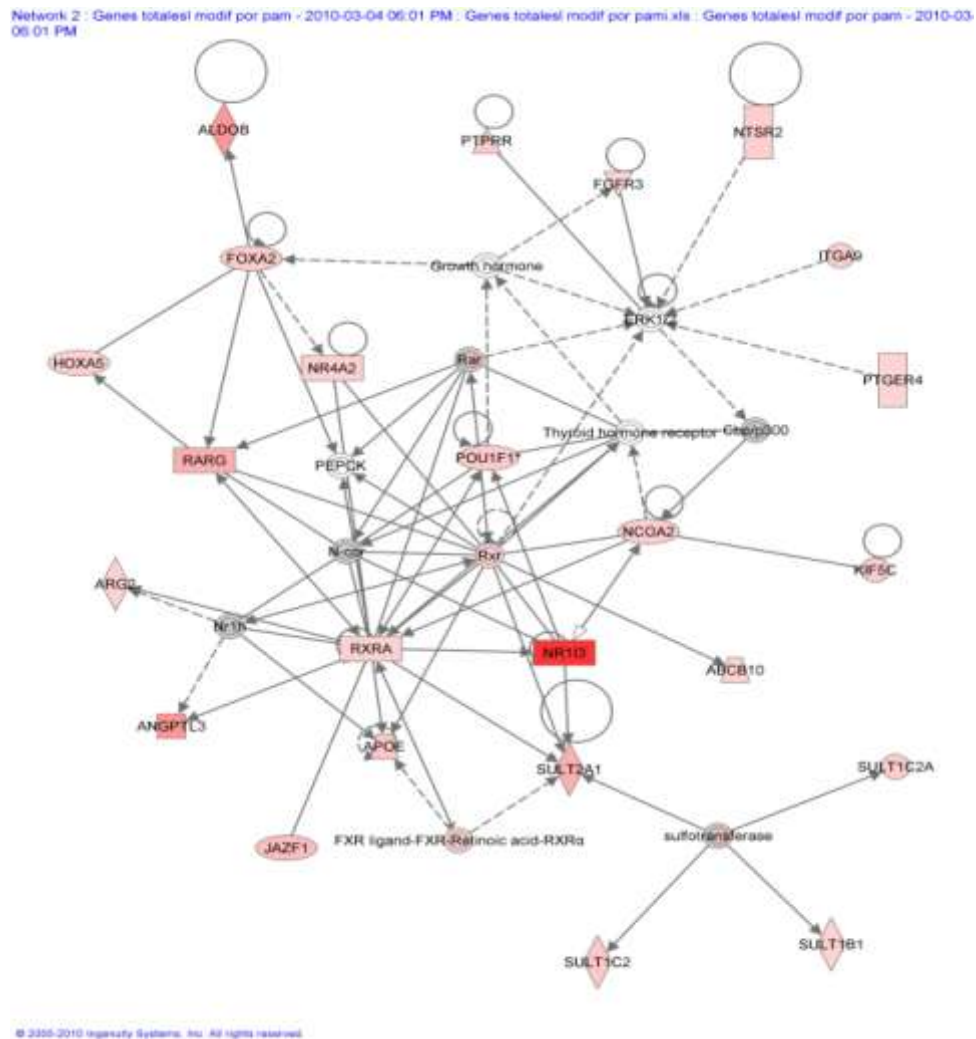


Figura 41: Modificación en la expresión de genes implicados en la respuesta a ácido retinoico. Esquema generado a través de la plataforma informática Ingenuity®.

2. Efecto del pamidronato en ratas sanas.

Para caracterizar el efecto inmunomodulador del pamidronato se realizó un protocolo experimental para el estudio de las poblaciones linfocitarias en animales sanos, es decir, no sometidos a ningún protocolo de inducción de colitis. Para ello se llevó a cabo la administración por vía oral de la misma dosis de pamidronato ensayada en los modelos de colitis. Además, se llevó a cabo un estudio temporal, de modo que dicha administración se realizó durante 3, 5 u 8 días.

Los resultados indican que la administración de pamidronato no altera el estado de los animales, lo que se pone de manifiesto por una evolución del peso corporal similar a la del grupo control (Fig. 42). Tampoco se altera el consumo de agua y comida, y la apariencia de los animales es completamente normal.

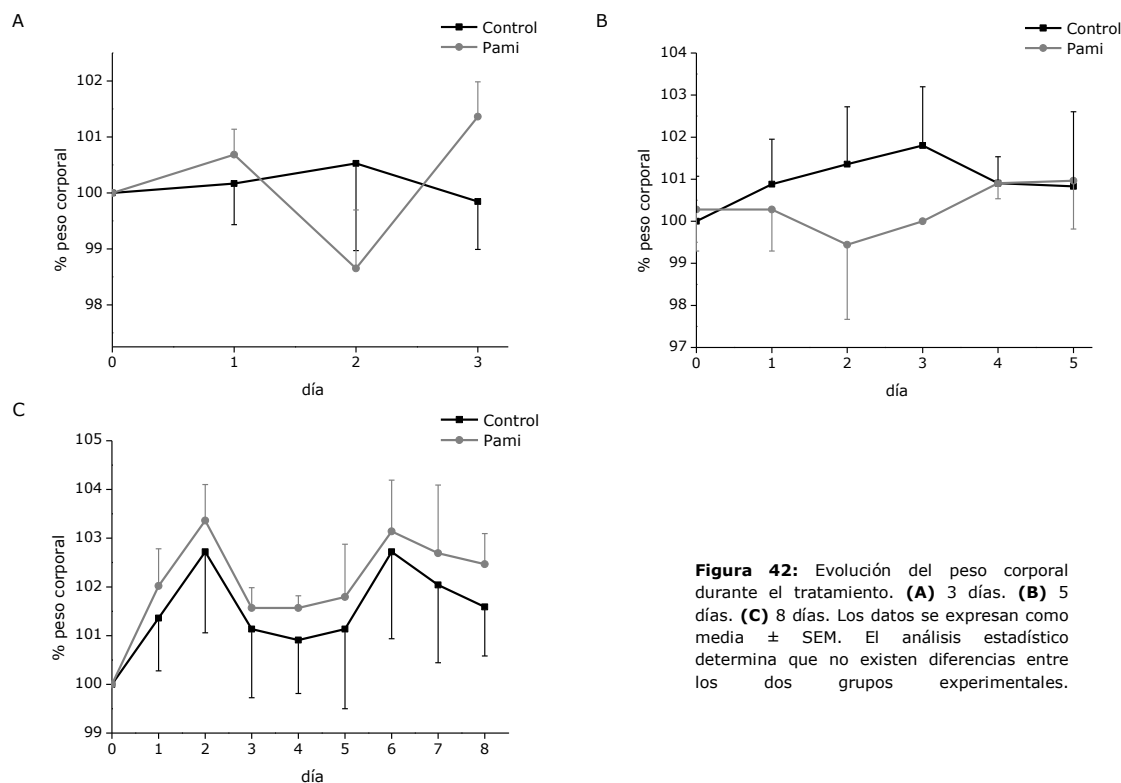


Figura 42: Evolución del peso corporal durante el tratamiento. (A) 3 días. (B) 5 días. (C) 8 días. Los datos se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico determina que no existen diferencias entre los dos grupos experimentales.

El recuento de las células mononucleares de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos muestra un comportamiento característico dependiente del tiempo. Tras la administración durante un período corto (3 días) se produce un aumento del número de células a nivel mesentérico, efecto que desaparece cuando el tratamiento se prolonga a 5 u 8 días (Fig. 43). También se observa un aumento en el número de esplenocitos, pero de forma más tardía, observándose sólo en el tratamiento de 5 días, y normalizándose, al igual que en el caso anterior a los 8 días. Esto puede interpretarse como una infiltración celular que se localiza de forma primaria a nivel local, es decir, a nivel gastrointestinal y que posteriormente, dos días más tarde, puede observarse a nivel sistémico, es decir, en el bazo. En ambos casos, dicha infiltración es reversible, y sólo dos días después (día 5 y 8 respectivamente), se encuentra normalizado, siendo equivalente al del grupo control.

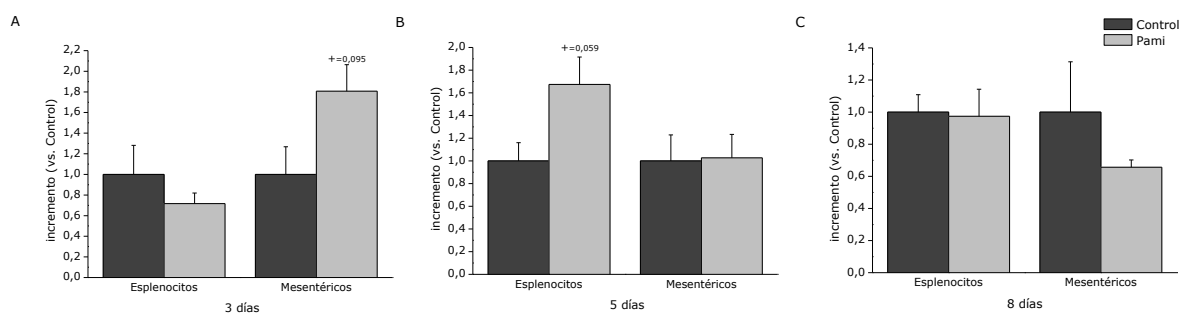


Figura 43: Recuento de células mononucleares en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos en los tratamientos de 3 (A), 5 (B) y 8 (C) días. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Pami=pamidronato.

En cuanto a la secreción de citoquinas, se confirma esta secuencia temporal, de forma que la producción aumenta tempranamente en las células de ganglios mesentéricos, especialmente en el caso de IFN- γ e IL-2, siendo patente dicho aumento ya en el día 3 y acentuándose en el día 5 (Fig. 44.B). En el bazo, el aumento de citoquinas sólo se manifiesta a partir del día 5, siendo igualmente más notorio en el caso de IFN- γ e IL-2 (Fig. 44.A). En cualquier caso, los valores tienden a normalizarse ya en el día 8, lo que coincide con la población celular observada en el punto anterior. No se observan diferencias significativas en la secreción de TNF- α .

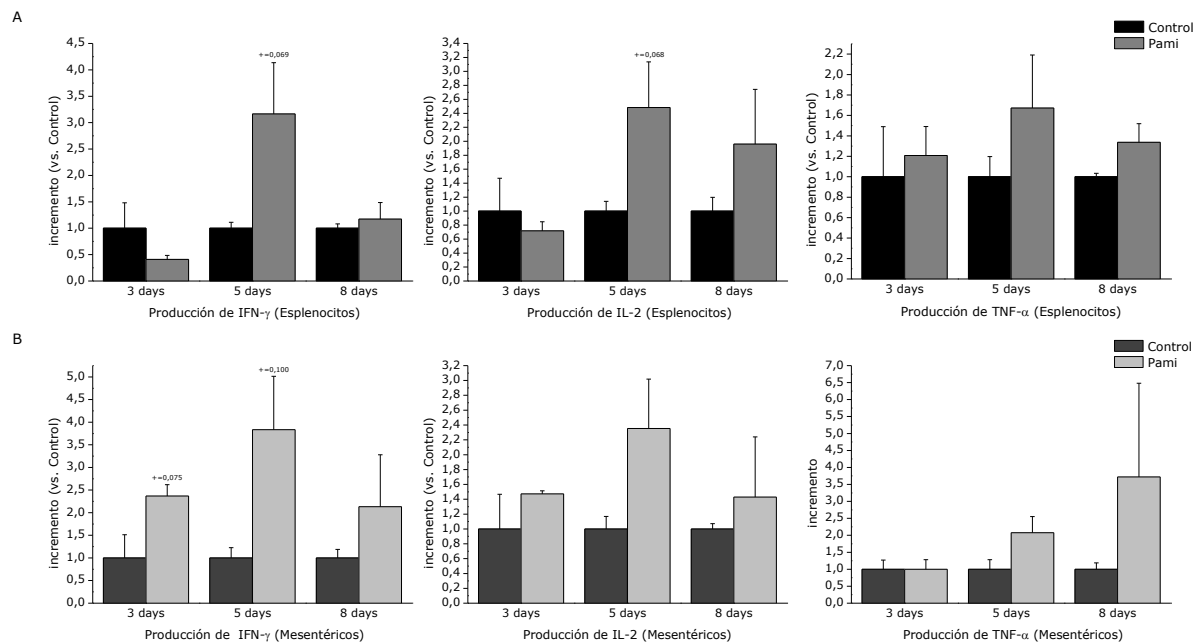


Figura 44: producción de citoquinas en células mononucleares procedentes de bazo (**A**) y ganglios linfáticos mesentéricos (**B**) tras el estímulo con concanavalina A (5 μ g/ml). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control, media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Pami=pamidronato.

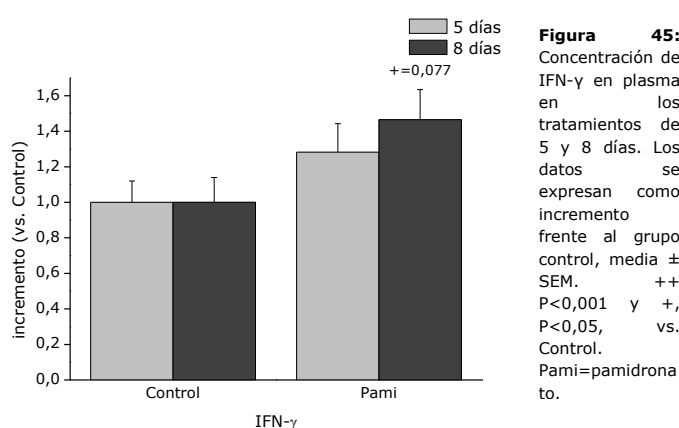


Figura 45: Concentración de IFN- γ en plasma en los tratamientos de 5 y 8 días. Los datos se expresan como incremento frente al grupo control, media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Pami=pamidronato.

La modulación sobre la secreción de citoquinas por parte de células mononucleares concuerda con los niveles de citoquinas encontrados en plasma. Así, los niveles de IL-2 o TNF- α no son detectables en el plasma de ninguno de los animales experimentales, sin embargo, existen modificaciones en los valores de IFN- γ . La administración de pamidronato dio lugar a un incremento en el IFN- γ a nivel sistémico, es decir, en el plasma; dicho aumento se percibe ya a los 5 días de tratamiento y se acentúa a los 8 (Fig. 45).

Junto a la producción de citoquinas, se evaluó la posible modulación de la actividad de los linfocitos T reguladores, y para ello se midió la expresión de Foxp3, factor de transcripción fundamental en el desarrollo y función de dichas células inmunes. Los resultados obtenidos mediante Western Blot en el homogenado de esplenocitos muestran un aumento en la expresión mayor a los 8 que a los 5 días (Fig. 46.A y B). En cambio, este efecto parece estar limitado a los 5 días en los ganglios linfáticos mesentéricos (Fig. 46. A y C).

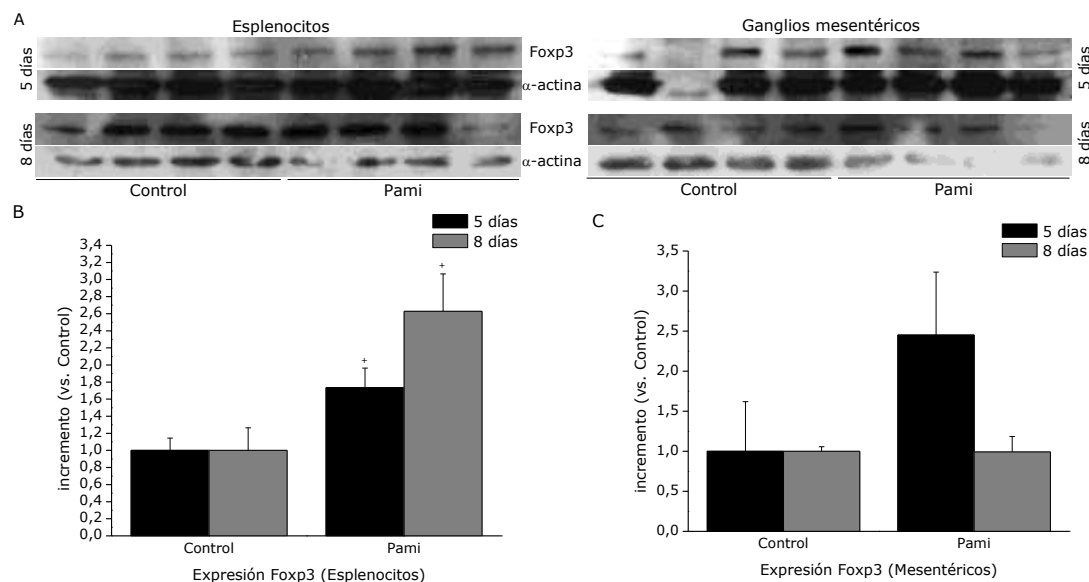


Figura 46: Expresión de Foxp3 en células de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos sin incubación en el tratamiento de 5 y 8 días. (A) gels obtenidos mediante Western Blot. (B) cuantificación densitométrica de esplenocitos. (C) cuantificación densitométrica de células de ganglios mesentéricos. Los resultados se expresan como incremento en la ratio de la expresión de Foxp3 y de α -actina, media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ y + $P < 0,05$. Pami=pamidronato.

Para estudiar la inhibición de la prenilación ejercida por parte del pamidronato en el intestino, se utilizó un anticuerpo que reconoce de forma específica la forma no prenilada de la proteína G de pequeño tamaño molecular Rap1A. A nivel gastrointestinal, los resultados en colon y duodeno son ambiguos. A los 5 días, en algunas muestras existe una clara inhibición de prenilación, al igual que en el caso del duodeno; sin embargo, en el tratamiento prolongado a 8 días, no existen diferencias entre los dos grupos. En cualquier caso, los valores obtenidos en la cuantificación densitométrica no son estadísticamente

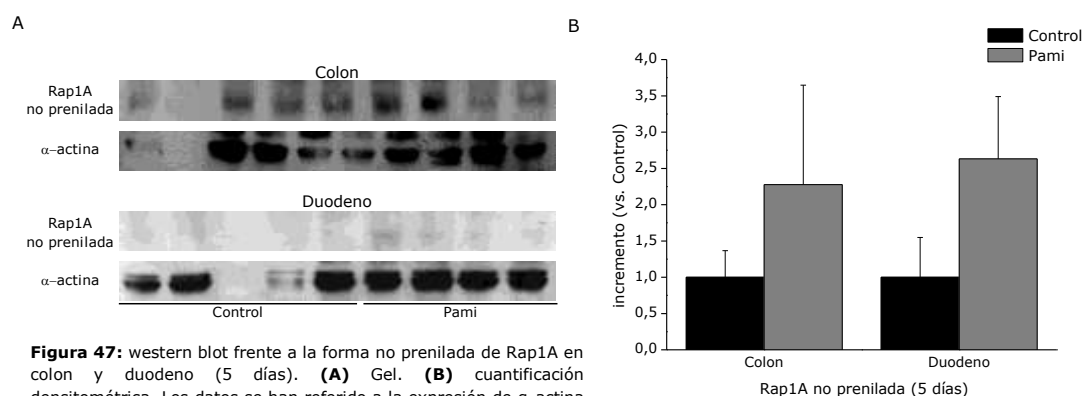


Figura 47: western blot frente a la forma no prenilada de Rap1A en colon y duodeno (5 días). (A) Gel. (B) cuantificación densitométrica. Los datos se han referido a la expresión de α -actina y se expresan como incremento frente al grupo control, media \pm SEM.

significativos, por lo que hemos de asumir que no existe inhibición de prenilación a este nivel en los períodos estudiados o, al menos, que no se produce de forma sostenida ni consistente (Fig. 47 y 48).

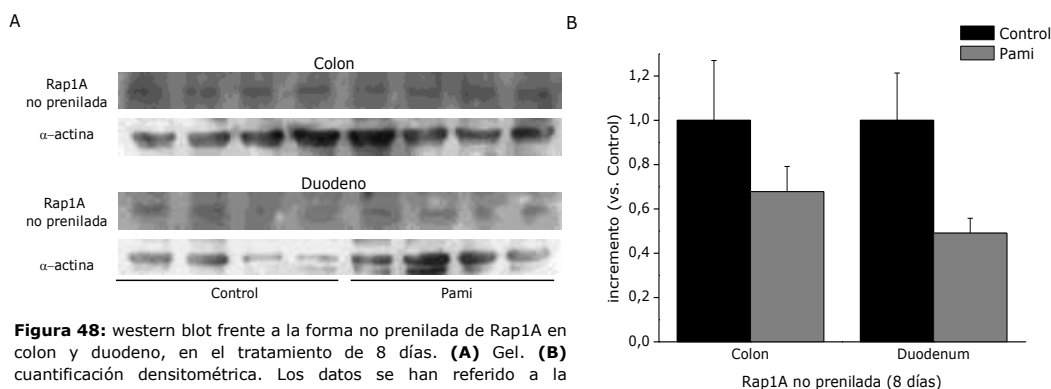


Figura 48: western blot frente a la forma no prenilada de Rap1A en colon y duodeno, en el tratamiento de 8 días. **(A)** Gel. **(B)** cuantificación densitométrica. Los datos se han referido a la expresión de α -actina y se expresan como incremento frente al grupo control, media \pm SEM.

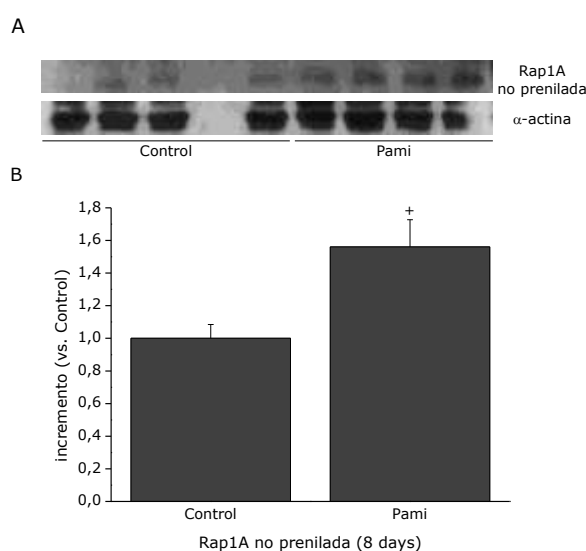


Figura 49: prenilación en el bazo de los animales sometidos al tratamiento de 8 días. Los datos se han referido a la expresión de α -actina y se expresan como media \pm SEM del incremento frente al grupo control. + $P < 0,05$ vs. Control. Pami=pamidronato.

esplenocitos o de células obtenidas a partir de ganglios linfáticos mesentéricos (no mostrado).

3. Estudios *in vitro*.

El objetivo de estos ensayos *in vitro* es el de caracterizar el mecanismo de acción del efecto antiinflamatorio y/o inmunomodulador de los bisfosfonatos nitrogenados, y concretamente del alendronato y pamidronato, una vez que dicho efecto ha sido demostrado mediante los ensayos *in vivo* expuestos anteriormente. Con este fin se ha elegido una serie de compuestos dentro de este grupo, siendo los compuestos principales alendronato y pamidronato, a los que se une un tercero que carece de efecto antiinflamatorio en el modelo de TNBS, el ibandronato. Los tres compuestos pertenecen a la segunda generación de bisfosfonatos, los nitrogenados, y por tanto, su mecanismo de acción como fármacos antirresortivos depende de la inhibición de la prenilación de proteínas.

Además de estos tres compuestos, se ha empleado el etidronato, bisfosfonato de primera generación, que carece de nitrógeno en su composición y cuyo mecanismo de acción se basa en la inducción de apoptosis de los osteoclastos; y otros dos bisfosfonatos nitrogenados de última generación y, por consiguiente, más potentes que los anteriores: el risedronato y zoledronato. De este modo se abarca un amplio abanico de compuestos (Tabla 5), lo que permite la comparación entre ellos para dilucidar y caracterizar el mecanismo de acción. La concentración empleada fue elegida en función de los resultados preliminares sobre la modulación de secreción de IL-8 en enterocitos, y es de 100 μM . En algunos casos se han realizado curvas de concentración en las que se incluyen, además de la anterior, las concentraciones de 1 y 10 μM .

Bisfosfonatos			Otros inhibidores	
Clásicos (no nitrogenados)	Nitrogenados		Inhibidores directos o indirectos de la prenilación	
	1ª generación	Última generación	Estatinas: inhibidores de HMGCo-A reductasa	Inhibidores de enzimas de la prenilación
Etidronato	Alendronato Ibandronato Pamidronato	Risedronato Zoledronato	Mevalonina (lovastatina)	FTI-277 GGTI-298

Tabla 5: Relación de las sustancias incluidas en los experimentos *in vitro*.

Por otro lado, han sido introducidos en el estudio tres moléculas que interfieren en la vía de la prenilación. En primer lugar, la mevalonina o lovastatina (5 μM), una estatina, que inhibe a la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa y por tanto impide la síntesis de los restos isoprenoides necesarios para la prenilación. Junto a este fármaco se han empleado dos inhibidores de las principales enzimas participantes en la prenilación: el FTI-277, inhibidor de la farnesil transferasa, y el GGTI-298, inhibidor de la geranilgeranil transferasa. De este modo se completa el repertorio de sustancias empleadas en los ensayos *in vitro* (Tabla 5).

En cuanto a los modelos celulares empleados, el propósito ha sido el de abarcar los tipos celulares más importantes en la respuesta inmune implicada en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y la interacción entre ellos, esto es, enterocitos, como parte fundamental de la respuesta inmune innata a nivel de la barrera epitelial; y células mononucleares, a partir de las cuales se ha hecho una separación o purificación para distinguir entre linfocitos T y macrófagos. En el caso de los enterocitos se han empleado tres líneas celulares diferentes, dos de ellas de origen humano, Caco-2 y HT29, y una de rata, IEC18. La línea celular Caco-2 (HTB-37TM ATCC[®]) procede de un adenocarcinoma de colon de un varón caucásico de 72 años de edad y tiene carácter tumorigénico, al igual que la otra línea de origen humano, HT29 (HTB-38TM ATCC[®]), procedente de un adenocarcinoma colorrectal de una mujer de 44 años. Sin embargo, las células IEC-18 (CRL-1589TM ATCC[®]) son no tumorales y proceden de íleon de rata. El estudio de las células mononucleares se ha llevado a cabo mediante experimentos *ex vivo*, en los que los cultivos primarios se han obtenido a partir del bazo de rata, ya que la cantidad de células contenidas en dicho órgano linfóide es muy elevada, por lo que facilitaba la realización de los experimentos.

En la mayoría de los experimentos se han realizado dos tipos de protocolos, uno a corto plazo, con un período de exposición (24 a 48 horas, según tipo celular y estímulo), y otro a largo plazo (5 a 7 días). El objetivo es distinguir entre los efectos debidos a la acción directa del bisfosfonato de aquéllos que son tardíos como consecuencia de la inhibición de la prenilación de proteínas y la consecuente afectación de la función de dichas proteínas.

3.1. Efecto de bisfosfonatos nitrogenados sobre enterocitos.

3.1.1. Células Caco-2.

En un principio se valoró la toxicidad de los bisfosfonatos sobre la línea celular. Los resultados obtenidos mediante la medida de adhesión por cristal violeta o la liberación de la enzima LDH muestran que alendronato, ibandronato y pamidronato no son tóxicos para dichas células ni en el protocolo temprano ni en el tardío (Fig. 50). Aunque se observó un incremento significativo de LDH con la concentración 10 μM de pamidronato al cabo de una semana. Es poco probable que esto represente un efecto tóxico real, dado que concentraciones 10 veces mayores no produjeron efecto alguno (Fig. 50.D).

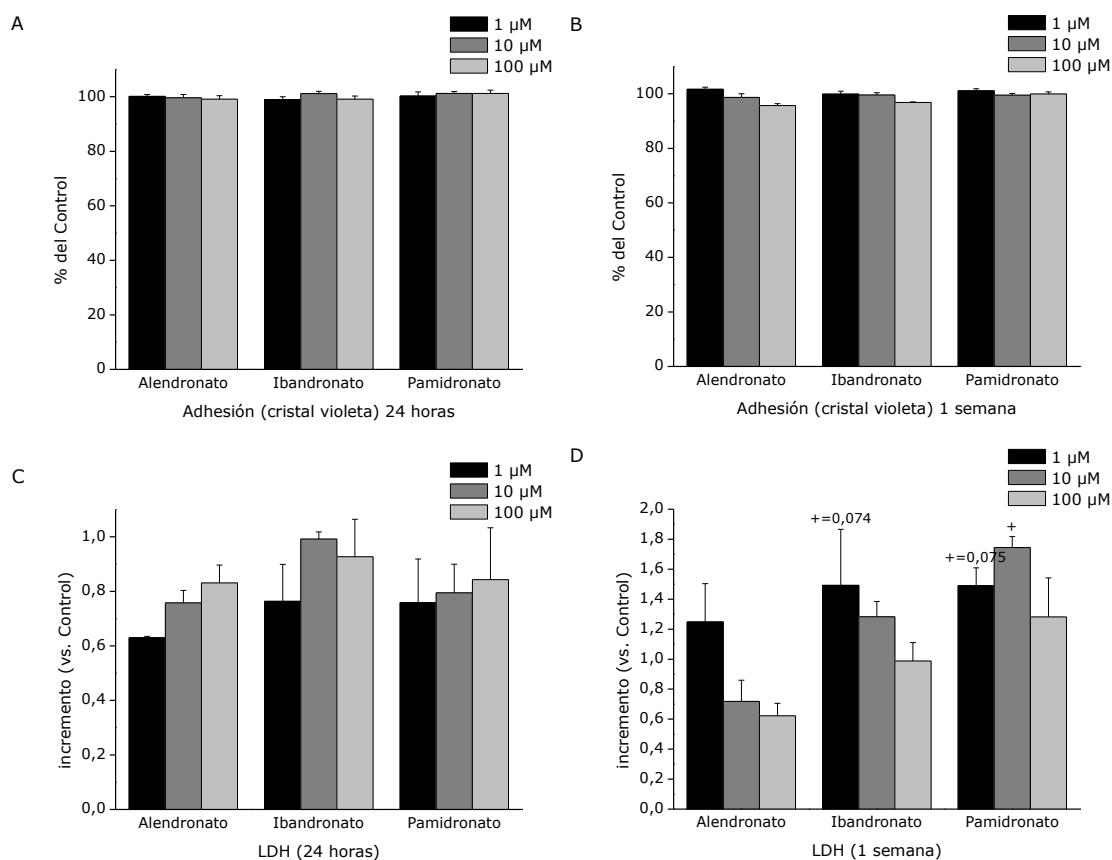
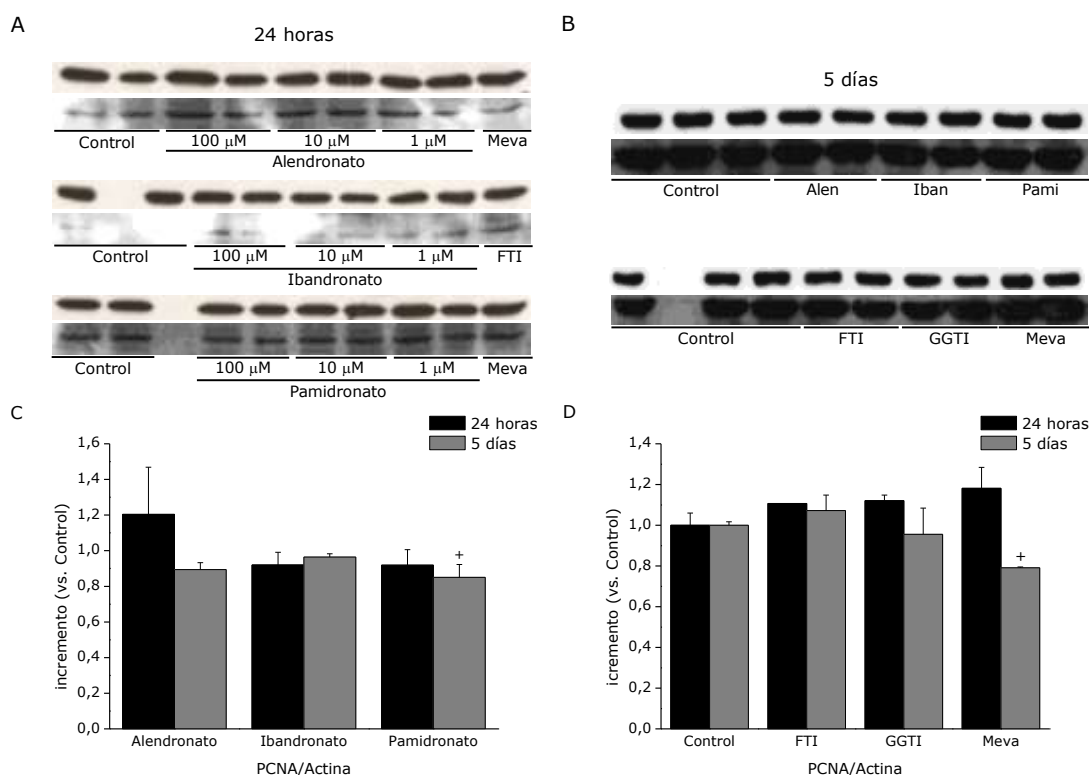
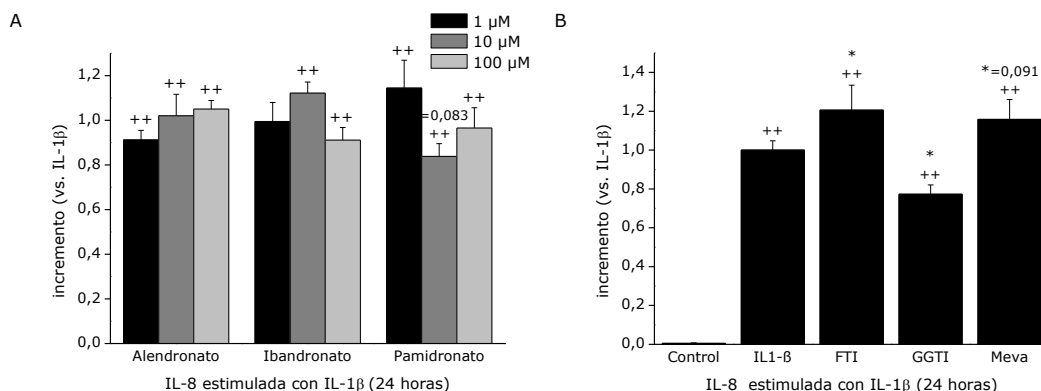


Figura 50: Toxicidad celular: adhesión por cristal violeta (**A y B**) y actividad LDH en el medio de cultivo (**C y D**). La incubación con los bisfosfonatos fue de 24 horas (**A y C**) o de 1 semana (**B y D**). Los resultados se expresan como % de la absorbancia del grupo Control en la técnica de cristal violeta, y como incremento (tanto por uno) frente al grupo control en la actividad LDH. Los valores de actividad para el grupo control fueron de $1,354 \pm 0,183$ y $1,205 \pm 0,083$ mU/ul para los tratamientos de 24 horas y 1 semana, respectivamente. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Los resultados se representan como media \pm SEM.

De forma indirecta, la medida de la proliferación celular o de la inhibición de la misma constituye una prueba de toxicidad celular. Así, se realizó un estudio de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la cual se correlaciona con la actividad proliferativa de las células en cuestión. Tras 24 horas de tratamiento, ninguno de los bisfosfonatos ni de los controles empleados muestra modulación de la proliferación celular; sin embargo, el pamidronato y la mevalonina disminuyen dicha actividad, sin superar el 20% en ninguno de los casos (Fig. 51).



La IL-8 es una quimioquina de la familia CXC que desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria aguda, mediante la



atracción de neutrófilos y otras células inflamatorias.

La exposición a alendronato, ibandronato o pamidronato durante 24 horas no modifica la secreción de IL-8 estimulada por IL-1 β (Fig. 52.A), mientras que FTI-277 incrementa y GGTI-298 disminuye dicha secreción (Fig. 52.B). Los valores de IL-8 en células no estimuladas no son detectables en el sobrenadante mediante ELISA en el tratamiento de 24 horas (no mostrado).

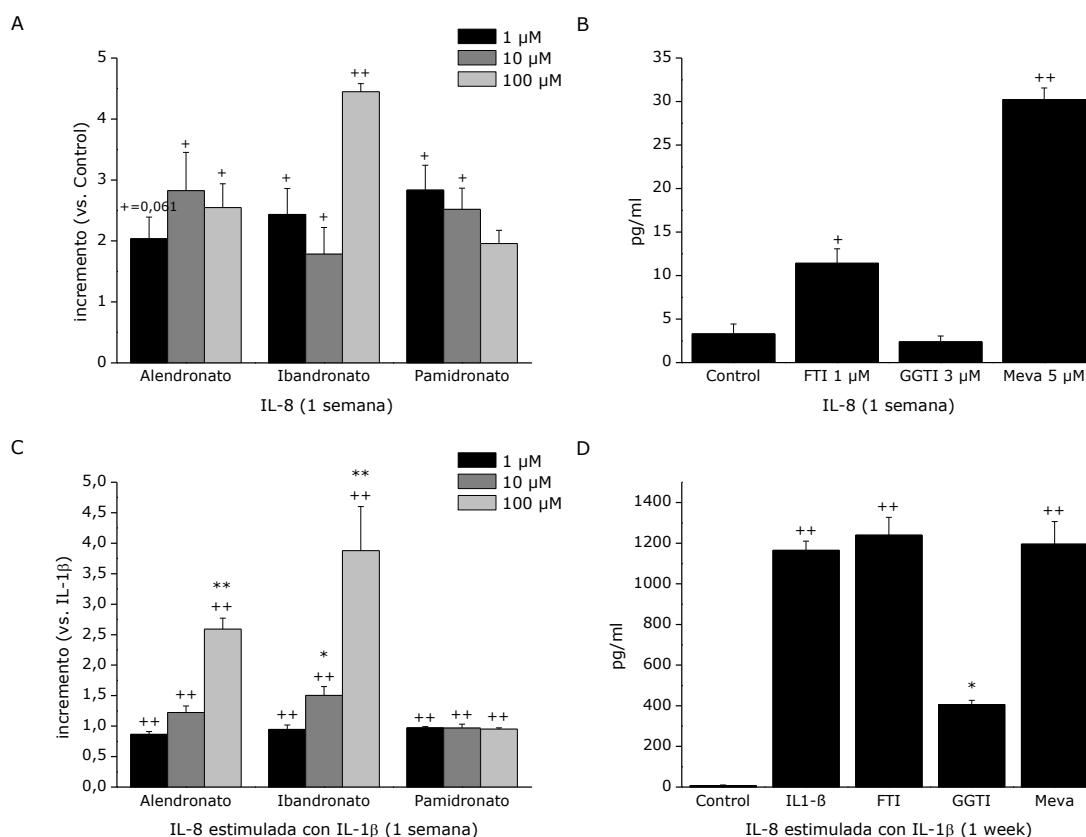


Figura 53: Secreción de IL-8 estimulada con IL-1 β en el tratamiento de una semana. Los datos se expresan como pg/ml o incremento (tanto por uno) frente al grupo control o al control estimulado con IL-1 β . Las figuras muestran la media \pm SEM. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. IL-1 β .

En el tratamiento de una semana, por el contrario, los bisfosfonatos modulan la secreción de IL-8, en concreto alendronato e ibandronato, éste último de forma más eficaz. El ibandronato (100 μ M) es capaz de incrementar la producción de IL-8 incluso en condiciones basales (Fig. 53. A). En la secreción estimulada por IL-1 β , tanto alendronato como ibandronato tienen un efecto potenciador, aunque este último es más potente, ya que lo hace a una concentración 10 veces menor a la del alendronato (10 μ M) (Fig. 53.C). La mevalonina y el FTI-277 incrementan la producción de IL-8 sobre células sin estimular, siendo el efecto de la estatina 3 veces mayor (Fig. 53.B); mientras que sólo el GGTI-298 es capaz de inhibir la producción de IL-8 cuando las células Caco-2 son estimuladas con IL-1 β (Fig. 53.D).

A continuación, para tratar de establecer las condiciones experimentales idóneas para el estudio del efecto inmunomodulador de los bisfosfonatos sobre los enterocitos, se llevó a cabo un estudio a diferentes tiempos. Las células fueron expuestas a alendronato a una concentración de 100 μM (concentración efectiva y utilizada a partir de ahora en todos los experimentos) durante diferentes períodos de tiempo, en presencia o ausencia de IL-1 β . De igual modo, se estudió el efecto de GGTI-298 y su relación con el tiempo de exposición de las células a dicha sustancia. Los resultados muestran que la exposición a alendronato durante 5 o más días da lugar a un incremento de IL-8 bajo estimulación con IL-1 β (Fig. 54.A). En el caso de GGTI-298, se observa como la capacidad de inhibir la secreción de IL-8 es asimismo dependiente del tiempo de exposición a dicha sustancia, ya que aunque ya se observa a las 24 horas, es mucho mayor tras un período de 1 semana (Fig. 54.B). Por ello, se escogió un período de cinco días para el protocolo de exposición de los bisfosfonatos a largo plazo, siendo de 24 horas el período de exposición corto.

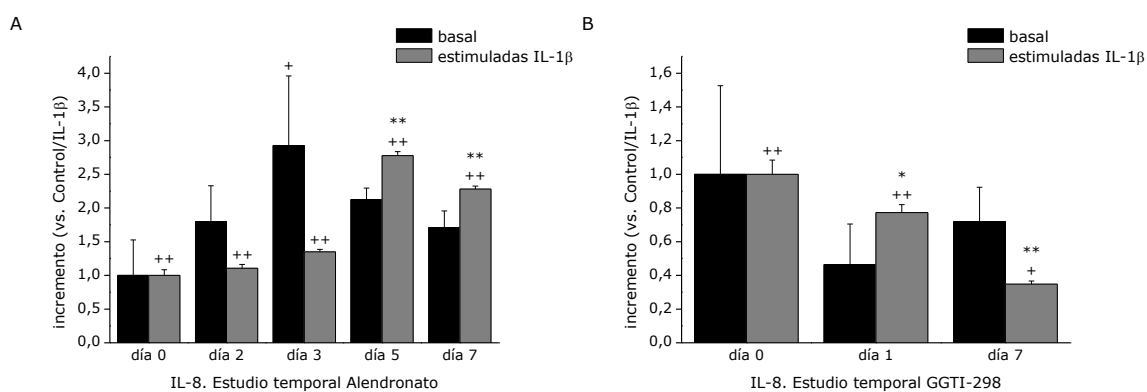


Figura 54: Estudio temporal de la secreción de IL-8 en el tratamiento con alendronato (A) y GGTI-298 (B) en condiciones basales y con IL-1 β . Los datos se han representado como incremento (tanto por uno) frente al grupo control (9,576 \pm 5,032 pg/ml) en el caso de las células no estimuladas, o frente a IL-1 β (977,519 \pm 82,671 pg/ml) en el caso de las células estimuladas. Los valores se expresan como media \pm SEM. P < 0,001 + P < 0,05 vs. Control; ** P < 0,001 * P < 0,05 vs. IL-1 β .

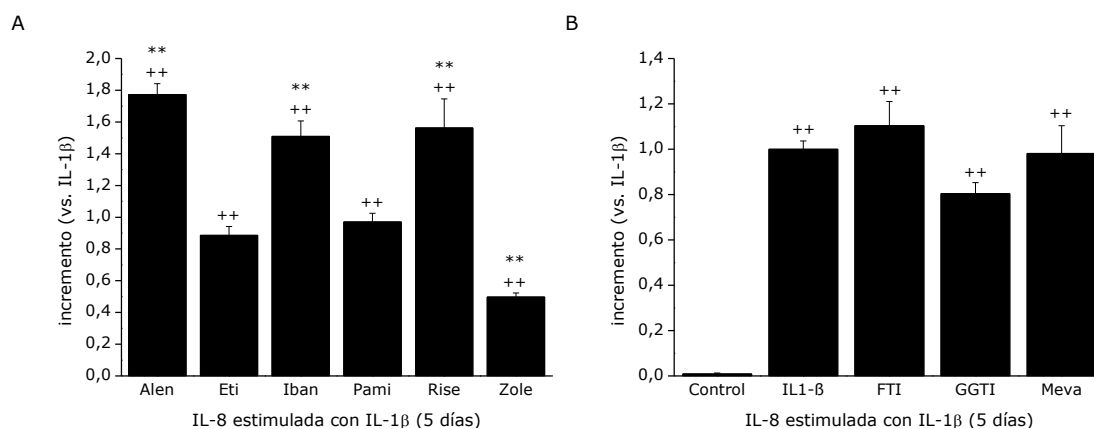
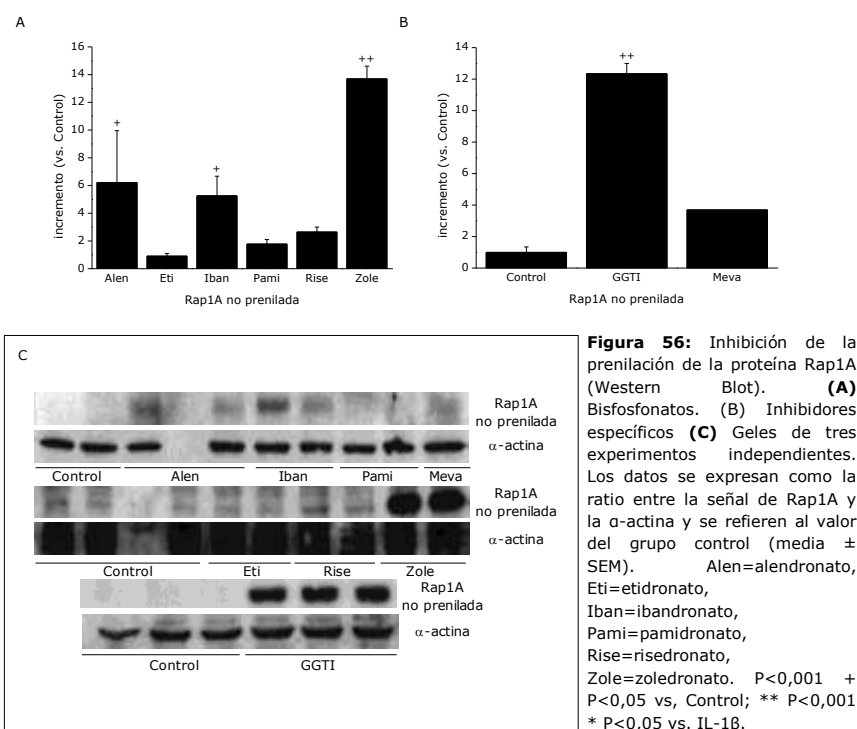


Figura 55: secreción de IL-8 tras cinco días de tratamiento con bisfosfonatos y estímulo con IL-1 β . Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente a las células estimuladas con IL-1 β (1393,845 \pm 50,813 pg/ml). Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. P < 0,001 + P < 0,05 vs. Control; ** P < 0,001 * P < 0,05 vs. IL-1 β .

Los resultados a cinco días, con un repertorio ampliado de bisfosfonatos, muestran que alendronato, ibandronato y risedronato aumentan la secreción de IL-8, mientras que el zoledronato, uno de los más potentes inhibidores de la prenilación, actúa en sentido opuesto, inhibiendo la secreción de dicha quimioquina (Fig. 55.A). Etidronato y pamidronato no tienen efecto alguno. Por el contrario, ninguno de los inhibidores específicos provoca ningún efecto (Fig. 55.B).

Para comprobar si los distintos agentes inhiben efectivamente la prenilación, se empleó un anticuerpo que reconoce de forma específica la forma no prenilada de la proteína Rap1A. Rap1A es una proteína de la familia de proteínas G Rap1, homóloga de la familia Ras; su función está relacionada con la adhesión y migración de linfocitos [977]. La cuantificación del Western blot realizado muestra que los bisfosfonatos que inhiben la prenilación en esta línea celular son precisamente aquellos con un efecto más notorio sobre la secreción de IL-8, junto con el GGTI-298, aunque existen diferencias entre ellos. Así, alendronato e ibandronato quintuplican aproximadamente la señal correspondiente a Rap1A no prenilada, y ambos aumentan la secreción de IL-8 (Fig. 56. A). Dicha inhibición de la prenilación que la producida por zoledronato o GGTI-298 (Fig. 56.A y B), cuyo efecto sobre la IL-8 es opuesto, sin embargo, al de alendronato e ibandronato, es decir, provocan una inhibición en la secreción. En el caso de risedronato se produce una señal apreciable, pero que no superó el umbral de significancia estadística (Fig. 56.C). Es conveniente destacar que etidronato y pamidronato no inhiben la prenilación en nuestras condiciones experimentales (Fig. 56.A).



A continuación analizamos la regulación de dos vías de señalización fundamentales en la respuesta inmune y en la reacción inflamatoria: el factor de transcripción nuclear NF κ B y la cascada de MAP-quinasas, para comprobar si el efecto observado podía estar ligado a una modulación de una de estas vías. Para ello se empleó el mismo estímulo empleado para la inducción de la secreción de IL-8, pero en este caso con un seguimiento de 30 minutos, fijado en ensayos previos (no mostrado). Dado que los efectos de los bisfosfonatos se observan fundamentalmente tras cinco días de tratamiento, estos experimentos se realizaron sólo con este protocolo.

La fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α implica un estado de activación del NF κ B, ya que este paso supone la liberación del dímero, p50-p65 en la mayoría de los casos, para que éste pueda viajar del citoplasma al núcleo y modificar allí la transcripción de diversos genes, dando lugar a la expresión (o represión) de proteínas con un papel importante en la respuesta inmune. La fosforilación inducida por IL-1 β es inhibida de forma estadísticamente significativa por alendronato e ibandronato (Fig. 57.B); aunque también existe una cierta inhibición en el caso de pamidronato y GGTI-298, aunque sin alcanzar la significancia estadística (Fig. 57).

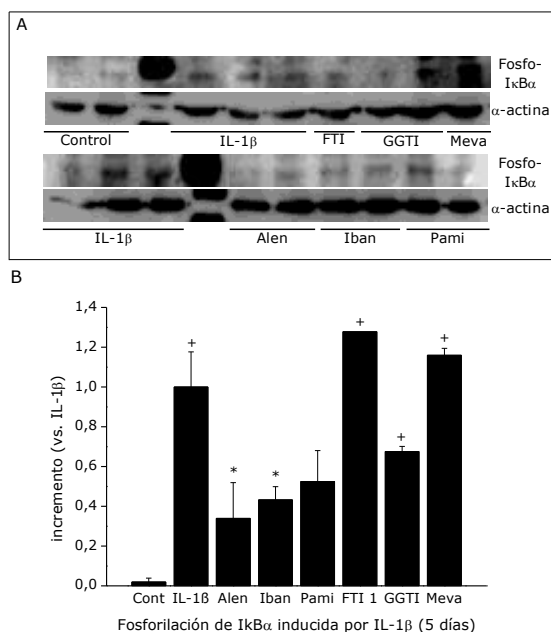


Figura 57: Activación de NF κ B inducida por IL-1 β (30 minutos), valorada a través de la fosforilación de I κ B α . Tratamiento a largo plazo, 5 días de incubación con bisfosfonatos. Los datos se expresan como el incremento frente al grupo tratado únicamente con IL-1 β , refiriendo los resultados a la expresión de α -actina (media \pm SEM). Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. IL-1 β .

Al analizar el efecto de los bisfosfonatos sobre la cascada de fosforilación de MAPquinasas, los efectos son tan variados como notables. La estimulación con IL-1 β da lugar a la fosforilación de las tres MAPk estudiadas, ERK, p38 y JNK, aunque el efecto en el caso de la primera es mucho más moderado, sobre todo si se compara con el de JNK. De hecho, los efectos sobre JNK se

diferencian sustancialmente del resto. Alendronato e ibandronato potencian la fosforilación de ERK y p38, mientras que pamidronato y los controles muestran un efecto opuesto, es decir, inhiben la fosforilación (Fig. 58.C y D). En el caso de JNK, los tres bisfosfonatos muestran una tendencia a la inhibición, pero sólo en el caso del pamidronato llega éste a ser significativo. Por su parte, la mevalonina se comporta de forma equivalente al pamidronato, con una inhibición significativa, mientras que el GGTI-298 es comparable al ibandronato, y la tendencia a la inhibición no llega a alcanzar la significancia estadística (Fig. 58.E).

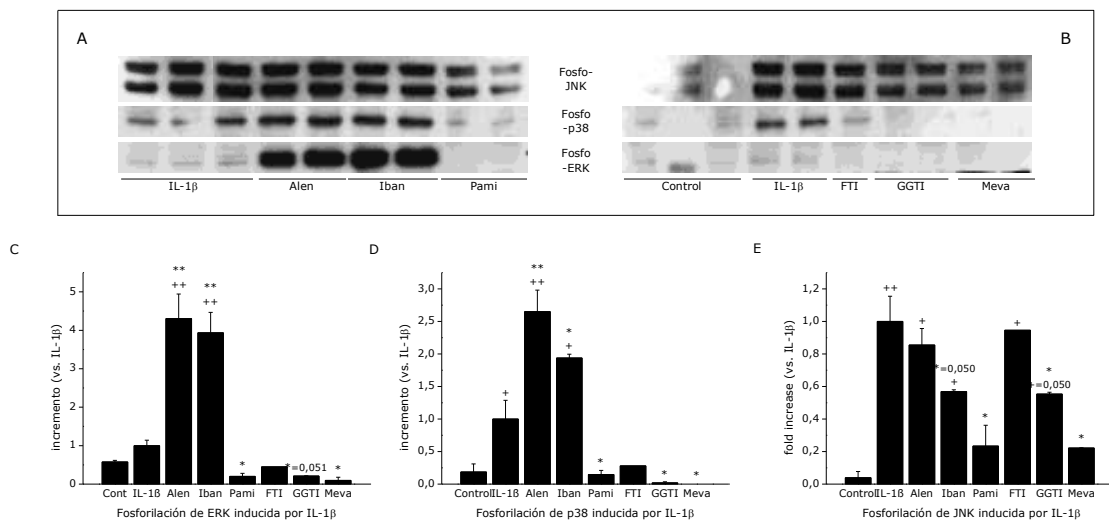


Figura 58: Fosforilación de MAP-quinasas inducida por la IL-1β (30 minutos) en el tratamiento de 5 días con bisfosfonatos (A) e inhibidores específicos (B). Cuantificación densitométrica de ERK (C), p38 (D) y JNK (E), referidas a la señal de α-actina y expresadas como incremento frente a la fosforilación provocada por IL-1β (media ± SEM). Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. IL-1β.

3.1.2. Células HT29.

Esta otra línea celular de epitelio intestinal se empleó para confirmar el efecto inmunomodulador observado sobre las células Caco-2, ejercido fundamentalmente por alendronato, ibandronato y, por otro lado GGTI-298.

Las pruebas de toxicidad celular muestran que sólo el alendronato y el pamidronato a la concentración de 100 μM provocan un aumento de la actividad enzimática LDH tras una semana de tratamiento (Fig. 59.D). En El tratamiento a corto plazo, sólo el Pamidronato a 10 μM incrementa la actividad LDH, aunque la concentración de 100 μM no provoca ningún efecto (Fig. 59.C). Los datos de incremento en la liberación de la enzima LDH no se corroboran en la técnica de cristal violeta.

De forma acorde con los resultados de toxicidad, el alendronato en la exposición de 5 días provoca una disminución de la proliferación celular, como muestra la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Fig. 60. B y C). La mevalonina se comporta de modo similar al alendronato, provocando la disminución de la señal incluso con la exposición de 24 horas (Fig. 60. A.B. y D). Paradójicamente, el ibandronato a 100 μM

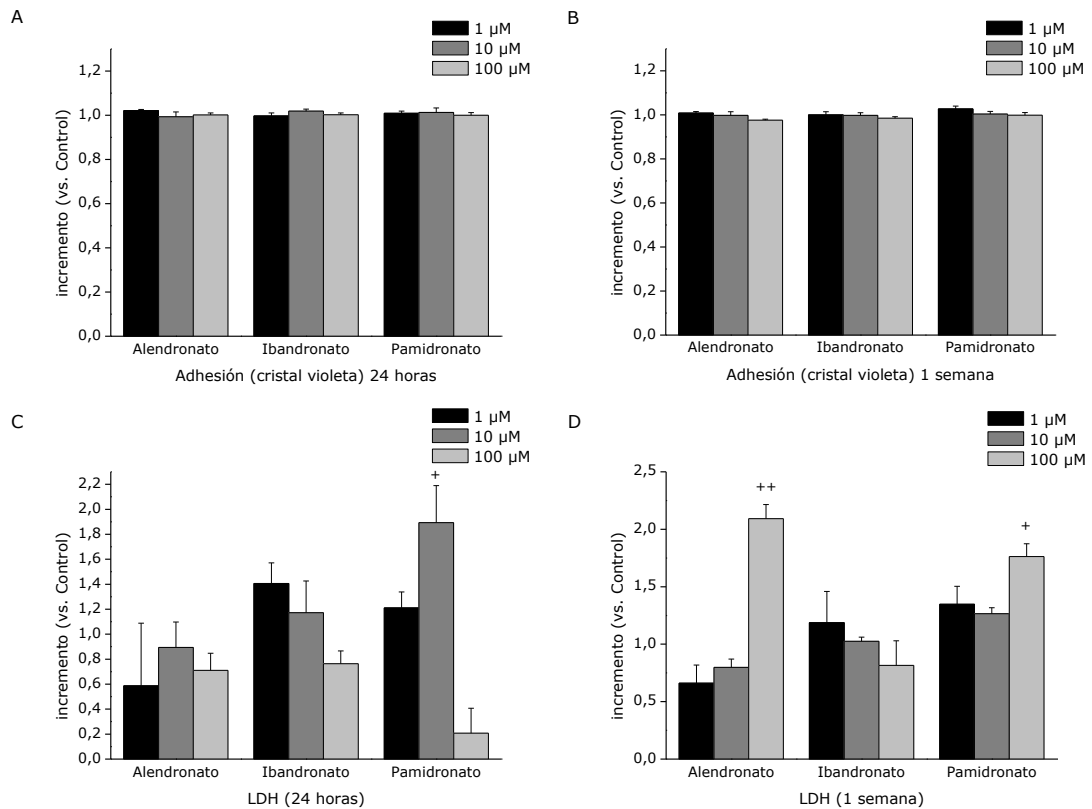


Figura 59: Toxicidad celular: adhesión por cristal violeta (**A y B**) y actividad LDH en el medio de cultivo (**C y D**). La incubación con los bisfosfonatos fue de 24 horas (**A y C**) o de 1 semana (**B y D**). Los resultados se expresan como % de la absorbancia del grupo Control en la técnica de cristal violeta, y como incremento (tanto por uno) frente al grupo control en la actividad LDH. Los valores de actividad para el grupo control fueron de $2,701 \pm 0,979$ y $2,039 \pm 0,194$ mU/ul de LDH para los tratamientos de 24 horas y 1 semana, respectivamente. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control. Los resultados se representan como media \pm SEM.

incrementa la proliferación celular tras 24 horas de tratamiento (Fig. 60. A y C). Estos efectos fueron en general de magnitud bastante reducida.

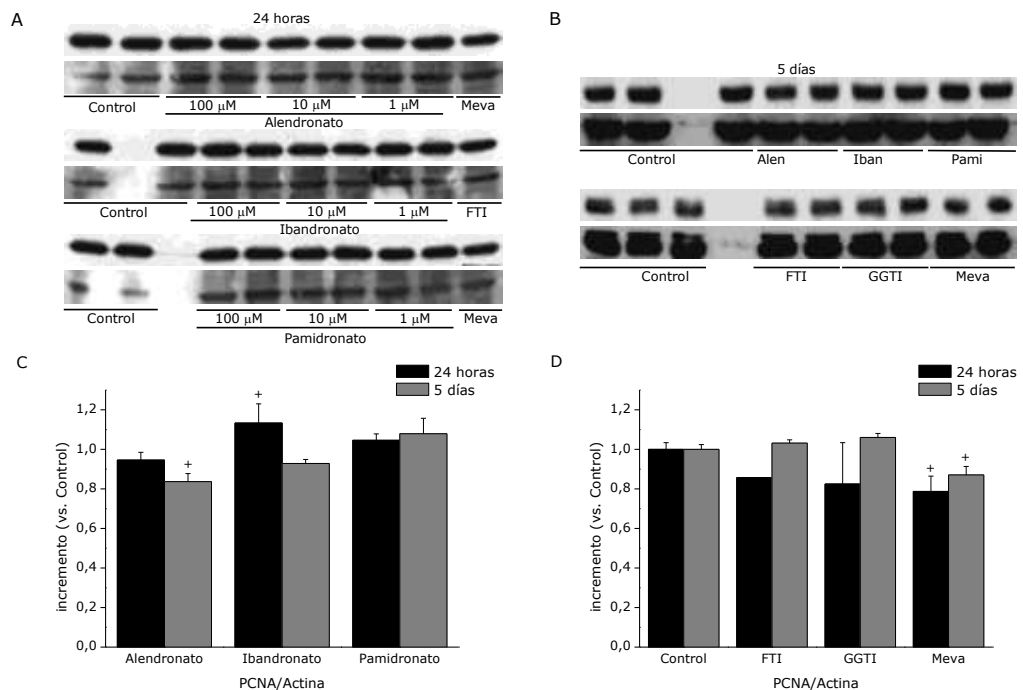


Figura 60: Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Las células HT29 se sometieron al tratamiento con bisfosfonatos durante 24 horas y se midió la expresión de PCNA por Western Blot. Los datos se representan como el incremento (tanto por uno) frente al grupo control (relación entre PCNA y α -actina). Media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control.

A continuación se realizaron ensayos en condiciones de estimulación celular, en este caso con lipopolisacárido (LPS, 1 µg/ml) y, en algunos casos, con TNF-α (10 ng/ml). El efecto de los bisfosfonatos a 24 horas se caracteriza por la inhibición provocada por alendronato y pamidronato a la concentración de 100 µM cuando las células son estimuladas con LPS; mientras que en un estado basal de las células o tras el estímulo con TNF-α, ninguno de los bisfosfonatos tiene efecto alguno. El efecto observado por la concentración 10 µM de ibandronato es poco fiable, ya que una concentración diez veces superior o inferior, no ejerce efecto ninguno. Por su

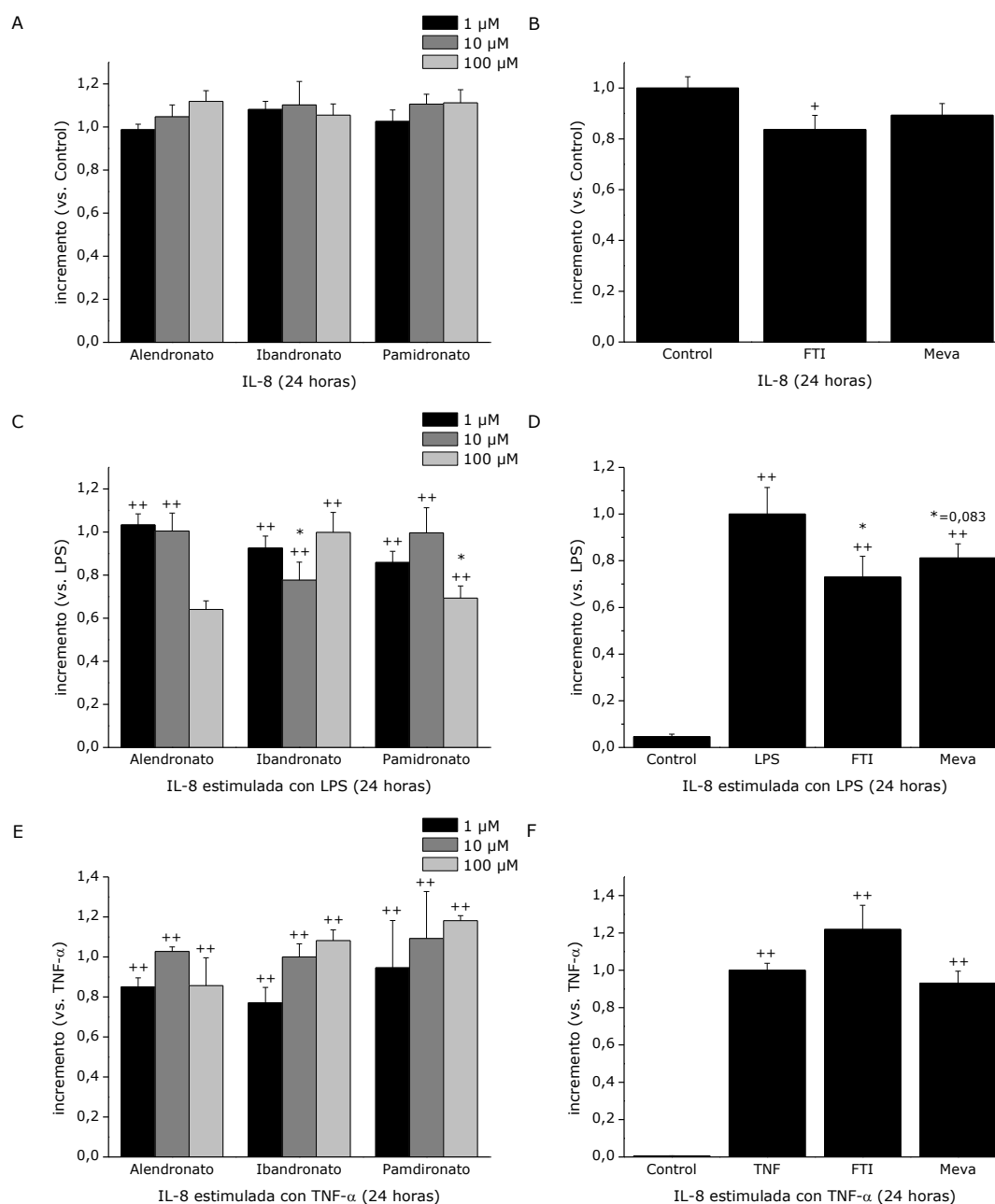


Figura 61: Síntesis de IL-8 en condiciones basales (**A y B**), o con estimulación con LPS (**C y D**) o TNF-α (**E y F**) en el protocolo a corto plazo (24 horas). Los datos se representan como incremento (tanto por uno) frente a las células no estimuladas ($196,332 \pm 8,801$ pg/ml), estimuladas con LPS ($5873,028 \pm 667,785$ pg/ml) o TNF-α ($24762,223 \pm 939,472$ pg/ml), según se indica en la gráfica. Estos resultados se representan como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. IL-1β.

parte, entre los controles incluidos en el ensayo, el FTI-277 inhibe la secreción de IL-8 en condiciones basales como bajo estimulación con LPS a corto plazo (Fig. 61).

Tras un período de exposición prolongado (una semana), la respuesta se asemeja a la observada en la línea celular Caco-2. Alendronato e ibandronato potencian la secreción de IL-8 tanto en el estado basal como cuando las células son estimuladas con LPS, pero en este caso el efecto del alendronato es mayor (Fig.62). En cambio, en el experimento con TNF- α , el

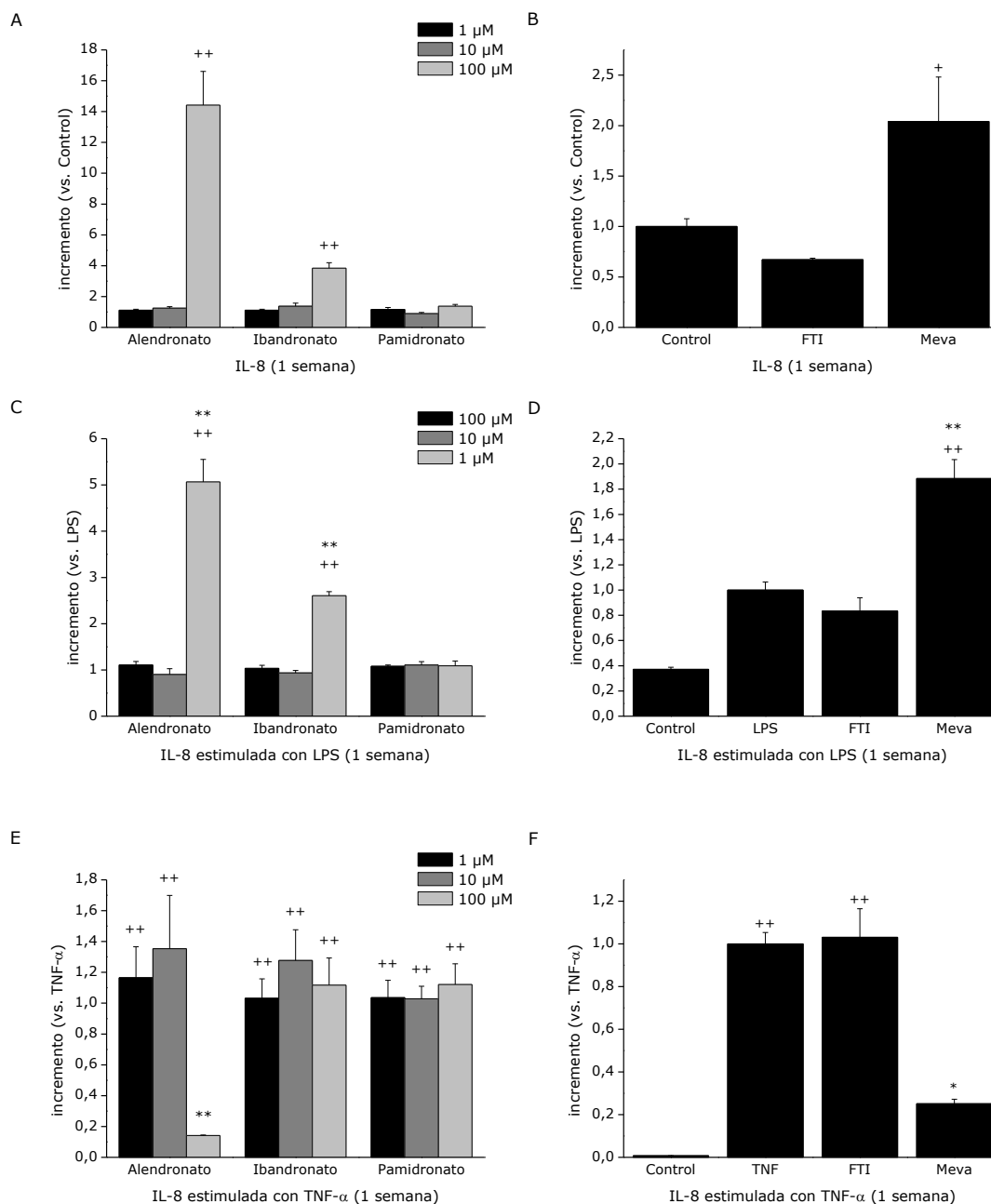
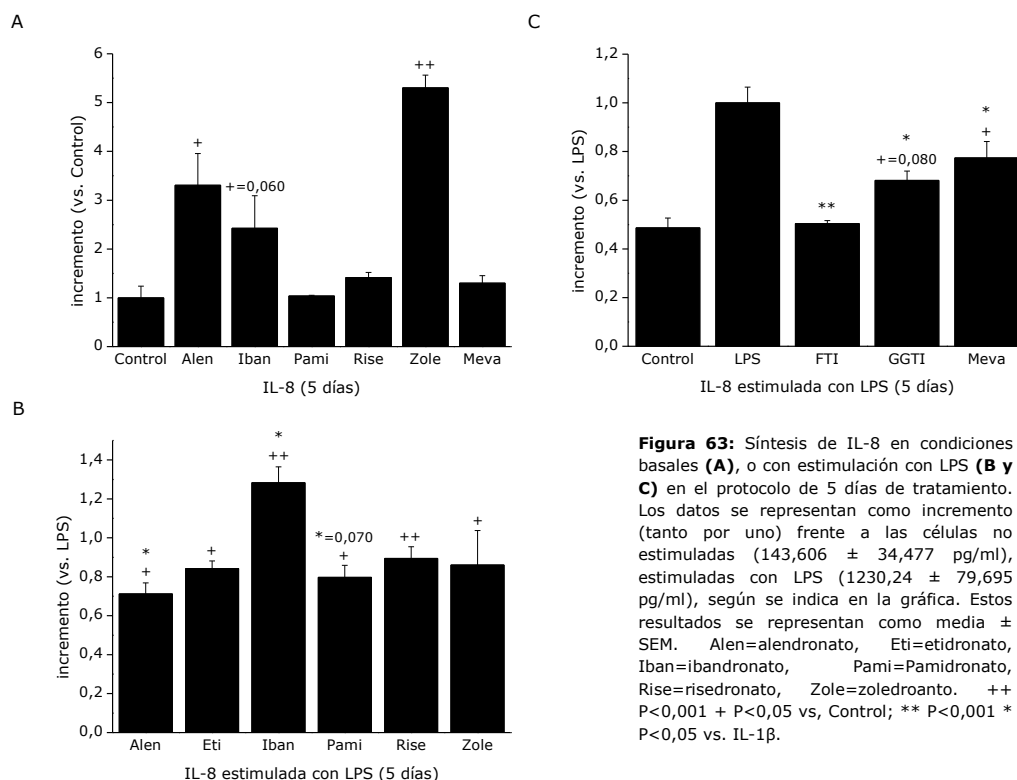


Figura 62: Síntesis de IL-8 en condiciones basales (**A y B**), o con estimulación con LPS (**C y D**) o TNF- α (**E y F**) en el protocolo a largo plazo (1 semana). Los datos se representan como incremento (tanto por uno) frente a las células no estimuladas ($307,73 \pm 13,688$ pg/ml), estimuladas con LPS ($828,73 \pm 52,589$ pg/ml) o TNF- α ($21789,8 \pm 1171,379$ pg/ml), según se indica en la gráfica. Estos resultados se representan como media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. IL-1 β .

alendronato inhibe la secreción de IL-8, aunque el nivel de secreción en este caso es mucho mayor que cuando las células fueron tratadas con LPS ($828,73 \pm 52,589$, con LPS; $21789,8 \pm 1171,379$, con TNF- α), y por tanto, esto no se opone necesariamente a los resultados de potenciación vistos anteriormente (Fig. 62). Por su parte, la mevalonina se comporta de forma comparable al alendronato, aumentando la IL-8 en condiciones basales y bajo estimulación con LPS, mientras que inhibe la secreción de la quimioquina inducida con TNF- α , lo que apoya el hecho de un impedimento en la comparación de los resultados obtenidos con estos dos estímulos, ya que la activación conseguida con el TNF- α es mucho mayor que la obtenida con LPS, del orden de 50 veces mayor.

Por último, el comportamiento a los cinco días de tratamiento es algo más complejo. A nivel basal, y de forma similar a las células Caco-2, alendronato, ibandronato y, sobre todo, zoledronato, aumentan la secreción de IL-8, mientras que risedronato y mevalonina carecen de efectos significativos (Fig. 63.C). Sin embargo, al estimular las células con LPS, sólo el ibandronato potencia la producción de la quimioquina, mientras que alendronato disminuye la misma (Fig. 63.A). Los tres controles, FTI-277, GGTI-298 y mevalonina, inhiben la producción de IL-8, siendo el primero el más eficaz (Fig. 63.B).



Aunque alendronato, ibandronato y mevalonina parecen inhibir mínimamente la prenilación, como se muestra en la cuantificación densitométrica del gel de Rap1A (Fig. 64.B), sólo zoledronato y en mayor medida aún GGTI-298 llegan a producir un efecto significativo (Fig. 64).

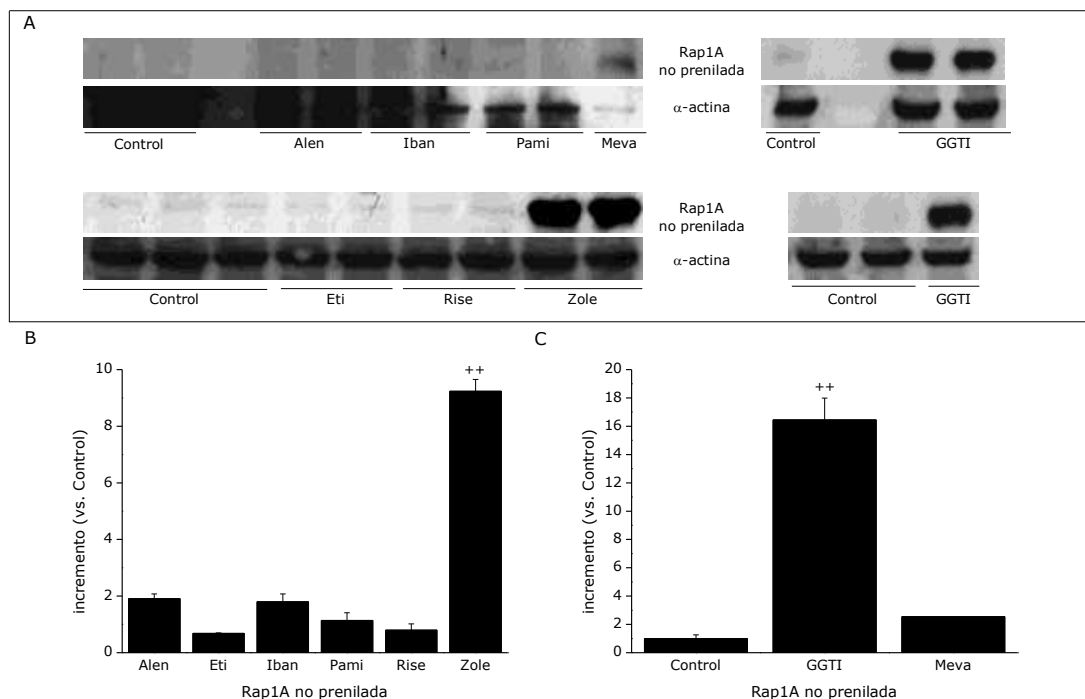


Figura 64: Western Blot para detectar la forma no preñilada de Rap1A. Los resultados se expresan como incremento (tanto por uno) en la ratio entre la señal para Rap1A y para α -actina (media \pm SEM). Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledroanto. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control.

3.1.3. Células IEC18.

Para completar el estudio del efecto de los bisfosfonatos sobre modelos celulares de epitelio intestinal, se incluyó esta tercera línea celular, IEC-18,

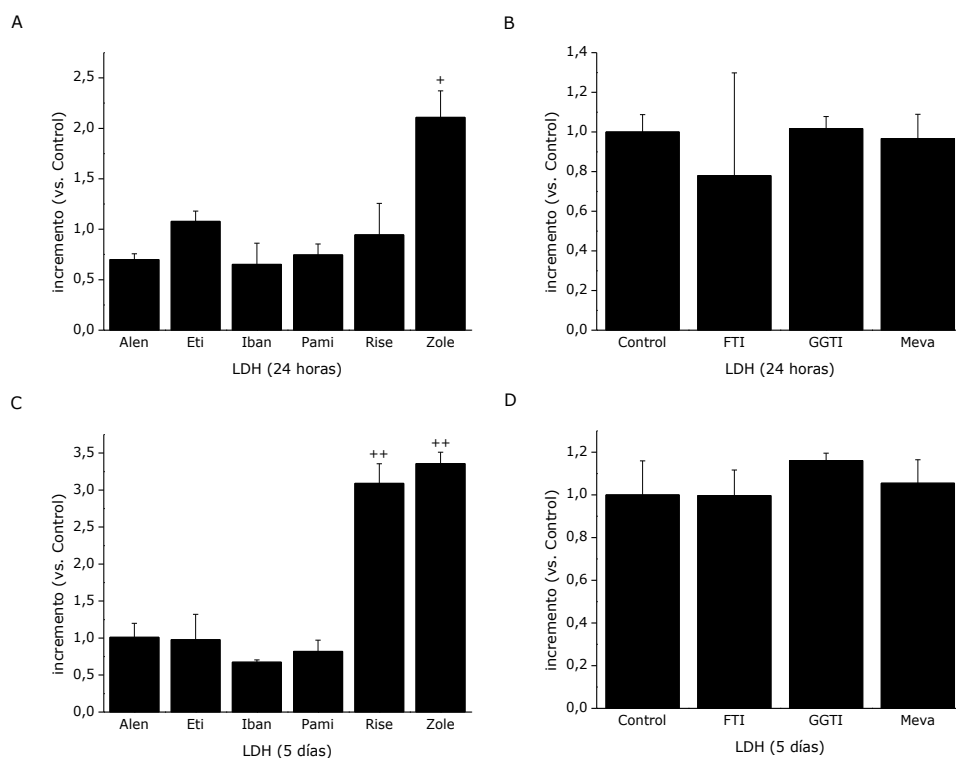


Figura 65: LDH liberada al medio de cultivo en el tratamiento a corto (**A y B**) y a largo plazo (**C y D**). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente a la actividad enzimática en el grupo control (0,359 \pm 0,314 mU/ μ l), considerando la media \pm SEM. Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledroanto. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control

ya que procede de rata y además, no presenta un carácter tumoral. Estas dos características nos permiten establecer si el efecto es dependiente de la especie y emplear un modelo que se asemeja en mayor medida a la fisiología de un epitelio normal, con un crecimiento normal y no un carácter tumoral.

Aunque en la valoración de la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo celular sólo risedronato y zoledronato dan lugar a toxicidad celular en el tratamiento de 5 días, o incluso tras 24 horas en el caso de zoledronato (Fig. 65), los ensayos de adhesión por cristal violeta muestran resultados diferentes. Alendronato, ibandronato, risedronato y zoledronato, es decir, los bisfosfonatos más potentes como fármacos antirresortivos, disminuyen el porcentaje de células adheridas en este modelo, tanto tras 24 horas como tras 5 días de tratamiento (Fig. 66). El efecto observado es dependiente del tiempo, de modo que la pérdida de adhesión provocada por estas sustancias es mayor a los cinco días; y además, el efecto de risedronato y zoledronato, bisfosfonatos de última generación, es más intenso que en el caso de alendronato e ibandronato. La mevalonina provoca una disminución marginal de la viabilidad en el tratamiento a 5 días, aunque dicho efecto es de menor magnitud que el provocado por los bisfosfonatos con capacidad citotóxica (Fig. 66.D). En ningún caso ni etidronato ni pamidronato provocan toxicidad sobre las células IEC-18.

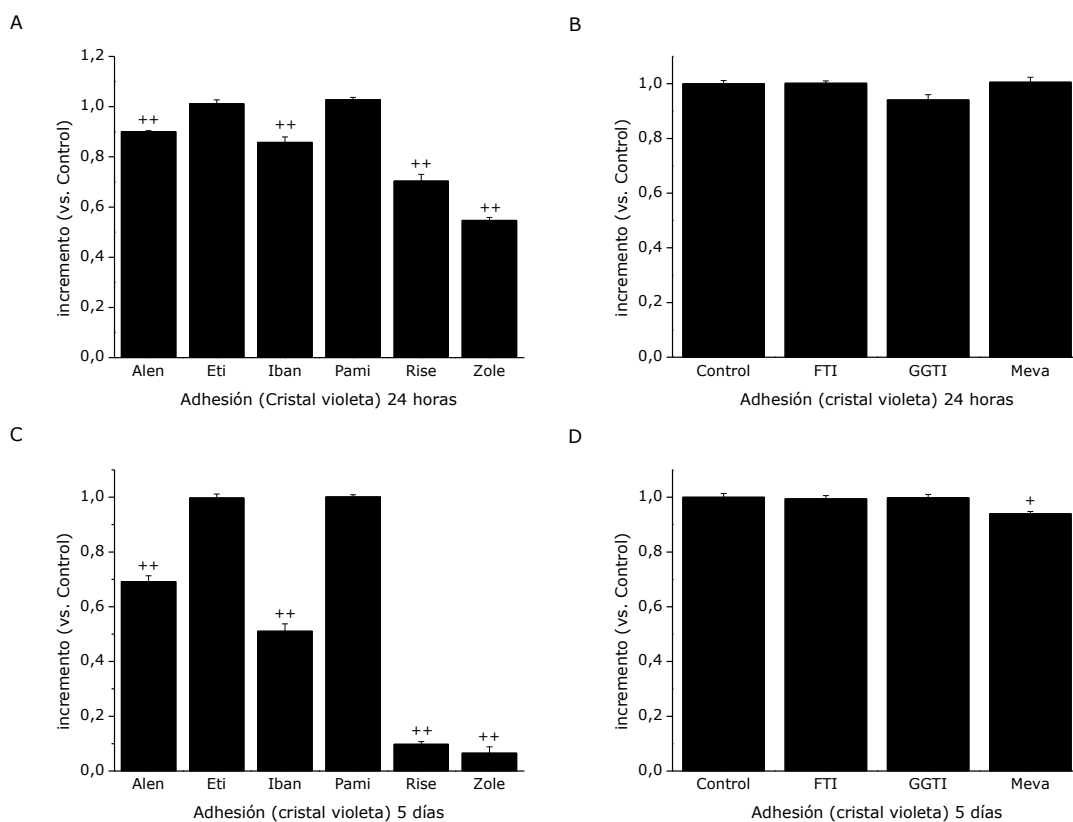


Figura 66: Cristal violeta para la determinación de la capacidad de adhesión en el tratamiento a corto (**A y B**) y a largo plazo (**C y D**). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente a la absorbancia en el grupo control, considerando la media \pm SEM. Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control.

El alendronato provoca un efecto antiproliferativo manifestado por la menor expresión de PCNA tanto en el tratamiento a corto plazo como en el prolongado (Fig. 67.C). De los demás agentes ensayados tan sólo la mevalonina tras 24 horas de tratamiento produjo efectos similares (Fig. 67.D). La toxicidad del alendronato tras cinco días de contacto con las células queda patente en la señal obtenida para α -actina en dichas muestras (Fig. 67.B).

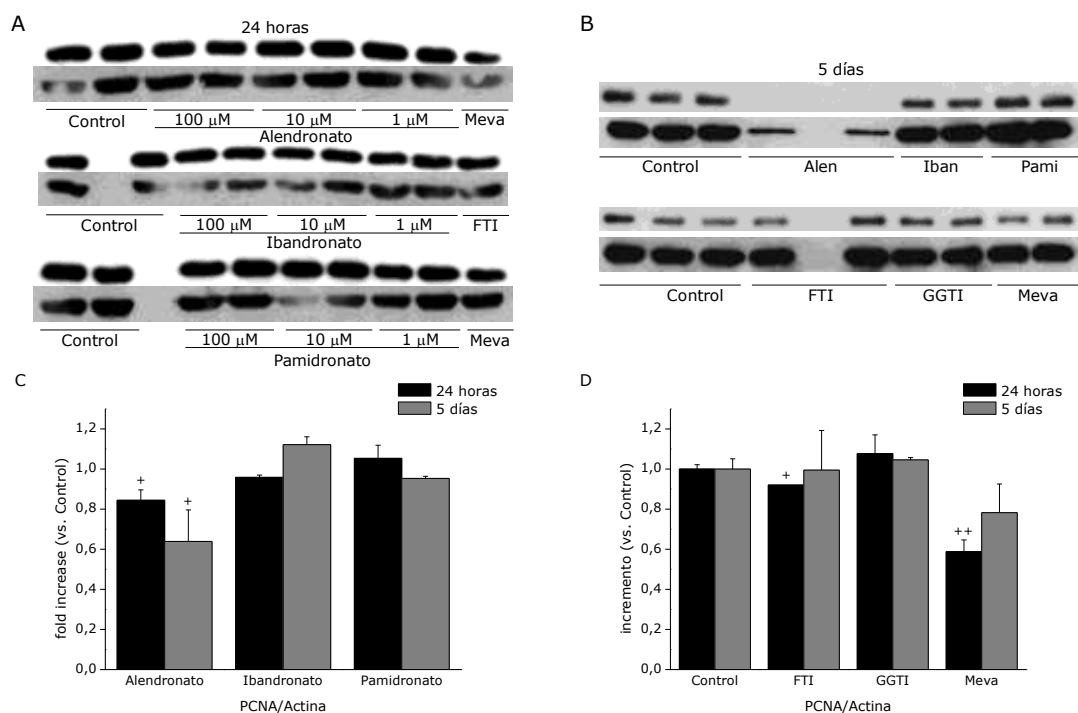


Figura 67: Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Las células IEC18 se sometieron al tratamiento con bisfosfonatos durante 24 horas y se midió la expresión de PCNA por Western Blot. Los datos se representan como el incremento (tanto por uno) frente al grupo control (relación entre PCNA y α -actina). Media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ y +, $P < 0,05$, vs. Control.

La inhibición de la prenilación en la línea celular IEC-18 puede constatarse con todos los bisfosfonatos nitrogenados, así como con el GGTI-298 y la mevalonina, estos dos últimos con un efecto aún mayor (Fig. 68.B). La inhibición es mayor en el caso de alendronato, ibandronato, risedronato y zoledronato, mientras que pamidronato y risedronato dan lugar a un fenómeno de inhibición más moderado. Por su parte, el único bisfosfonato clásico o no nitrogenado empleado, el etidronato, como cabría esperar, no bloquea el proceso de prenilación en esta línea celular (Fig. 68.A).

Dado que los roedores no producen IL-8, se escogió una proteína proinflamatoria para valorar el efecto inmunomodulador de los bisfosfonatos en la línea celular en cuestión. La proteína elegida fue la ciclooxigenasa, enzima crucial en la síntesis de eicosanoides, como la PGE_2 , uno de los mediadores fundamentales en la respuesta inflamatoria. Al igual que en el caso de la IL-8, la modulación de la expresión y las posibles vías implicadas se han estudiado tras la exposición de los enterocitos en cuestión a los bisfosfonatos durante un período de tiempo corto y otro prolongado.

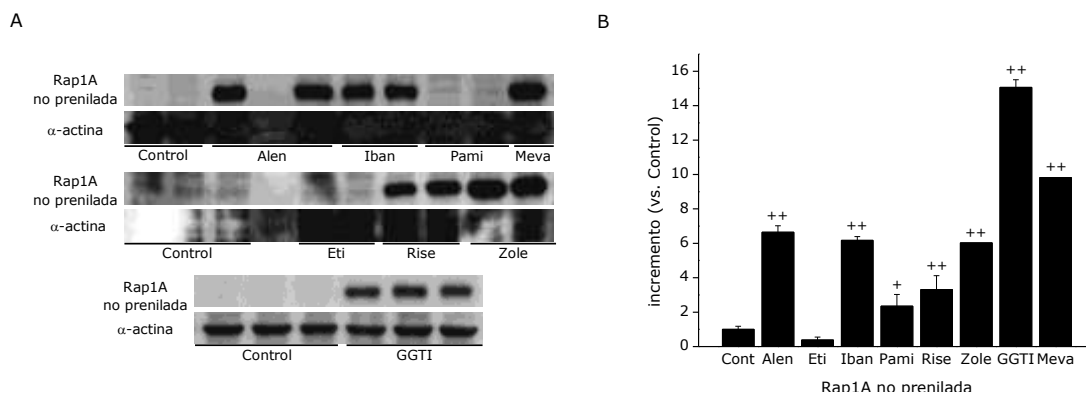


Figura 68: Preñilación, detección de la forma no preñilada de la proteína Rap1A mediante la técnica de Western Blot. Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) de la relación entre Rap1A y actina del grupo control. Alen=alendronato, Eti=etidronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control.

En los experimentos a corto plazo (24 horas), los bisfosfonatos potencian la expresión de COX2 inducida por LPS (Fig. 69.A). El orden de eficacia es pamidronato > ibandronato > alendronato; además ibandronato y pamidronato presentan una mayor potencia que el alendronato, ya que en este caso se obtiene un efecto significativo con 10 μ M además de a 100 μ M (Fig. 69.C). FTI-277 y la mevalonina tienen un comportamiento similar, aunque la magnitud del efecto es mayor que con los bisfosfonatos (Fig. 69.C).

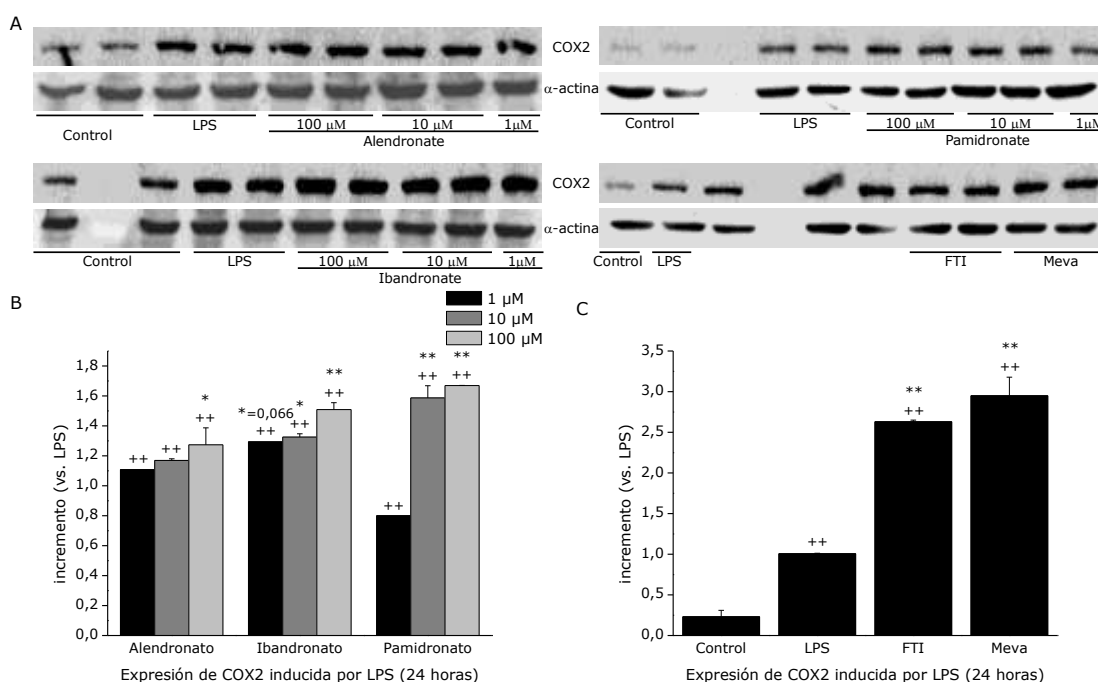


Figura 69: Expresión de COX2 inducida por LPS en células IEC18 tratadas con bisfosfonatos durante 24 horas. Los resultados se representan como el incremento (tanto por uno) de la relación entre la señal de COX2 y la de la actina, refiriendo todos los valores a los del grupo control. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM.

En cuanto a los bisfosfonatos de última generación (risedronato y zoledronato) y el control no nitrogenado (etidronato), sólo zoledronato

aumenta la expresión de la enzima. El efecto es comparable al de ibandronato (Fig. 70).

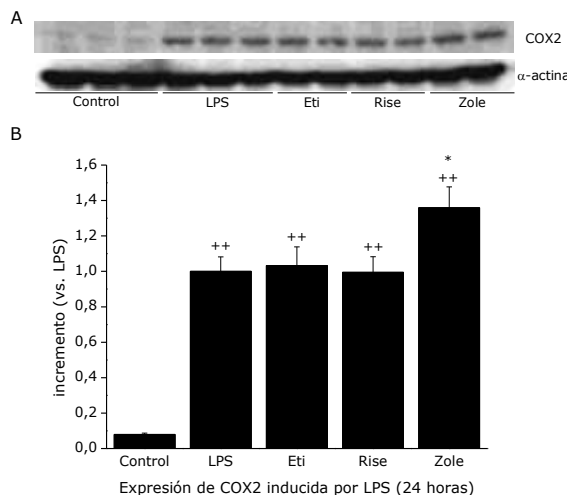


Figura 70: Estudio de la modulación en la expresión de COX2 inducida por LPS en el tratamiento a corto plazo con bisfosfonatos. Los datos han sido referidos a la ratio entre COX2 y actina del grupo control, y se expresan como media \pm SEM del incremento de dicha relación. Eti=etidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato. ++ P<0,001 + P<0,05 vs. Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. LPS.

El análisis de la activación de NF κ B tras 24 horas de incubación muestra que ibandronato y pamidronato provocan un aumento de la fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α , es decir, potencian la activación de dicho factor de transcripción (Fig. 71). Dicho efecto es mayor en el caso de pamidronato que en el de ibandronato. El alendronato, por su parte, muestra una tendencia a disminuir la activación de dicha vía, aunque el efecto no es significativo desde el punto de vista estadístico. La mevalonina se comporta de la misma forma que pamidronato o ibandronato, aunque su efecto es más modesto.

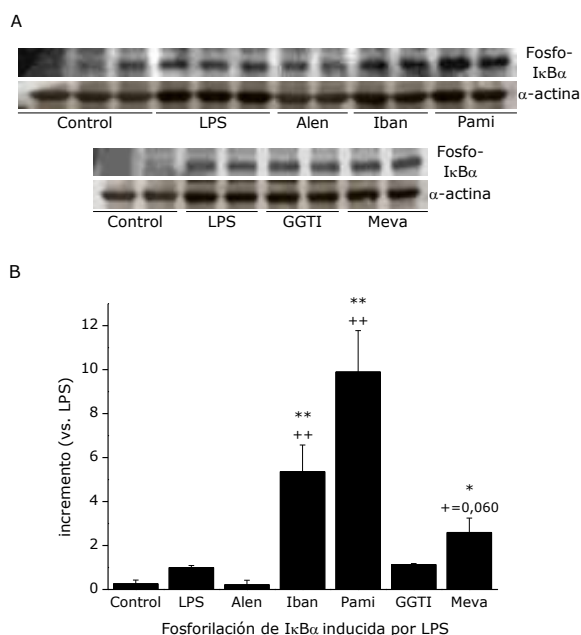


Figura 71: Fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α inducida por LPS (30 minutos de estímulo) en el tratamiento de 24 horas. Los datos se expresan como la media \pm SEM de la relación entre la forma fosforilada de I κ B α y la α -actina, y éstos se representan como incremento (tanto por uno) frente al valor para el grupo control. Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, meva=mevalonina. ++ P<0,001 + P<0,05 vs. Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. LPS.

La fosforilación de MAP-quinasas se ve inhibida considerablemente por alendronato y mevalonina, concretamente la fosforilación de ERK y

SAPK/JNK. Por el contrario, p38 mostró un mayor grado de activación con alendronato (Fig. 72). Pamidronato y GGTI-298 son inactivos a este nivel. A diferencia de éste, ibandronato potencia la fosforilación de ERK, lo cual va acompañado de un efecto similar sobre p38, (Fig. 72.B).

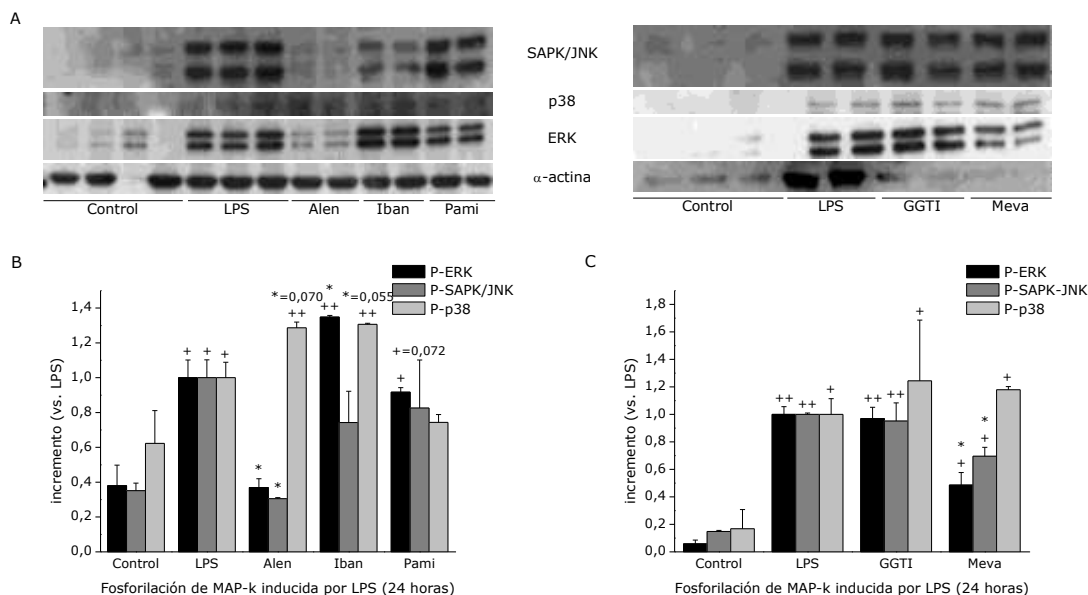


Figura 72: Fosforilación de MAP-quinasas (ERK, SAPK/JNK y p38) debida a LPS y modulada por el tratamiento a corto plazo (24 horas) con bisfosfonatos e inhibidores específicos. La cuantificación densitométrica (**B y C**) se representa como la relación entre la señal de la forma fosforilada de la proteína frente a la señal de α -actina, y los datos se expresan como incremento frente al grupo control (media \pm SEM). Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Meva=mevalonina. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. LPS.

Siguiendo el diseño experimental establecido para las otras líneas celulares, también se valoró la modulación de la expresión de COX2

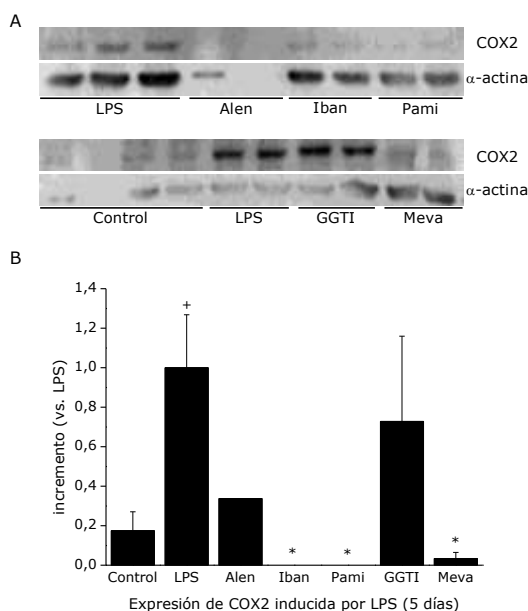


Figura 73: Estudio de la modulación en la expresión de COX2 inducida por LPS en el tratamiento a largo plazo con bisfosfonatos (5 días). Los datos han sido referidos a la ratio entre COX2 y actina del grupo control, y se expresan como media \pm SEM del incremento de dicha relación. Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Meva=mevalonina. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. LPS.

estimulada por LPS tras cinco días de incubación con los bisfosfonatos, es decir, el protocolo a largo plazo. El efecto de los bisfosfonatos en este caso es completamente opuesto al observado a las 24 horas de tratamiento, provocando en cualquiera de los casos una inhibición de la expresión de la proteína proinflamatoria. Dicha inhibición es especialmente robusta en el caso del pamidronato, ya que los resultados obtenidos en el western blot para alendronato parecen reflejar un efecto tóxico sobre las células y no una inhibición específica de la expresión de dicha proteína, como puede observarse en la α -actina (Fig. 73.A). La inhibición desencadenada por ibandronato y

pamidronato es equiparable al efecto de la mevalonina; en contrapartida, el GGTI-298 carece de efecto significativo alguno (Fig. 73).

La activación de NFκB como consecuencia de la estimulación con LPS no es modificada por el tratamiento prolongado con pamidronato (Fig. 74). La toxicidad de alendronato e ibandronato sobre estas células se pone de manifiesto nuevamente en la expresión de α-actina, lo que impide valorar la fosforilación de IκBα, sobre todo en el caso del alendronato. La tendencia mostrada por el ibandronato es a inhibir la fosforilación de la citada proteína inhibidora, aunque los resultados deben ser considerados con cautela por la posible toxicidad que dificulta la valoración de una modificación específica de la expresión de una proteína concreta.

Los fenómenos de toxicidad desencadenados por el alendronato se ponen de manifiesto de igual modo en el análisis de las tres vías de MAP-quinasas, dando lugar a una aparente inhibición de la fosforilación de dos de ellas, JNK y p38 (Fig. 75.A). La activación de p38 se encuentra reprimida por el

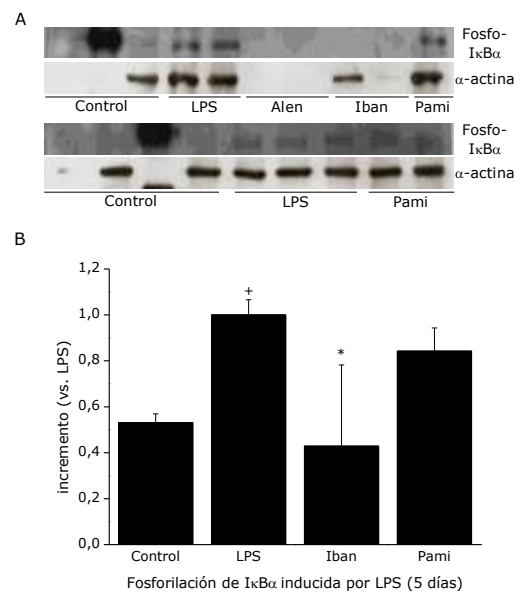


Figura 74: Activación de NFκB (fosforilación de IκBα) en células IEC18 estimuladas con LPS (30 minutos) y tratadas con bisfosfonatos durante 5 días. Se ha calculado la relación entre las señales para la forma fosforilada de IκBα y la proteína α-actina, y los resultados se han expresado como incremento (tanto por uno) frente al grupo LPS (media ± SEM). Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. LPS.

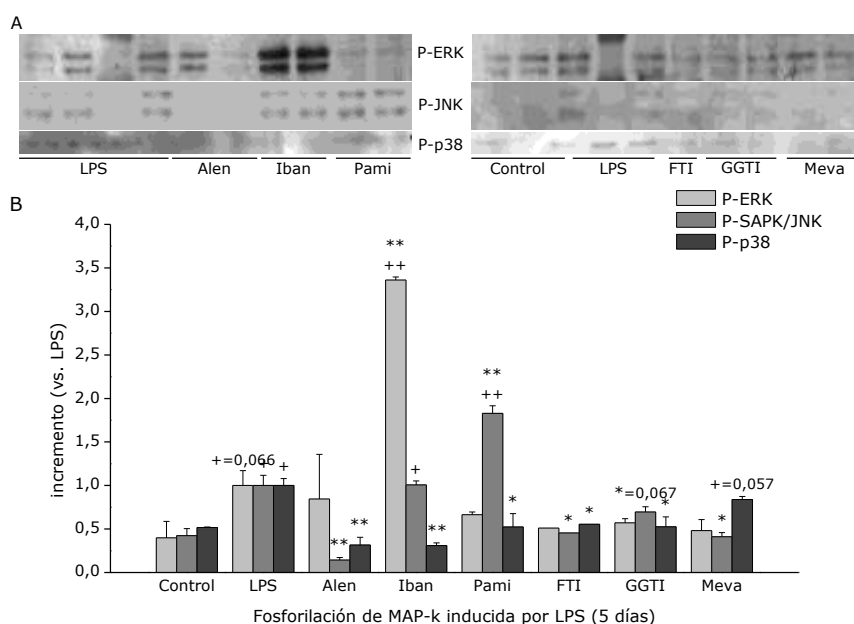


Figura 75: Estudio de la activación de MAP-k desencadenada por LPS (30 minutos) y su modulación en el tratamiento a largo plazo (5 días) con bisfosfonatos. Los gels obtenidos mediante la técnica de Western Blot (A) han sido cuantificados y los resultados se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo tratado sólo con LPS. Los datos se representan como la media ± SEM de la relación entre la señal obtenida para la proteína y la de α-actina. Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Meva=mevalonina. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. LPS.

tratamiento con ibandronato y pamidronato, FTI-277 y GGTI-298, pero no mevalonina. Por el contrario, los efectos sobre JNK son divergentes: pamidronato incrementa la fosforilación, mientras que FTI-277, GGTI-298 y

mevalonina la inhiben, e ibandronato no la afecta. El ibandronato da lugar a una clara activación de la vía ERK, cuya señal es 3 veces mayor que en el grupo LPS. Tanto pamidronato como los controles inhiben la activación de ERK, aunque los datos obtenidos en la cuantificación densitométrica no alcanzan la significancia estadística.

3.2. Efecto de bisfosfonatos nitrogenados sobre células mononucleares.

Las células empleadas en los experimentos con cultivos primarios de células mononucleares fueron obtenidas del bazo de rata. La inhibición de la prenilación en estas células sigue una cinética diferente a la de los enterocitos, siendo más lenta en este caso. De hecho, ninguno de los bisfosfonatos ensayados inhibe manifiesta efectos destacables a las 24 horas de tratamiento, mientras que tras cinco días de incubación, alendronato, y sobre todo ibandronato, aumentan significativamente la señal de Rap1A no prenilada (Fig. 76.A). Por el contrario, tanto GGTI-298 como mevalonina presentan la capacidad de inhibición tanto a corto plazo como en el protocolo prolongado, es decir, a 5 días (Fig. 76).

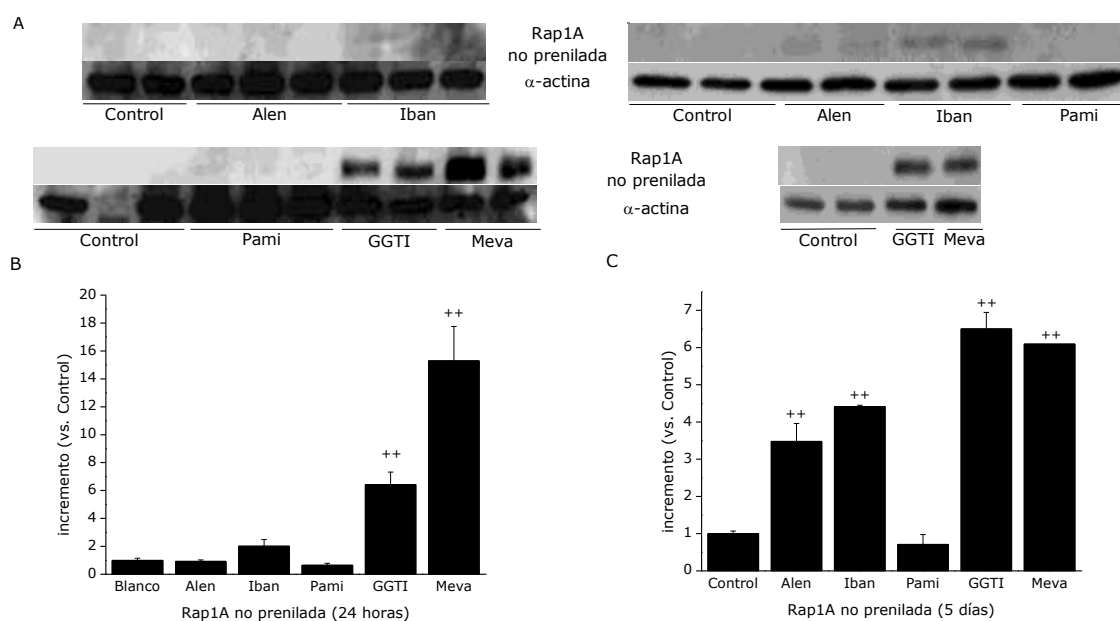


Figura 76: Inhibición de la prenilación de proteínas, detección mediante Western Blot de la forma no prenilada de Rap1A. Los valores de la expresión de dicha proteína se han referido a la α -actina, y los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control (media \pm SEM). Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Meva=mevalonina. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs. Control.

La proliferación celular fue medida mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada. En el estado basal, pamidronato y alendronato, este último a las tres concentraciones ensayadas, muestran una ligera tendencia antiproliferativa (Fig. 77.A). El ibandronato, por su parte, incrementa la proliferación, aunque si se analiza la relación de dicho efecto con la concentración, no es muy relevante (Fig. 77.A). La mevalonina reduce la proliferación llegando a un 50% de inhibición aproximadamente (Fig. 77.B). Tras la estimulación con la lectina concanavalina A, la proliferación celular incrementa espectacularmente, y dicho efecto sólo se ve contrarrestado por el tratamiento

de las células con alendronato (100 μM), lo que da lugar a una inhibición del 40% aproximadamente (Fig. 77.C). Tanto el FTI-277 como la mevalonina reducen la actividad proliferativa inducida por concanavalina A, siendo el efecto de la estatina algo menor (Fig. 77.D). Si las células mononucleares son estimuladas con LPS no se produce ningún incremento significativo en la proliferación celular (no mostrado), y por tanto no se ha podido valorar el efecto de los bisfosfonatos en estas condiciones.

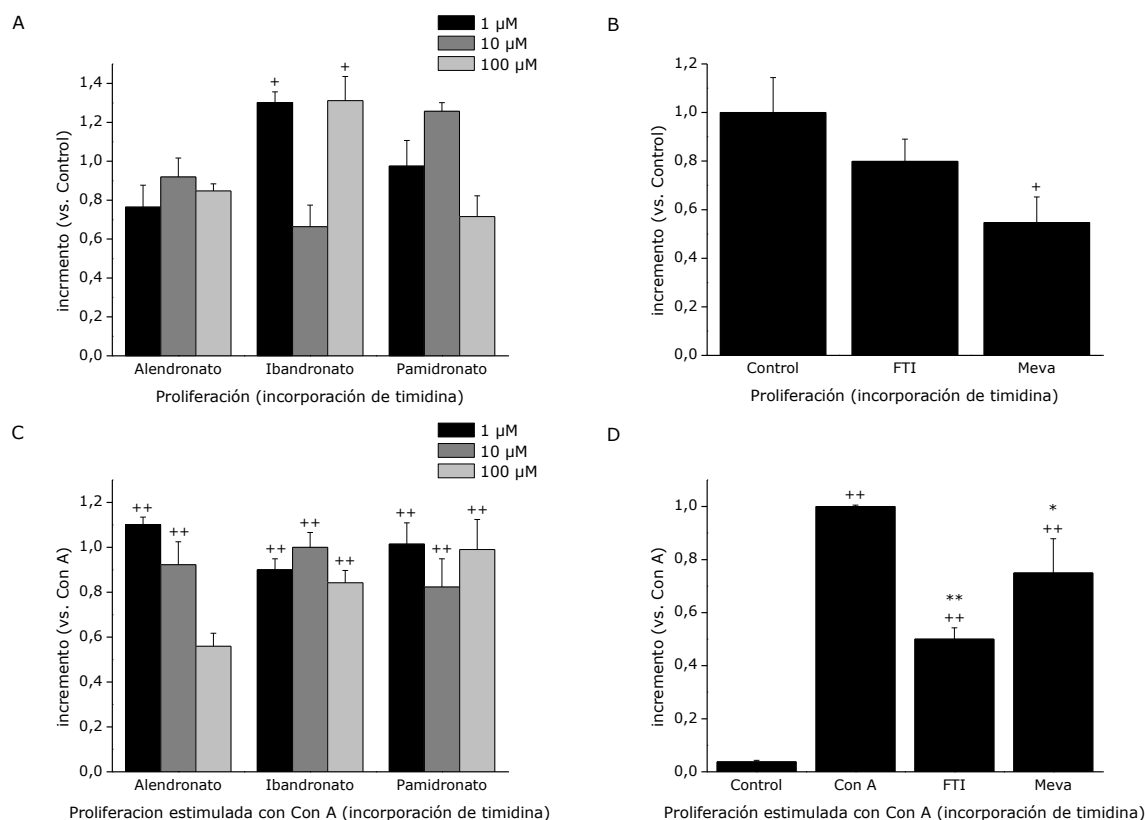


Figura 77: Medida de la proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada, en condiciones basales (A y B) o tras el estímulo con concanavalina A (C y D). Los valores obtenidos son de $1104,727 \pm 158,946$ dpm en el grupo control, y $29236,247 \pm 145,894$ dpm en el grupo estimulado con Con A. Los datos se representan como incremento (tanto por uno) frente al control o a Con A, según corresponda y se indique en la gráfica. Meva=mevalonina. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. LPS.

Asimismo, se llevó a cabo una segunda valoración de la proliferación celular en el estado basal mediante el estudio de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los resultados muestran un efecto antiproliferativo del GGTI-298, tanto a corto como a largo plazo, siendo mayor éste último. En el tratamiento prolongado, además, la mevalonina también inhibe la proliferación, mientras que el pamidronato la potencia (Fig. 78).

Dentro de la población celular estudiada existen dos tipos celulares mayoritarios, por un lado linfocitos (tanto B como T) y por el otro monocitos-macrófagos, además de otras poblaciones minoritarias, como células dendríticas o células NK. El empleo de estímulos diferentes permite la estimulación relativamente selectiva de un determinado tipo celular dentro de esta población heterogénea. De este modo, para el estudio de secreción de citoquinas se han utilizado dos estímulos diferentes: concanavalina A (Con A), que estimula de

forma inespecífica (policlonal) el TCR y por tanto a los linfocitos T; y LPS, que estimula a los macrófagos al unirse a TLR, concretamente a TLR4.

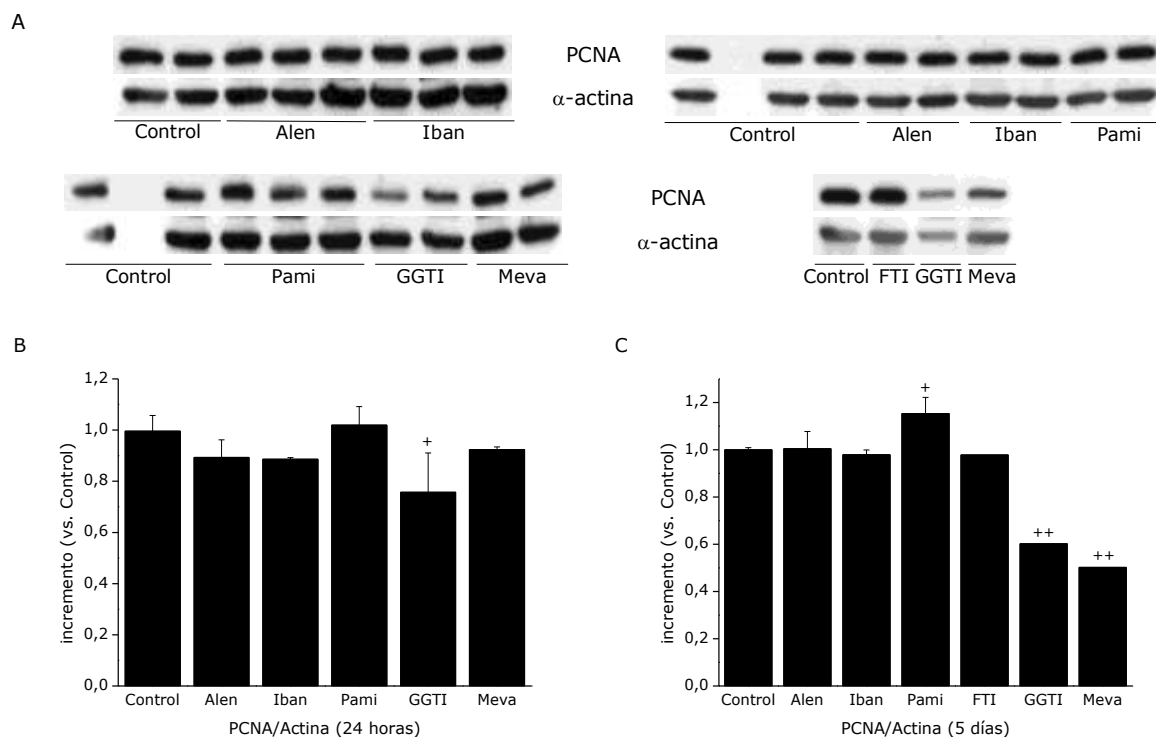


Figura 78: Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular mediante Western Blot (A). La cuantificación densitométrica de la expresión de dicha proteína se ha referido a la obtenida para la α -actina y los valores se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control. El experimento se ha realizado en el tratamiento a corto (B) y a largo (C) plazo. Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Pami=Pamidronato, Meva=mevalonina. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control.

La estimulación de los linfocitos T con la lectina Con A provoca una secreción importante de IL-2, TNF- α e IFN- γ , citoquinas propias del perfil de linfocitos. La inhibición de la prenilación, tanto de forma directa (FTI-277) como indirecta (mevalonina) da lugar a una disminución en la secreción de dichas citoquinas, aunque la inhibición de la síntesis de los isoprenoides, es decir, el tratamiento con mevalonina, provoca un efecto más robusto que el del FTI-277 (Fig. 79.D). El ibandronato incrementa la producción de IFN- γ y sobre todo de IL-2, aunque dicho efecto sólo se observa con la menor concentración empleada, es decir, 1 μ M y no con las concentraciones mayores (Fig. 79.B). El alendronato no ejerce ningún efecto en este caso (Fig. 79.A). El pamidronato presenta un comportamiento peculiar, en virtud del cual se incrementan los niveles de IFN- γ (10 μ M) y disminuye la secreción de TNF- α , pero nuevamente sin presentar una relación sencilla con la concentración (Fig. 79.C).

En el tratamiento a largo plazo, el efecto más significativo es el provocado por el inhibidor GGTI-298, el cual produce una inhibición de la producción de las tres citoquinas (>50%). Los bisfosfonatos, por su parte, tienen un efecto discreto, ya que sólo etidronato es capaz de incrementar la producción de IFN- γ por encima de la producida por la estimulación con Con A. Por otro lado, la mevalonina inhibe de forma específica la secreción de IFN- γ , sin afectar a IL-2/TNF- α (Fig. 80.A).

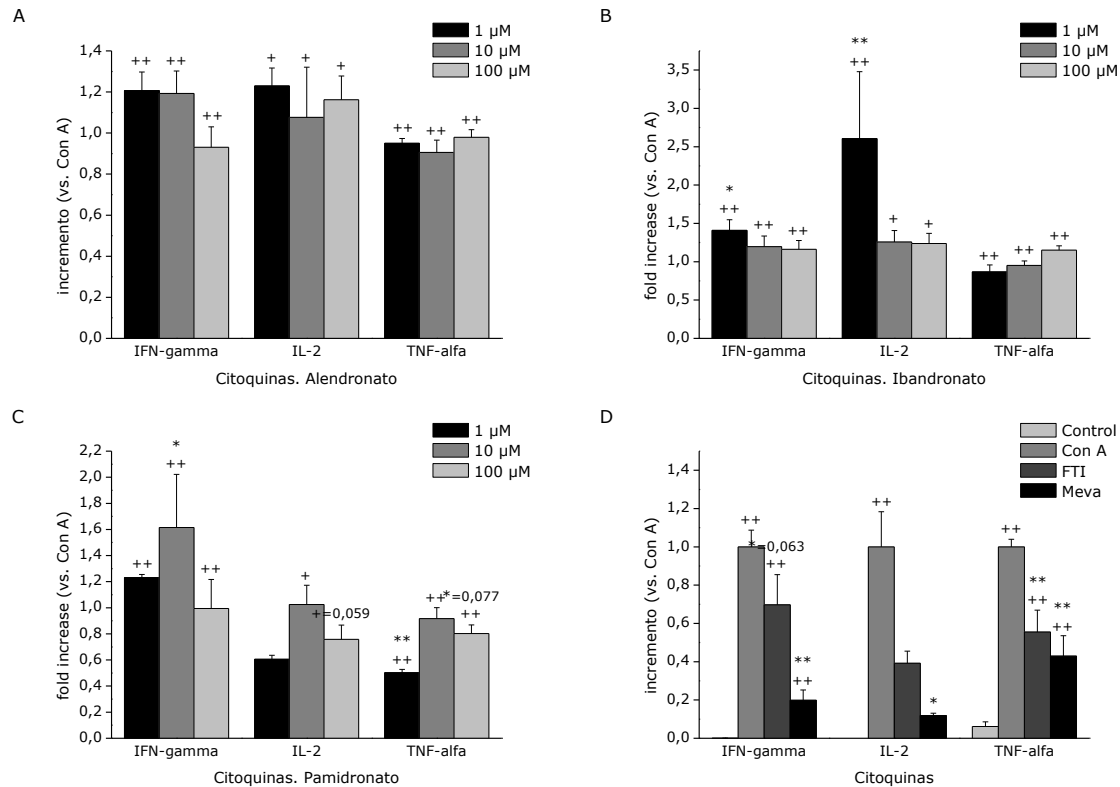


Figura 79: Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con concanavalina A en el tratamiento a corto plazo (48 horas). Los tratamientos empleados han sido alendronato (A), ibandronato (B), pamidronato (C) e inhibidores específicos (D). La secreción de las células estimuladas sin tratar fue de 2723,018 ± 237,727 pg/ml de IFN-γ; 1002,217 ± 183,933 pg/ml de IL-2; y 727,217 ± 28,691 pg/ml de TNF-α. Los datos se expresan como media ± SEM del incremento (tanto por uno) frente a este grupo estimulado con Con A. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; * P<0,001 * P<0,05 vs. Con A.

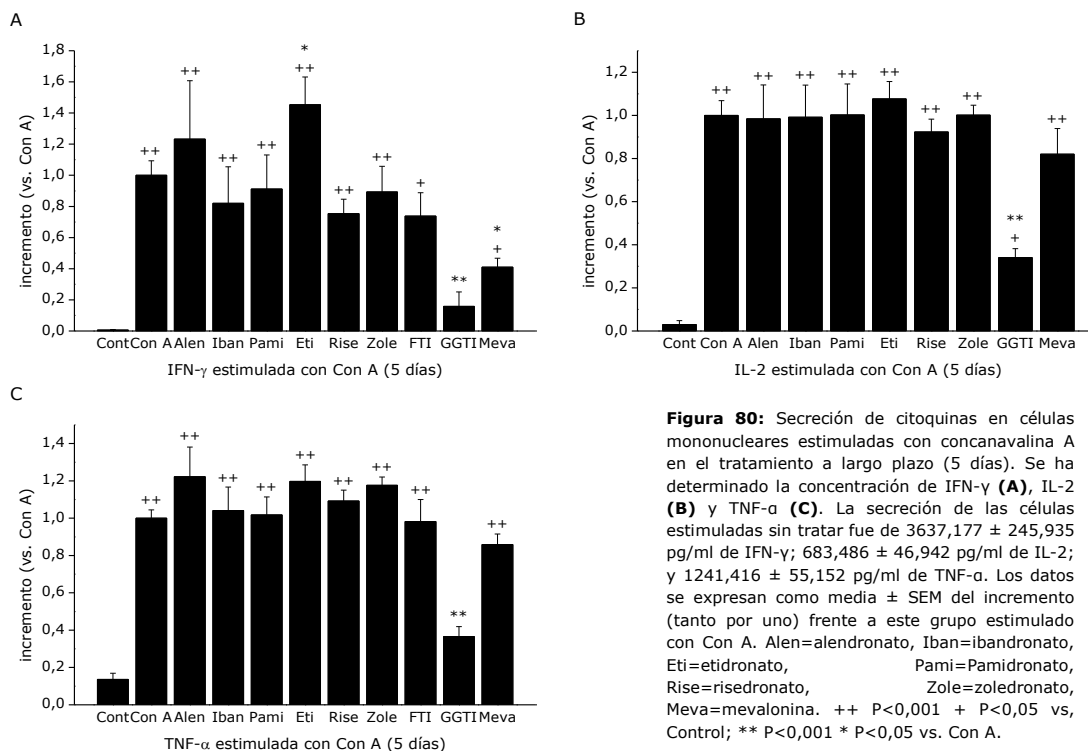


Figura 80: Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con concanavalina A en el tratamiento a largo plazo (5 días). Se ha determinado la concentración de IFN-γ (A), IL-2 (B) y TNF-α (C). La secreción de las células estimuladas sin tratar fue de 3637,177 ± 245,935 pg/ml de IFN-γ; 683,486 ± 46,942 pg/ml de IL-2; y 1241,416 ± 55,152 pg/ml de TNF-α. Los datos se expresan como media ± SEM del incremento (tanto por uno) frente a este grupo estimulado con Con A. Alen=alendronato, Iban=ibandronato, Eti=etidronato, Pami=Pamidronato, Rise=risedronato, Zole=zoledronato, Meva=mevalonina. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. Con A.

La estimulación de los esplenocitos con LPS da lugar a una activación fundamental de macrófagos a través del TLR4, provocando el incremento en la

producción de citoquinas típicamente sintetizadas por este tipo celular, como son la IL-6, el TNF- α y la IL-10. En estas condiciones experimentales, ibandronato es el único bisfosfonato activo. Así, incrementa de forma estadísticamente significativa la secreción de TNF- α , y muestra una tendencia a potenciar igualmente la secreción de IL-6 ($P=0,104$) (Fig. 81.A). Resulta especialmente reseñable el efecto diferencial que presentan los tres inhibidores. Así, la secreción de IL-6 es inhibida casi totalmente con FTI-277 y mevalonina, pero no por GGTI-298. Éste, sin embargo, es el único que produce un efecto similar sobre IL-10. Finalmente, los tres inhibidores producen una disminución modesta de la producción de TNF- α .

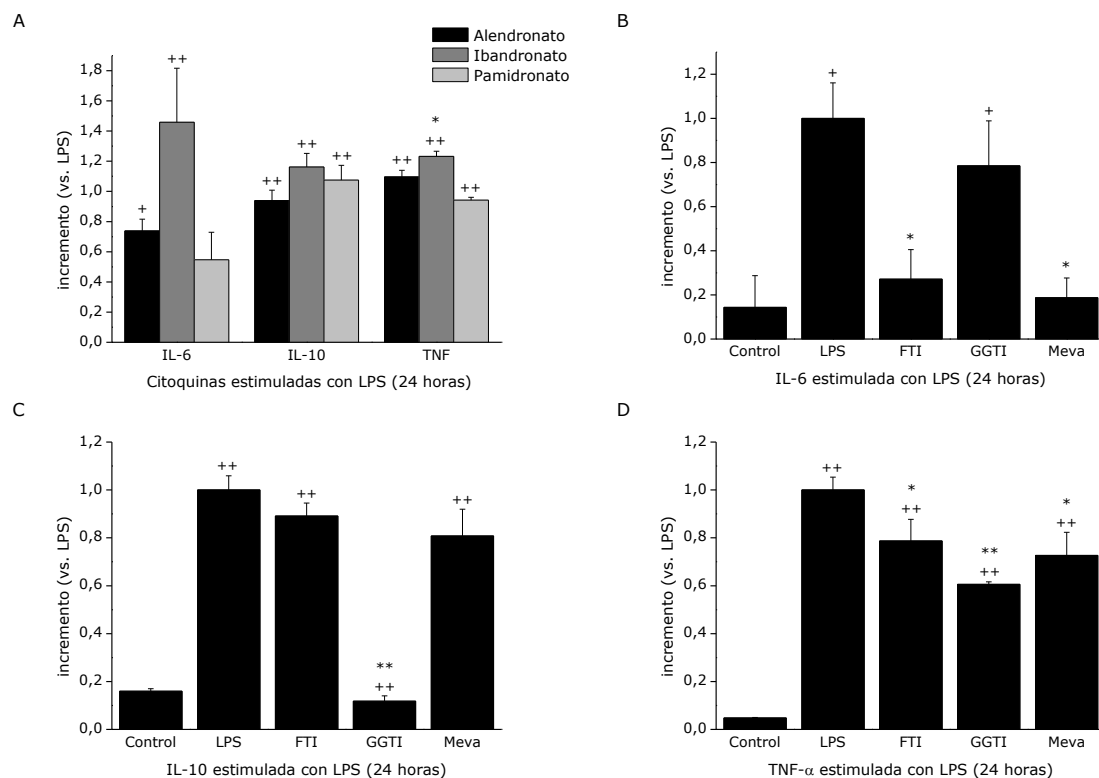
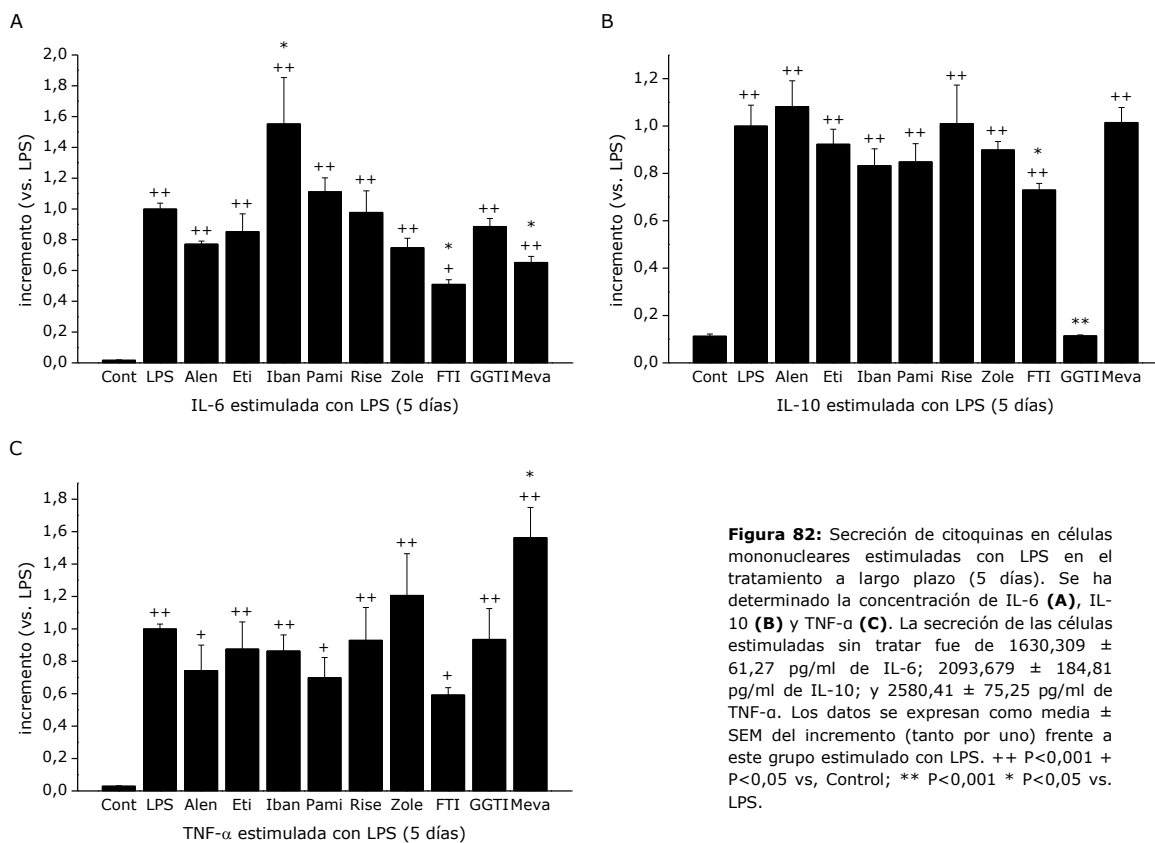


Figura 81: Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con LPS en el tratamiento a corto plazo (24 horas). **(A)** Efecto de los bisfosfonatos **(A)** y de los inhibidores específicos **(B, C y D)**. La secreción de las células estimuladas sin tratar fue de $80,575 \pm 12,972$ pg/ml de IL-6; $1629,227 \pm 96,193$ pg/ml de IL-10; y $683,317 \pm 36,51$ pg/ml de TNF- α . Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente a este grupo estimulado con LPS. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. LPS.

En el tratamiento prolongado, esto es, tras cinco días de contacto entre las células y los bisfosfonatos, el análisis de la secreción de citoquinas al estimular con LPS coincide con el observado en el tratamiento a corto plazo. Así, el único bisfosfonato eficaz es ibandronato que incrementa la secreción de IL-6 de forma específica y, en este caso significativa. En cuanto a los controles, el comportamiento selectivo en cuanto a la IL-6 e IL-10 se mantiene, aunque la inhibición de FTI-277 y mevalonina sobre IL-6 es algo menor. FTI-277 presenta en este caso un efecto marginal sobre IL-10 (Fig. 82). Sorprendentemente, la secreción de TNF- α fue potenciada por mevalonina.



Para valorar la posible intervención de los linfocitos T reguladores en la

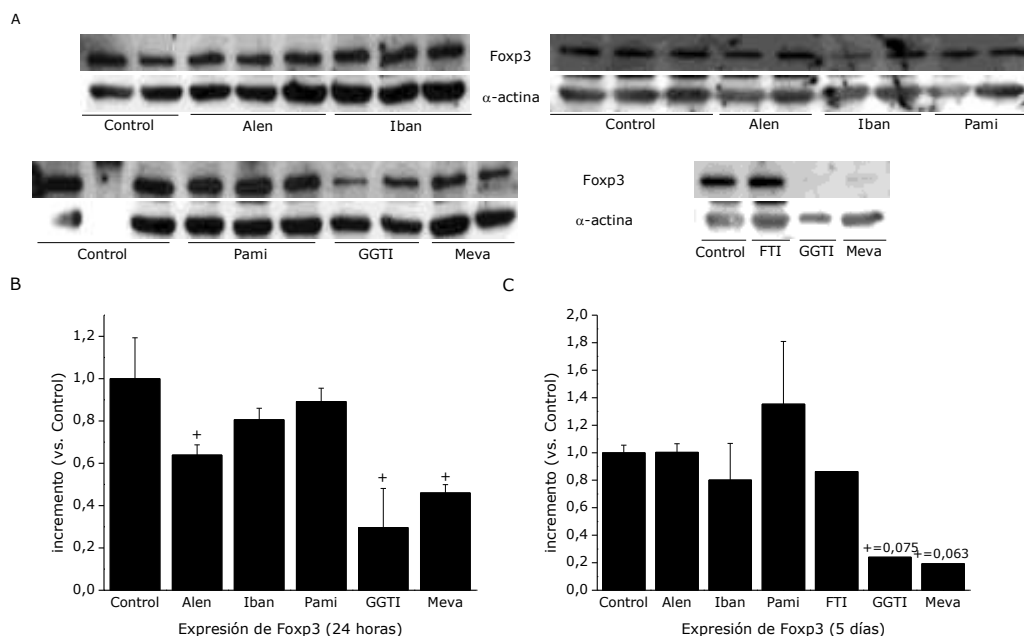


Figura 83: Estudio de la expresión de Foxp3 en células mononucleares (**A**) y su modulación por bisfosfonatos (**B**) e inhibidores específicos (**C**). Los datos se expresan como la relación entre la cuantificación densitométrica de Foxp3 y la que corresponde a α-actina, y se han representado como incremento (tanto por uno) frente al control. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control. Media ± SEM.

modulación ejercida por los bisfosfonatos sobre la biología de las células mononucleares, se estudió la expresión del factor de transcripción Foxp3. Los

resultados obtenidos mediante la técnica de Western Blot indican que no existe una modulación de dicho factor de transcripción por parte de los bisfosfonatos (Fig. 83), excepto en el caso de alendronato tras 24 horas de tratamiento, el cual inhibe la expresión de dicha proteína (Fig. 83.B). Sin embargo, tanto el GGTI-298 como la mevalonina presentan efectos inhibidores marcados, tanto a 24 horas como a 5 días (Fig. 83.B y C).

Por último, se realizó un estudio de expresión génica mediante PCR a tiempo real en células mononucleares tratadas con pamidronato y estimuladas o no con Con A. Pamidronato no modifica la expresión génica de Foxp3 en condiciones basales o tras el estímulo con Con A (Fig. 84.A). Además de Foxp3, se cuantificó la expresión de genes que codifican citoquinas que no pudieron ser valoradas mediante ELISA. Los datos muestran que pamidronato tampoco modula los niveles de ARNm de IL-17, IL-23 o TGF- β , en esplenocitos estimulados con Con A (Fig. 84.B). En cuanto a la IL-4, se observa una tendencia a inhibir su expresión por parte del pamidronato, aunque este resultado no es estadísticamente significativo (Fig. 84.B).

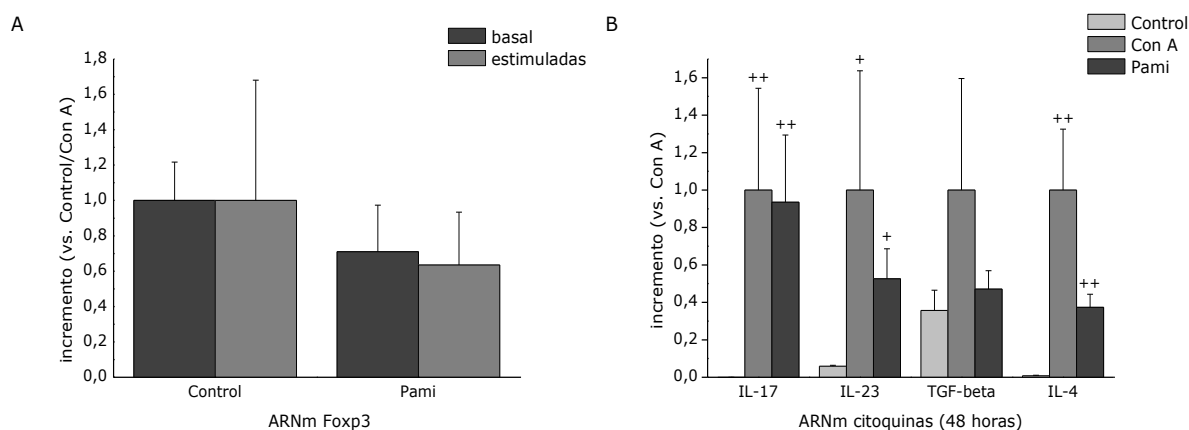


Figura 84: Estudio de la expresión génica de Foxp3 (A) y citoquinas (B) en esplenocitos estimulados o no con concanavalina A durante 48 horas. Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control (basal) o al grupo Con A (estimadas). Media \pm SEM. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control.

3.3. Efecto de los bisfosfonatos nitrogenados sobre linfocitos T.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados sobre esplenocitos totales muestran el efecto de los bisfosfonatos sobre una población celular heterogénea, lo que impide valorar ese efecto de forma independiente sobre los distintos tipos celulares. Por tanto, el siguiente objetivo fue comprobar dichos resultados en poblaciones celulares purificadas o enriquecidas en un determinado tipo celular. Para ello se empleó la técnica de separación celular mediante partículas magnéticas (MACs).

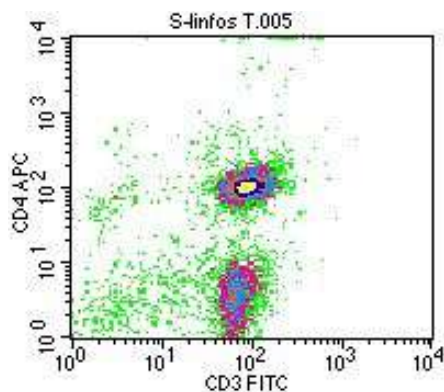


Figura 85: Pureza de la población enriquecida en linfocitos T obtenida mediante separación celular magnética a partir de esplenocitos. Imagen de citometría de flujo de la población CD3⁺, con una pureza del 95,08% del total de células vivas.

La purificación de linfocitos T se realizó mediante una selección negativa de otros tipos celulares contenidos a nivel de bazo, esto es, linfocitos B (anticuerpo frente a CD45RA), células NK (anticuerpo frente a CD161.a) y macrófagos (anticuerpo frente a CD11b). Tras la separación magnética en columna, la población resultante está enriquecida en linfocitos T (aproximadamente 95% de pureza, células CD3⁺), ya que los eritrocitos han sido previamente eliminados mediante lisis osmótica con cloruro amónico (Fig.85).

Cuando se analizó la secreción de citoquinas estimulada con concanavalina A, el efecto más llamativo fue el incremento en la producción de IFN- γ provocada por el tratamiento a corto plazo (48 horas) con alendronato, y en mayor medida, con pamidronato (Fig. 86.A). La IL-2 aumenta sólo en el caso de pamidronato, aunque apenas llega a ser un efecto estadísticamente significativo (Fig. 86.A). Todos los inhibidores específicos, FTI-277, GGTI-298 y mevalonina, inhiben sin embargo la secreción de citoquinas estimulada por Con A (IL-2 e IFN- γ) (Fig. 86.B).

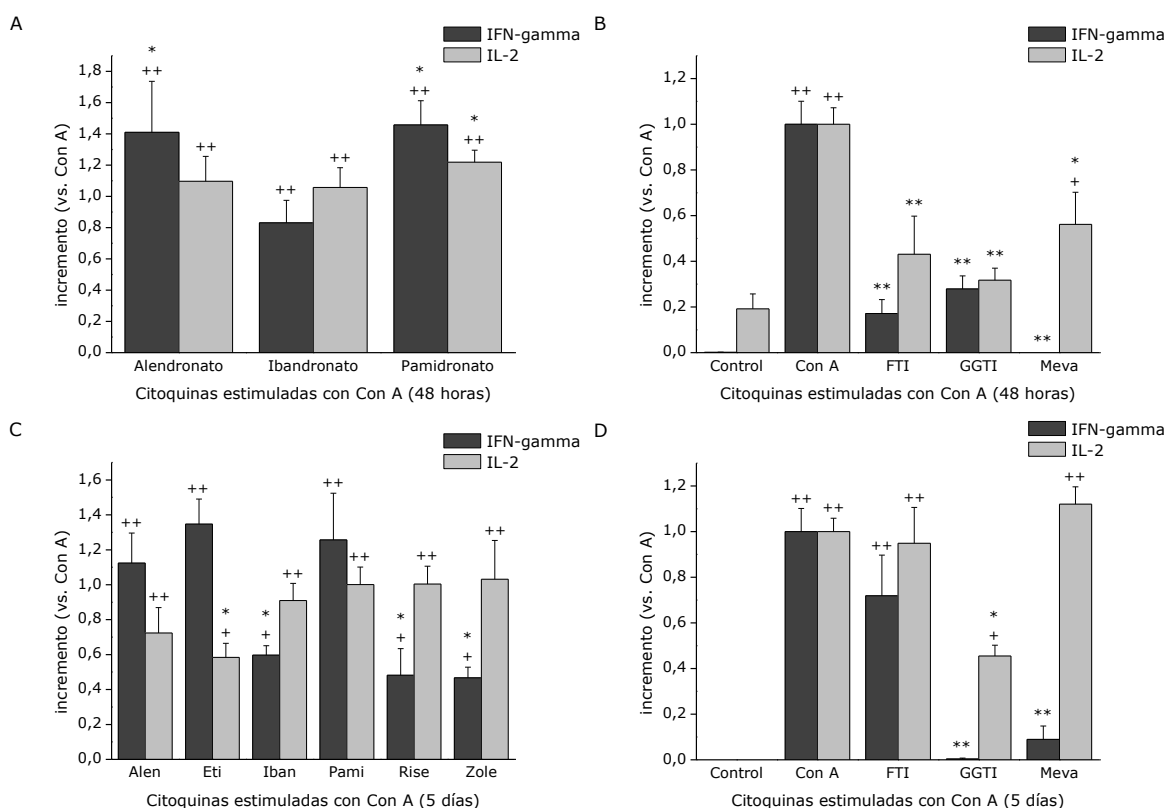
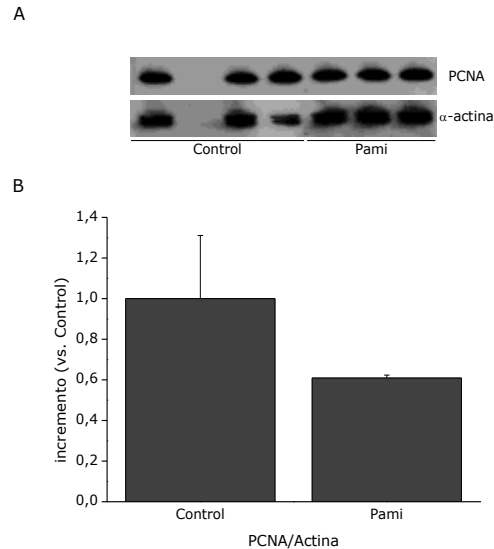


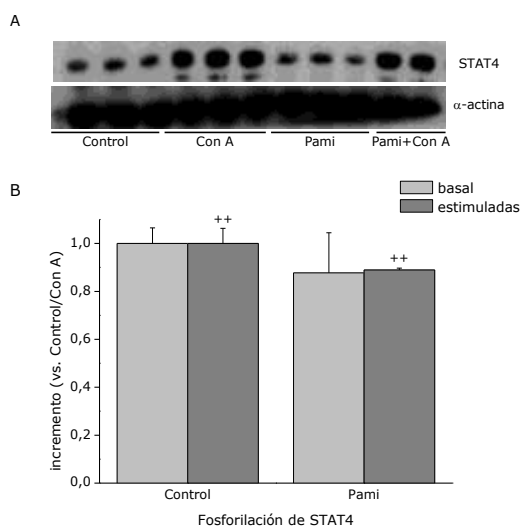
Figura 86: Síntesis de citoquinas en linfocitos T estimulados con Con A en el tratamiento a corto (**A y B**) y a largo plazo (**C y D**). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente a las células a las que se añadió únicamente Con A. La secreción para este grupo es de $1459,719 \pm 147,53$ pg/ml de IFN- γ y $154,959 \pm 11,17$ pg/ml de IL-2 (48 h); y $5484,2 \pm 555,237$ pg/ml de IFN- γ y $197,947 \pm 11,544$ de IL-2 (5 días). ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. Con A. Media \pm SEM.

En el protocolo a largo plazo, los bisfosfonatos considerados en general más potentes en cuanto a la inhibición de la prenilación, esto es, zoledronato, risedronato e ibandronato, inhiben la secreción de IFN- γ , asemejándose así a los controles GGTI-298 y mevalonina (Fig. 86.C y D). En cambio, alendronato, etidronato y pamidronato muestran una cierta tendencia al incremento de la producción de dicha citoquina, aunque sin alcanzar la significancia estadística (Fig. 86.C). Cabe recordar que estos bisfosfonatos, especialmente, etidronato y pamidronato, no inhiben la prenilación en ninguno de los tipos celulares estudiados (Fig. 56, 64, 68 y 76). La síntesis de IL-2 sólo es inhibida por GGTI-298 y etidronato, único bisfosfonato no nitrogenado que forma parte del estudio (Fig. 86.C y D).



Con el objetivo de caracterizar el mecanismo por el que el pamidronato provoca el incremento en la producción de IFN- γ , se realizaron diversos experimentos con este bisfosfonato en los linfocitos purificados. El Pamidronato no promueve la proliferación de los linfocitos T, ya que no modifica la expresión de PCNA (Fig. 87).

La fosforilación de STAT4 y la consecuente activación de la vía de señalización caracteriza a la activación de linfocitos T y podría estar relacionada con el incremento en la producción de IFN- γ que provoca el pamidronato.



basales o tras el estímulo con Con A (Fig. 88).

El incremento en la producción de IFN- γ puede deberse a un efecto polarizante sobre la diferenciación de linfocitos T hacia el subtipo Th1. Por ello,

se diseñó un experimento para valorar la capacidad de polarización del pamidronato (bisfosfonato más activo) hacia el fenotipo Th1. Esto se consiguió mediante el pretratamiento de los linfocitos T con IL-12, citoquina fundamental en la diferenciación hacia linfocitos Th1 y que juega un papel crucial en la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T y otros tipos celulares, como las células NK. Los resultados muestran que el tratamiento de los linfocitos T polarizados hacia el subtipo Th1 mediante la incubación de IL-12 con pamidronato da lugar a una mayor producción de IFN- γ o, lo que es lo mismo, que el pamidronato tiene capacidad para derivar la diferenciación de linfocitos hacia el fenotipo Th1 (Fig. 89). Este efecto es específico, ya que la IL-2 no se ve afectada (Fig. 89).

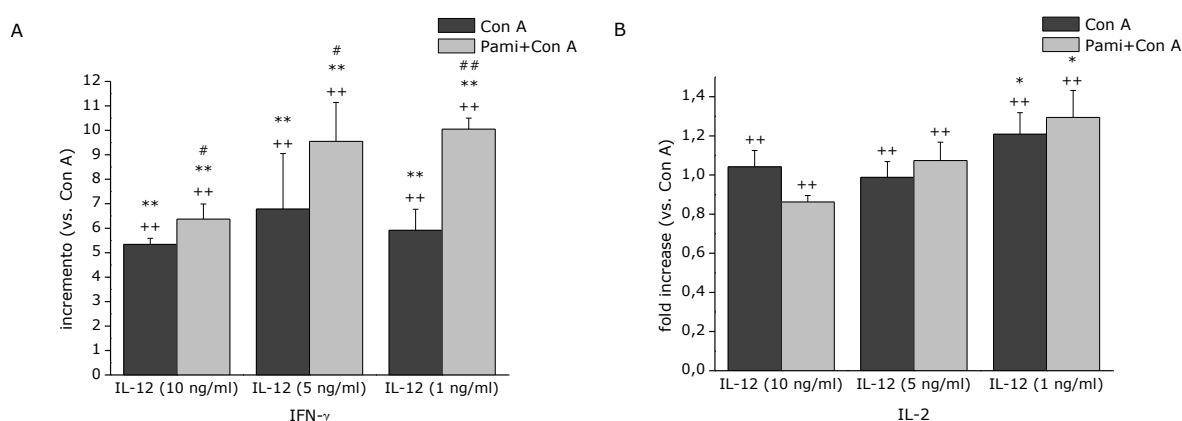


Figura 89: Análisis de la diferenciación de linfocitos hacia el subtipo Th1 mediante la polarización con IL-12. La secreción de IFN- γ es de $0,487 \pm 0,487$ y $535,1 \pm 74,136$ en Control y Con A, respectivamente; y la de IL-2 es de $53,52 \pm 23,965$ y $317,613 \pm 15,798$. Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo estimulado con Con A (media \pm SEM). ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control; ** P<0,001 * P<0,05 vs. Con A; ## P<0,001 #P<0,05 vs. IL-12.

Al igual que en el caso de las células mononucleares, se realizó un análisis de la expresión génica de diversas citoquinas. No se observan modificaciones de la expresión de Foxp3, IL-17 o TGF- β , y se mantiene la tendencia a inhibir la expresión de IL-4 (Fig. 90.A y B). Sin embargo, el pamidronato provoca una inhibición de la síntesis IL-23 (Fig. 90.B).

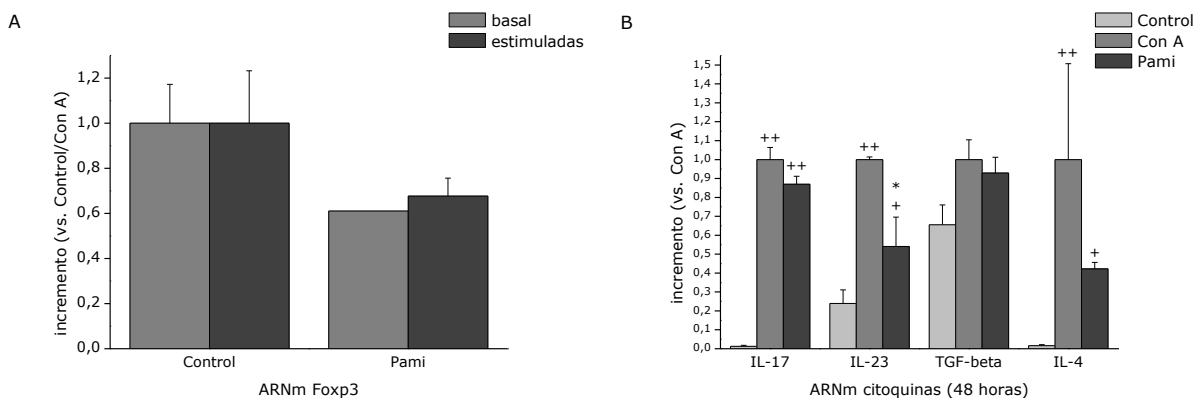


Figura 90: Estudio de la expresión génica de Foxp3 (A) y de citoquinas (B) en linfocitos estimulados o no con concanavalina A durante 48 horas. Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) frente al grupo control (basal) o al grupo Con A (estimuladas). Media \pm SEM. ++ P<0,001 + P<0,05 vs, Control

3.4. Efecto de bisfosfonatos nitrogenados sobre macrófagos.

La población celular enriquecida en macrófagos se obtuvo mediante selección negativa utilizando para ello la técnica de separación celular magnética (MACs, a la que hemos aludido en el apartado anterior). Las células que se eliminaron fueron los linfocitos T (anticuerpo frente a CD3), linfocitos B (anticuerpo frente a CD45RA) y células NK (anticuerpo frente a CD161.a). De esta forma, una vez eliminados los eritrocitos mediante la lisis con un tampón hipotónico, la población mayoritaria es la de monocitos-macrófagos, los cuales fueron estimulados con LPS para inducir la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α .

Utilizando este modelo *in vitro*, los resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos cuando los esplenocitos totales estimulados con LPS, aunque los efectos son más claros en el modelo con la población celular purificada. El único bisfosfonato activo sobre macrófagos es el ibandronato, que provoca un incremento en la secreción de las tres citoquinas medidas, IL-6, IL-10 y TNF- α (Fig. 91.A). Considerando el efecto de los controles, el GGTI-298 es el único capaz de inhibir la producción de IL-10 (Fig. 91.C), mientras que FTI-277 y en menor medida la mevalonina inhiben por su parte la síntesis de IL-6, aunque en el caso de la estatina este efecto no alcanza la significancia estadística ($P=0,075$) (Fig. 91.B). Nuevamente, el efecto sobre el TNF- α es menos específico, y su secreción es inhibida por GGTI-208 y por lovastatina (Fig. 91.D).

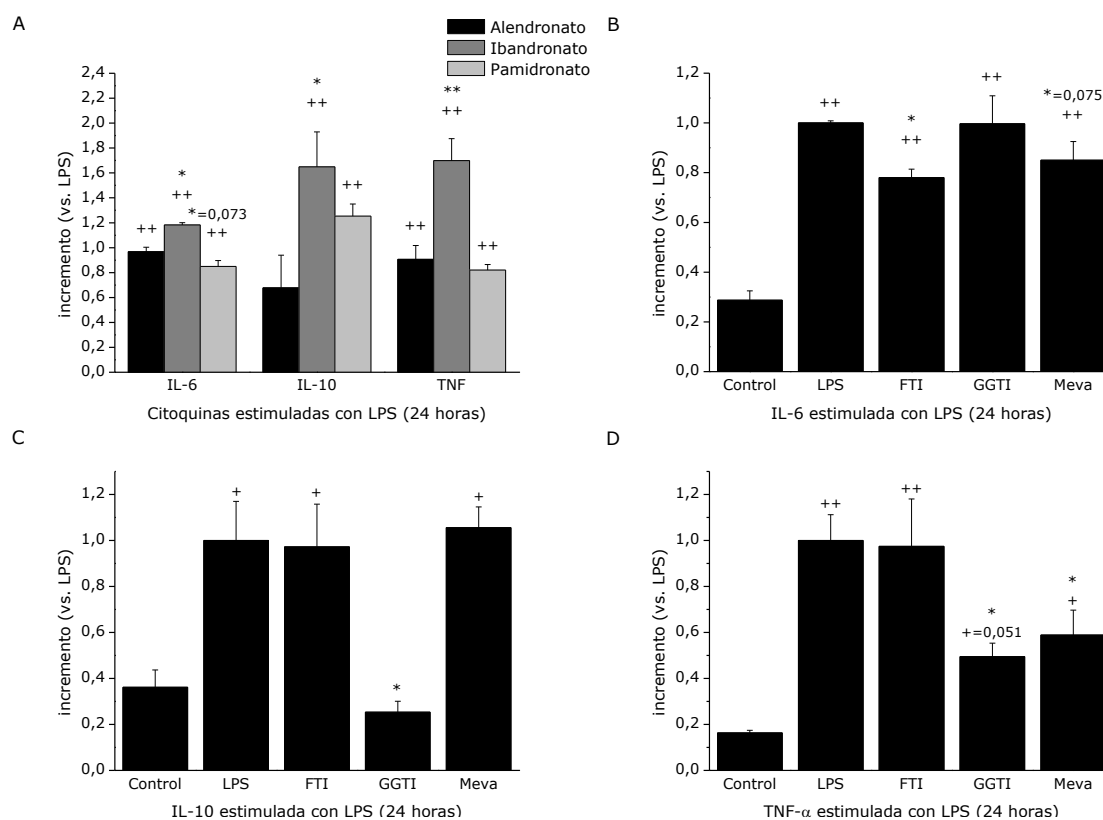


Figura 91: Secreción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS en el tratamiento a corto plazo (24 horas). **(A)** Efecto de los bisfosfonatos **(A)** y de los inhibidores específicos **(B, C y D)**. La secreción de las células estimuladas sin tratar fue de $198,403 \pm 1,693$ pg/ml de IL-6; $819,418 \pm 139,191$ pg/ml de IL-10; y $7133,203 \pm 801,751$ pg/ml de TNF- α . Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente a este grupo estimulado con LPS. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs. Control; ** $P < 0,001$ * $P < 0,05$ vs. LPS.

Tras cinco días de tratamiento, se confirma la capacidad del ibadronato para estimular a este tipo celular, ya que junto al zoledronato incrementa la producción de IL-6 y TNF- α . Además de esto, el zoledronato inhibe la producción de IL-10. Por su parte, el alendronato inhibe la síntesis de IL-10 y TNF- α ; así, el alendronato se comporta de forma opuesta al etidronato, ya que éste incrementa la producción de estas dos citoquinas. Por su parte, GGTI-298 y mevalonina inhiben la expresión de las tres citoquinas, mientras que FTI-277 sólo provoca una inhibición moderada de IL-10 (Fig. 92).

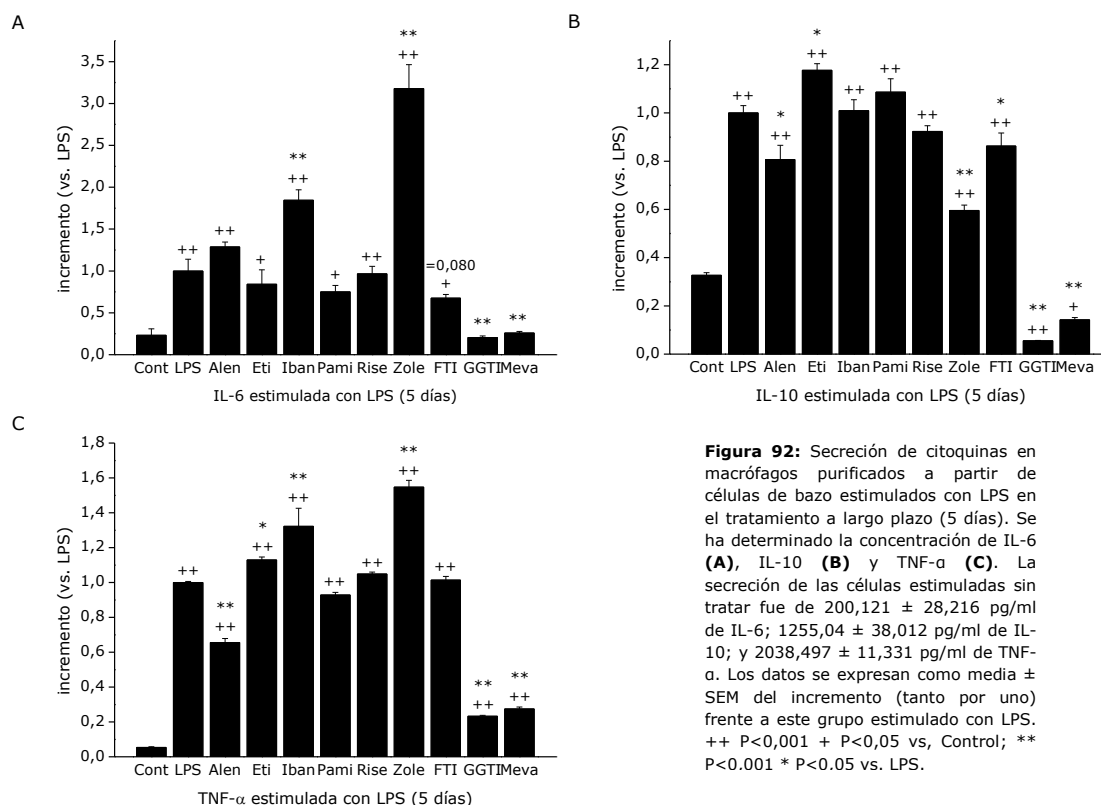


Figura 92: Secreción de citoquinas en macrófagos purificados a partir de células de bazo estimulados con LPS en el tratamiento a largo plazo (5 días). Se ha determinado la concentración de IL-6 (A), IL-10 (B) y TNF- α (C). La secreción de las células estimuladas sin tratar fue de $200,121 \pm 28,216$ pg/ml de IL-6; $1255,04 \pm 38,012$ pg/ml de IL-10; y $2038,497 \pm 11,331$ pg/ml de TNF- α . Los datos se expresan como media \pm SEM del incremento (tanto por uno) frente a este grupo estimulado con LPS. ++ P<0,001 + P<0,05 vs. Control; ** P<0,001 * P<0.05 vs. LPS.

3.5. Efectos de bisfosfonatos nitrogenados sobre cocultivos enterocito-linfocito T.

Una vez estudiado el efecto de los bisfosfonatos sobre diversos modelos y tipos celulares, se planteó la posibilidad de estudiar la inmunomodulación ejercida por dichas sustancias en cocultivos de enterocitos y linfocitos T, debido al efecto de potenciación que alendronato y sobre todo, pamidronato ejercían sobre este tipo de células mononucleares. Para ello se empleó la línea celular IEC-18, ya que procede de rata, y la población de linfocitos T purificada mediante separación magnética a partir de esplenocitos, asimismo de rata. Los cocultivos se realizaron en sistemas Transwell[®]. En dicho sistema existen dos compartimentos independientes pero en contacto a través de un material poroso, de forma que se puede determinar la secreción en cada uno de los compartimentos por separado, pero permitiéndose la comunicación. En el compartimento superior se dispusieron los enterocitos, cuyo crecimiento

determina que la cara basolateral se encuentre en contacto con el compartimento inferior, en el cual se encuentran los linfocitos T. El modelo se asemeja hasta cierto punto a la disposición fisiológica de estos dos tipos celulares en el tejido intestinal, en el que los enterocitos muestran su cara apical hacia el lumen, mientras que la cara basolateral se encontraría en contacto con las capas internas del tejido intestinal, entre las que se encuentran células mononucleares, como en el caso de los linfocitos intraepiteliales y los contenidos en la *lamina propria*.

Los linfocitos T fueron estimulados con Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y el tratamiento (pamidronato) fue añadido en el compartimento superior, en contacto con los enterocitos. Para valorar si el posible efecto se debe a un contacto directo con los linfocitos T o por una modulación sobre enterocitos, el pamidronato fue añadido antes de poner los linfocitos en contacto con los enterocitos o simultáneamente. En este último caso, es posible el paso del pamidronato a través de la monocapa de epitelio intestinal y del material poroso, mientras que en el otro caso, el contacto de los linfocitos con el pamidronato no es posible, sino que éste sólo puede actuar sobre los enterocitos. Asimismo, se han realizado dos tipos de protocolos, uno a corto plazo y otro a largo plazo, respetando el diseño experimental ejecutado en todos los experimentos anteriores, esto es, 24 horas o 5 días. Tras el establecimiento del cocultivo, la incubación fue de 72 horas.

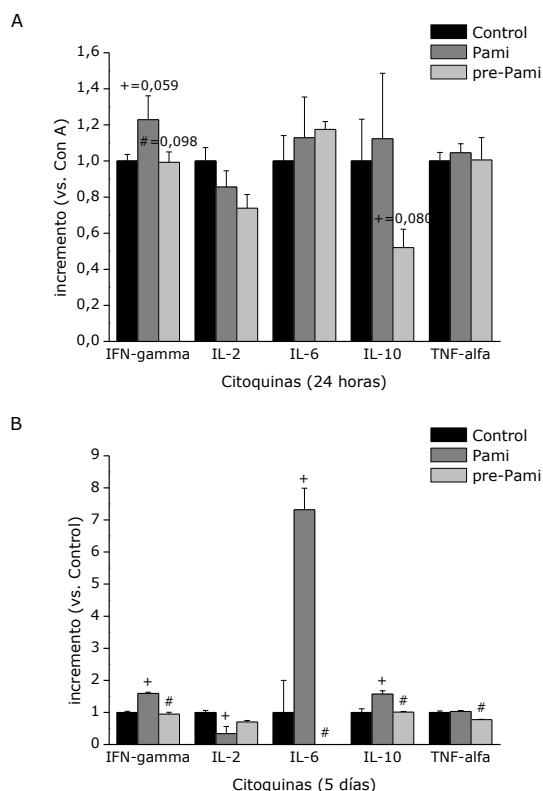


Figura 93: Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell®) enterocito-linfocito T. Los datos muestran la secreción por parte de los linfocitos T dispuestos en el compartimento inferior y estimulados con Con A. El tratamiento se realizó a corto (A) y a largo plazo (B). Los datos se expresan como incremento (tanto por uno) de la secreción de las células estimuladas con Con A sin tratamiento. Pami=Pamidronato, pre-Pami=pre-incubación con Pamidronato. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; # $P < 0,001$ # $P < 0,05$ vs. Pamidronato.

En el experimento a corto plazo el único efecto destacable es la potenciación en la secreción de IFN- γ , debido a un efecto directo sobre los linfocitos T, ya que la retirada del pamidronato antes del contacto entre los dos tipos celulares (pre-pamidronato), hace que desaparezca dicho efecto por completo (Fig. 93.A).

A largo plazo (5 días), el efecto del pamidronato de incremento en la secreción de citoquinas es más evidente, y ya no sólo se pone de manifiesto en el caso del IFN- γ , sino que también IL-6 e IL-10 aparecen aumentadas. No obstante, el incremento de IL-6 es considerablemente mayor que en el caso de IFN- γ e IL-10. Asimismo, la potenciación de la producción de IFN- γ es mayor que en el tratamiento a corto

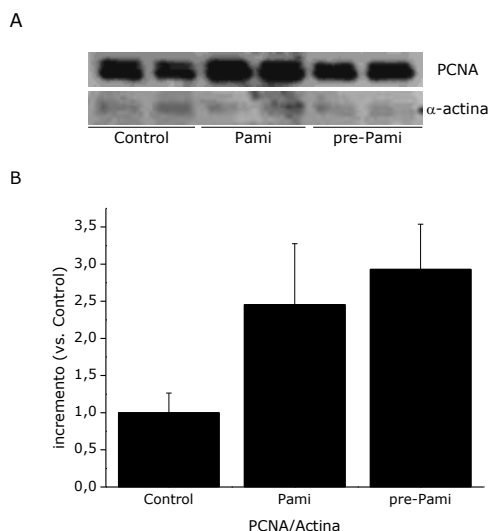


Figura 94: Expresión de PCNA en linfocitos T procedentes del compartimiento inferior en cocultivos de enterocitos y linfocitos T (Transwell®). La cuantificación densitométrica de PCNA se ha referida a la obtenida para α -actina y los valores se expresan como incremento (tanto por uno) frente a esta relación en el grupo control. Pami=Pamidronato, pre-Pami=pre-incubación con Pamidronato. Media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ## $P < 0,001$ # $P < 0,05$ vs. Pamidronato.

plazo. Paradójicamente, estos efectos se acompañan de una inhibición en la síntesis de IL-2. Como ocurre tras 24 horas de tratamiento, la retirada del fármaco provoca la desaparición del efecto en cuestión (Fig. 93.B). El comportamiento con respecto a la secreción de TNF- α es diferente, ya que aunque el pamidronato no provoca modificación alguna sobre la misma, la

pre-incubación de los enterocitos con dicha sustancia hace que los niveles de esta citoquina sean menores.

Finalmente, los linfocitos T que habían estado en contacto con los enterocitos

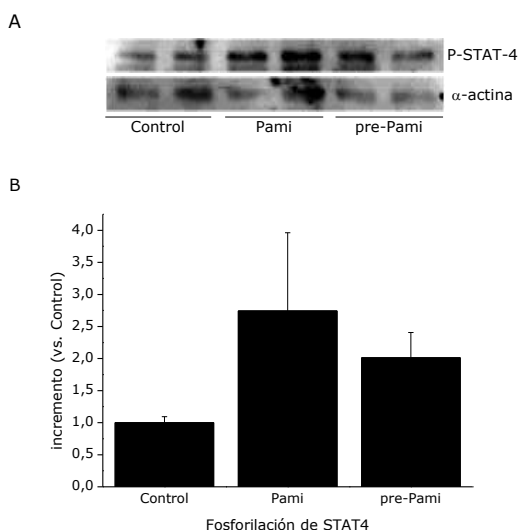


Figura 95: Fosforilación de STAT4 en linfocitos T procedentes del compartimiento inferior en cocultivos de enterocitos y linfocitos T (Transwell®). La cuantificación densitométrica de PCNA se ha referida a la obtenida para α -actina y los valores se expresan como incremento (tanto por uno) frente a esta relación en el grupo control. Pami=Pamidronato, pre-Pami=pre-incubación con Pamidronato. Media \pm SEM. ++ $P < 0,001$ + $P < 0,05$ vs, Control; ## $P < 0,001$ # $P < 0,05$ vs. Pamidronato.

en el sistema Transwell presentan una activación de la proliferación celular, manifestada a través del aumento de la expresión de PCNA (Fig. 94), así como una mayor fosforilación de STAT-4 (Fig. 95).

La terapia farmacológica empleada en la EII está constituida por una serie de fármacos antiinflamatorios cuyo uso no se limita a esta enfermedad, sino que se emplean en muchos trastornos de carácter inflamatorio. Así, la característica común de todos estos tratamientos es un mecanismo antiinflamatorio inespecífico para la EII y, por tanto, la posibilidad de efectos más allá del sistema digestivo y de la enfermedad como tal. Aunque la eficacia de estos fármacos en la EC y en la CU está demostrada y su empleo está totalmente aceptado, existen casos de resistencia o de falta de respuesta. Además, la mayoría de ellos presentan un perfil de efectos adversos considerable, y en el caso de los glucocorticoides, pueden aparecer fenómenos de dependencia. Todos estos aspectos hacen que la farmacología de la EII no sea del todo satisfactoria en la actualidad y la intensa investigación desarrollada para la búsqueda de nuevos agentes está plenamente justificada.

Los bisfosfonatos son fármacos de primera elección en varias enfermedades y trastornos óseos, presentan un perfil de seguridad adecuado con ventajas frente a otros tratamientos. Además, varios bisfosfonatos como alendronato, pamidronato, ibandronato o risedronato han demostrado su eficacia para contrarrestar la pérdida de densidad ósea que sucede en la EII [738, 740-742, 978-981] y en el tratamiento de ésta con glucocorticoides [739, 982, 983]. La posibilidad de que los bisfosfonatos puedan ejercer un efecto antiinflamatorio intestinal permitiría su asociación con otros tratamientos para disminuir la dosis de éstos y, a su vez, tratar las complicaciones óseas con un origen iatrogénico o secundarias a la propia inflamación intestinal. Por todo ello, el estudio del efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos en la EII es un campo con un gran interés científico y con una posible aplicación en el manejo terapéutico de la enfermedad.

Dentro de los bisfosfonatos pueden distinguirse dos grupos en función del mecanismo de acción. Sólo los bisfosfonatos de segunda generación inhiben la prenilación y este hecho es el responsable de su acción farmacológica antirresortiva. Además de los bisfosfonatos, existen otros fármacos que, aunque de forma indirecta, también inhiben la prenilación como las estatinas, que inhiben la síntesis de colesterol al bloquear a la enzima HMGCoA reductasa. Junto a la disminución de los niveles de colesterol, existen otras acciones de las estatinas que se deben a la inhibición de la prenilación, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de los restos isoprenoides empleados en las reacciones de prenilación. Así, muchos de los efectos beneficiosos de las estatinas a nivel cardiovascular parecen ser independientes de la modificación en los niveles de colesterol y se han achacado a la inhibición de la prenilación, y consisten fundamentalmente en efectos antiinflamatorios a nivel del endotelio. Este carácter antiinflamatorio de las estatinas no sólo se observa en el ámbito cardiovascular, sino que se han llevado a cabo ensayos en modelos de EII en los que las estatinas han sido efectivas. Así, se ha demostrado el efecto beneficioso en la colitis por DSS [2, 4, 6, 832], TNBS [3, 5] o ácido acético [1]. También se

han realizado ensayos con pacientes de EII que fueron tratados con estatinas, demostrando éstos efectos inmunomoduladores como una menor producción de quimioquinas [984], [985].

La prenilación de proteínas es un proceso postraducciona fundamental para la funcionalidad celular. Muchas de las proteínas que son preniladas participan en procesos biológicos fundamentales en la respuesta inmune, como la proliferación y diferenciación celular, la regulación del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la inflamación. Además, uno de los principales sustratos de las reacciones de prenilación son las proteínas G de pequeño tamaño o GTP-asas, que están implicadas en la activación de vías de señalización fundamentales a nivel del sistema inmune como NF- κ B o MAP-quinasas. Por todo ello, las sustancias capaces de inhibir este proceso postraducciona se constituyen como una posibilidad atractiva en la identificación de nuevos fármacos antiinflamatorios.

Basándonos en los estudios realizados con las estatinas como inhibidores de la prenilación con propiedades antiinflamatorias, la identificación y caracterización del posible efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados constituye el objetivo de esta tesis doctoral. El planteamiento se basa en los resultados obtenidos con alendronato en el modelo de colitis por TNBS en rata [10], que demuestran un efecto antiinflamatorio de este bisfosfonato. En el desarrollo de la tesis se pretende demostrar si este efecto observado con el alendronato se trata de un efecto de clase y por tanto, está relacionado con la inhibición de la prenilación, o si se trata de un mecanismo independiente de la misma. En cualquier caso las condiciones para el tratamiento y la magnitud de la eficacia de diversos bisfosfonatos, junto con la caracterización del mecanismo de acción en este efecto antiinflamatorio son los aspectos fundamentales a caracterizar.

En los experimentos *in vivo* los bisfosfonatos fueron administrados según un protocolo profiláctico o pretratamiento, a pesar de que el estudio realizado con alendronato se realizó con un postratamiento. Para explicar esta diversidad en cuanto al protocolo de administración, hemos de hacer referencia a la bibliografía publicada referente al uso de estatinas en la EII. La mayor parte de los trabajos publicados hasta 2006 proponen el efecto beneficioso de las estatinas en el tratamiento curativo en modelos preclínicos de EII [4-6], y éstos son la base para el ensayo realizado en un principio con alendronato. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo otros estudios en los que las estatinas han sido empleadas como tratamiento profiláctico, y este aspecto es crucial para la mejora en la colitis que provoca la simvastatina, por ejemplo [2, 835]. Esto explica la elección del tratamiento preventivo, junto con el hecho de que este protocolo permite un contacto prolongado de la sustancia con el intestino y por tanto, permitiría una potenciación del efecto observado con alendronato en el postratamiento.

Otro aspecto importante en la experimentación animal es la dosis administrada. En el tratamiento curativo con alendronato se probaron tres dosis diferentes, de las cuáles sólo las dosis de 25 y 75 mg kg⁻¹ día⁻¹ ejercen un efecto antiinflamatorio, mientras que el alendronato administrado a 10 mg kg⁻¹ día⁻¹ no ejerce ningún efecto beneficioso en el modelo de TNBS. Así, se utilizó la mayor dosis empleada (75 mg kg⁻¹ día⁻¹) en los experimentos sucesivos, ya que ésta implica una mejora del perfil antiinflamatorio del alendronato. A partir de ésta, se calcularon las dosis equimolares de ibandronato y pamidronato, esto es 83 y 80 mg kg⁻¹ día⁻¹, respectivamente.

Como primera aproximación, el modelo de colitis en rata por TNBS muestra que alendronato [10] y pamidronato poseen un efecto antiinflamatorio en este modelo, mientras que ibandronato carece del mismo. Esto nos indica que no se trata de un efecto de clase, o bien el ibandronato posee un mecanismo diferente u otros efectos o propiedades que determinan su ineficacia en el modelo en cuestión. El comportamiento de alendronato y pamidronato puede deberse a un mecanismo diferente, ya que el efecto protector en el caso del alendronato es dependiente de las condiciones experimentales y el tipo de protocolo utilizado en el experimento. Así, al ensayar el alendronato en un pre-tratamiento (principales condiciones en nuestro estudio), desaparece el efecto antiinflamatorio que éste presenta en el post-tratamiento [10], mientras que el pamidronato es eficaz en el pretratamiento.

A pesar del efecto antiinflamatorio de estos inhibidores de prenilación, concretamente, alendronato y pamidronato, este mecanismo de acción de los bisfosfonatos nitrogenados no debe estar implicado en el efecto antiinflamatorio. En primer lugar, las tres moléculas ensayadas *in vivo* han demostrado inhibir eficientemente este proceso [986], y una de ellas, el ibandronato no presenta carácter antiinflamatorio en nuestro modelo experimental. Además, si tenemos en cuenta la potencia relativa de estos fármacos como antirresortivos, el ibandronato debería ser el más eficaz, ya que es el más potente de los incluidos en los ensayos *in vivo* [987]. Por otro lado, los resultados de los ensayos *in vitro* muestran que, en muchos casos, el comportamiento de los inhibidores específicos de la prenilación (FTI-277, GGTI-298 y mevalonina) es diferente al de los bisfosfonatos, incluso totalmente opuesto. Asimismo, si se comparan los resultados mecanísticos de los tres bisfosfonatos ensayados, el pamidronato puede ser considerado como un ente independiente, ya que su comportamiento se asemeja en ocasiones al etidronato (bisfosfonato de primera generación), y no presenta la capacidad de inhibir la prenilación en ninguno de los modelos celulares empleados en este estudio. De este modo, es posible que el efecto antiinflamatorio ejercido por el pamidronato se deba a un mecanismo independiente de la prenilación. Las diferencias de comportamiento con alendronato e ibandronato pueden deberse a la diferencia en la potencia en cuanto a la inhibición de la prenilación.

La administración de los bisfosfonatos por vía intraperitoneal en el modelo de TNBS se constituye como una opción para mejorar las dificultades en la administración oral debido a la escasa biodisponibilidad de estos fármacos por esta vía, permitiendo la llegada de mayores cantidades al torrente circulatorio. Simultáneamente, estos experimentos aportan información acerca de la existencia de un efecto local a nivel intestinal o, por el contrario, de una acción a nivel sistémico. Según estos experimentos, podemos afirmar que la vía de administración es crucial en el efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados, ya que ninguno de ellos, en ninguno de los modelos y protocolos ensayados, tiene la capacidad de prevenir o mejorar el proceso colítico cuando se administran por vía intraperitoneal. Estudios anteriores señalan la ausencia de efecto del alendronato en la colitis inducida por TNBS en ratas cuando éste es administrado por vía intraperitoneal [980]. Así, la vía de administración requerida para el efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos nitrogenados es la oral. Según esto, podemos afirmar que tanto alendronato como pamidronato requieren de un contacto con la mucosa gastrointestinal para ejercer su efecto beneficioso en la EII. Las características farmacocinéticas de los bisfosfonatos deben explicar este comportamiento. Existen estudios *in vitro* [988, 989] e *in vivo* [990] que proponen la absorción paracelular como el principal mecanismo para la absorción intestinal de los bisfosfonatos, debido a su baja lipofilia y a su carácter aniónico. La absorción oral es considerablemente baja, el 50% de la cantidad absorbida se va a fijar al hueso, mientras que el resto va a ser eliminado en su forma original a través de la orina [923, 991]. Estudios farmacocinéticos en animales determinan que la absorción del alendronato y pamidronato es menor al 2% [975] y al 1% [976, 992], respectivamente; mientras que el etidronato, que no es nitrogenado, presenta un mejor perfil de absorción, llegando hasta el 20% en determinadas especies animales [993]. En el caso del humano, los porcentajes de absorción oral son de 0,7% para alendronato [994], 0,3% para pamidronato [995] y 3-7% para etidronato [996]. Esta baja absorción por vía oral se ha tenido en cuenta para el cálculo de la dosis empleada en la vía intraperitoneal, de manera que se ha considerado un 1% de la cantidad administrada oralmente, y ésta ha sido la cantidad utilizada en la vía intraperitoneal. Por otro lado, la administración de alendronato por vía intraperitoneal a dosis superiores a las calculadas según la biodisponibilidad oral del 1% no producen mejora alguna en la colitis, pudiendo incluso observarse un cierto efecto perjudicial. La fijación de los bisfosfonatos al hueso no es homogénea, sino que depende de la actividad de recambio óseo de éstos [975, 997, 998] y, por tanto, van a ser retenidos durante un tiempo más o menos prolongado dependiendo también del recambio óseo. Esto explica que la vida media de eliminación de estos fármacos se prolongue, ya que van a ser retenidos en el hueso y, por tanto, su eliminación se prolongará. La escasa absorción de los bisfosfonatos permite un contacto prolongado con la mucosa intestinal, imprescindible en el efecto antiinflamatorio en la colitis.

El ibandronato no ejerce ningún efecto beneficioso en el modelo de colitis por TNBS, incluso supone una mayor pérdida de peso y un empeoramiento del estado de los animales. Este efecto en el estado general de los animales, no se refleja en la gravedad del proceso colítico, es decir, en la afectación del tejido colónico y otras estructuras a nivel digestivo. Así, el examen macroscópico y las determinaciones bioquímicas muestran una situación similar a la del grupo colítico, incluso puede observarse una tendencia a la recuperación a nivel del colon en el tratamiento con ibandronato. Todo ello hace pensar que existe otro proceso o patología responsable del empeoramiento de los animales debido a ibandronato. La determinación de la concentración de citoquinas en el plasma de estos animales muestra un incremento en IL-6, TNF- α e IL-10, lo que demuestra que existe un fenómeno a nivel sistémico que puede contribuir al peor estado de los animales. Los estudios *in vitro* demuestran la capacidad del ibandronato para incrementar la producción de citoquinas sobre macrófagos purificados o sobre células mononucleares en las que se estimula de forma relativamente específica este tipo celular. En términos generales, el ibandronato aumenta la producción de IL-6 y TNF- α , lo cual coincide con los datos obtenidos en plasma. Además, el tratamiento durante 5 días de esplenocitos con ibandronato provoca un aumento de la expresión de iNOS. El pamidronato no provoca ningún efecto significativo sobre la producción de citoquinas por parte de macrófagos, y esto puede determinar la ausencia de una respuesta a nivel sistémico como ocurre en el caso de ibandronato. El alendronato presenta un comportamiento similar al del pamidronato y de la misma manera no da lugar a una reacción sistémica. De esta forma, podemos decir que el ibandronato provoca un incremento en la producción de citoquinas y otros mediadores por parte de macrófagos, y las consecuencias sistémicas de estas citoquinas en exceso pueden explicar el empeoramiento de los animales cuando son tratados con este bisfosfonato. Existen estudios en los que han demostrado el carácter proinflamatorio del ibandronato al aumentar la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS, concretamente IL-6 e IL-1 β [999], así como alendronato [1000]; además de un aumento de TNF- α producido por PBMC estimulados con LPS [1001]. Esta reacción sistémica puede relacionarse con la reacción de fase aguda descrita en el tratamiento con bisfosfonatos por vía parenteral en humanos, que ocurre en un tercio de los pacientes que se ponen en contacto por primera vez con estos fármacos [968, 1002]. Esta reacción consiste en la aparición de fiebre y de otros síntomas gripales [1003] tras la primera inyección con bisfosfonatos nitrogenados. Además, se ha demostrado que no se produce cuando los bisfosfonatos nitrogenados se administran por vía oral o cuando se emplean bisfosfonatos clásicos o no nitrogenados [941, 966, 967, 1004]. La reacción de fase aguda se relaciona con una mayor producción de IL-6 y TNF- α [1005, 1006] y los estudios más recientes proponen a los linfocitos γ/δ (subtipo V γ 9V δ 2) como fuente de estas citoquinas [1007]. Paradójicamente, los roedores no poseen este subtipo de linfocitos, por lo que no deberían sufrir esta respuesta de fase aguda, así que el efecto observado con ibandronato en el modelo de TNBS ha de deberse a otro tipo celular, como pueden ser macrófagos. De hecho, algunos

trabajos proponen a este tipo celular como el responsable de las citoquinas producidas en la reacción de fase aguda desencadenada por bisfosfonatos [1008]. Otros abogan por un papel secundario de los macrófagos, que van a ser activados tras la activación de los linfocitos T γ/δ [1007].

El pamidronato es el bisfosfonato que presenta un mejor perfil antiinflamatorio de entre de las tres moléculas ensayadas, por ello se ha analizado en profundidad su mecanismo tanto mediante el estudio del transcriptoma colónico en el modelo de colitis por TNBS, como mediante ensayos con distintos modelos celulares.

El efecto del pamidronato sobre enterocitos es diferente al de los otros bisfosfonatos, sobre todo en lo que se refiere a la secreción de IL-8 en líneas celulares humanas. El carácter proinflamatorio de alendronato e ibandronato sobre las líneas epiteliales Caco2 y HT-29 no ha sido descrito previamente en la literatura. Al profundizar en el estudio de la línea Caco2, podemos observar que este efecto ocurre a pesar de la inhibición en la fosforilación de I κ B α que desencadenan ambos bisfosfonatos. La considerable activación de p38 y ERK puede ser la responsable del aumento en la secreción de IL8, lo cual puede contrarrestar la inhibición del factor de transcripción nuclear NF κ B. Existen estudios que describen la implicación de p38 y ERK en la producción de IL-8 en distintos tipos celulares [1009-1011]. Si comparamos lo anteriormente expuesto con la ausencia de efecto del pamidronato sobre la producción de IL-8 en estas líneas de epitelio intestinal humano, llegamos a la conclusión de que la inhibición de la fosforilación de I κ B α es irrelevante; o si consideramos el efecto de GGTI-298 la inhibición de p38 y ERK puede conllevar la inhibición en la síntesis de IL-8, cuando JNK no se encuentra modificado, como ocurre en el caso de Pamidronato. De forma que ERK y p38 pueden regular la producción de esta quimioquina de forma opuesta a JNK.

La falta de efecto del alendronato en el pretratamiento puede estar relacionado con el tiempo de exposición prolongado a esta sustancia y los efectos proinflamatorios que ocurren a nivel de epitelio intestinal. Nuestros resultados muestran un incremento en la producción de IL-8 tanto en Caco2 como en HT29 estimuladas con LPS y tratadas con alendronato durante un tiempo prolongado (5 días o 1 semana). Este carácter proinflamatorio se acompaña de un efecto citotóxico en las líneas celulares HT29 e IEC18, sobre todo en esta última, en la que se observa una disminución en la capacidad de adhesión celular, así como una menor expresión del antígeno de proliferación celular. De esta manera, la exposición del epitelio intestinal a alendronato durante un período de tiempo prolongado puede conllevar efectos proinflamatorios o citotóxicos sobre células epiteliales intestinales que pueden contrarrestar el efecto beneficioso que puede ir asociado en un tratamiento corto, como ocurre en el postratamiento.

Si observamos el efecto sobre la línea celular IEC18, el comportamiento es totalmente diferente, ya que el pamidronato en este caso parece ser el bisfosfonato más activo. Cabe destacar las dos características diferenciales de este modelo de epitelio intestinal, que son la ausencia de un carácter tumoral y el origen de rata, por lo que esto puede explicar las discrepancias entre los resultados obtenidos en Caco2 y HT29 frente a IEC18. El incremento en la expresión de COX2 provocado por ibandronato, pamidronato y mevalonina en el tratamiento a corto plazo coincide con un aumento en la activación de NFκB. La inhibición de ERK y JNK por parte de la mevalonina debe contribuir al incremento de COX2, ya que la magnitud del efecto de mevalonina es mayor que en el caso de pamidronato, a pesar de que la mayor potenciación en la fosforilación de IκBα ocurre con pamidronato. El efecto del alendronato no puede considerarse como una oposición a esta afirmación, debido a la toxicidad desencadenada por dicha sustancia. Por otro lado, no hemos de descartar la posible implicación de otras vías que modulen la expresión de COX2.

En el tratamiento a largo plazo, descartando igualmente al alendronato por su toxicidad aún más pronunciada, y considerando con precaución los resultados en el caso de ibandronato por la misma razón, pamidronato y mevalonina conducen a una inhibición en la expresión de COX2. Este efecto no puede ser explicado por un efecto a nivel de NFκB, ya que pamidronato no modula la activación de dicho factor de transcripción, mientras que la actividad sobre MAPK es compleja y variada.

Los resultados *in vitro* demuestran que el pamidronato es activo sobre linfocitos T, y su actividad se pone de manifiesto en la potenciación de la producción de IFN-γ inducida por concanavalina A. Esta capacidad también es desarrollada por el alendronato. Los resultados obtenidos con los tres inhibidores específicos demuestran que este efecto es independiente de la inhibición de la prenilación, ya que todos ellos inhiben la producción de esta citoquina, especialmente GGTI-298 y mevalonina. De igual modo, los bisfosfonatos con una mayor potencia, como son zoledronato, risedronato e ibandronato, se comportan de forma similar a estos inhibidores en el tratamiento prolongado, mientras que el pamidronato se asemeja más al único bisfosfonato no nitrogenado, el etidronato, que no modifica la producción de IFN-γ en el tratamiento a largo plazo. Esta potenciación de la secreción de IFN-γ no sólo se pone de manifiesto en los experimentos realizados con linfocitos T *in vitro*, sino que se extiende a los modelos *in vivo*. En el modelo de colitis por TNBS, el análisis de la expresión génica muestra una normalización o, al menos, una tendencia de la mayor parte de los genes que codifican citoquinas u otros mediadores proinflamatorios, excepto en el caso del IFN-γ, cuya modulación por parte del pamidronato se produce en sentido inverso, incrementándose con respecto al grupo colítico. En este mismo modelo *in vivo*, la producción de IFN-γ en esplenocitos estimulados con Con A también es potenciada por el pamidronato. Los esplenocitos y células de ganglios linfáticos mesentéricos

obtenidos de animales sanos tratados con pamidronato producen mayor cantidad de la citoquina tras el estímulo con Con A; asimismo, existe un incremento de IFN- γ en el plasma de estas ratas que han recibido el tratamiento oral con pamidronato.

La potenciación en la producción de IFN- γ constituye el efecto más relevante en los ensayos *in vitro*, lo que hace pensar que este fenómeno podría estar relacionado con el mecanismo de acción del efecto antiinflamatorio. La posibilidad de un efecto polarizador en la diferenciación de linfocitos T se confirma en nuestros experimentos, ya que el pamidronato incrementa la cantidad de IFN- γ producida por estas células cuando su diferenciación ha sido dirigida hacia el subtipo Th1 mediante el tratamiento con IL-12. El desequilibrio entre los distintos subtipos de linfocitos T se propuso como hipótesis para explicar la patogenia de la EII. Hoy en día, no sólo se han de considerar los subtipos Th1 y Th2, sino que los linfocitos Th17 y T reguladores forman parte también de la respuesta inmune que participa en la EII. Los resultados del efecto de pamidronato sobre la producción de IFN- γ encajan con la posibilidad de un desequilibrio entre estas diferentes poblaciones celulares. Sin embargo, no existe una modificación en la expresión de IL-17, IL-4 o Foxp3 en esplenocitos estimulados con concanavalina A debido al tratamiento con pamidronato, aunque sí existe una tendencia a disminuir la producción de IL-4, es decir, frenar la diferenciación hacia el subtipo Th2. A pesar de esta tendencia, la magnitud del efecto no permite establecer una afirmación rotunda acerca de la inhibición de la polarización Th2 por parte del pamidronato. Este mismo análisis sobre la expresión génica de diversas citoquinas fue llevado a cabo en linfocitos T purificados. El análisis de estas otras citoquinas en la población purificada de linfocitos T coincide con los resultados obtenidos en esplenocitos totales, observándose la misma tendencia en la IL-4. Sorprendentemente, el pamidronato provoca una inhibición en la expresión de IL-23 en linfocitos T aislados. A pesar de ello, la expresión de IL-17 no está disminuida, así que la inhibición de IL-23 no conlleva una menor polarización hacia el subtipo Th17 en los linfocitos. De este modo, podemos afirmar que la función del IFN- γ no está ligada a la modificación de la síntesis de otras citoquinas o al desequilibrio entre subtipos linfocitarios.

El efecto observado sobre linfocitos T purificados se modifica, al menos en parte, cuando estos linfocitos T se ponen en contacto con enterocitos en un sistema de cocultivo (Transwell[®]). A corto plazo, estos linfocitos T en contacto con la monocapa de enterocitos tratados con pamidronato producen una mayor cantidad de IFN- γ como cabría esperar; sin embargo, cuando el contacto del pamidronato con los enterocitos se prolonga hasta 5 días, la consecuencia final es la activación de linfocitos T y no sólo la producción de IFN- γ . Así, estos linfocitos T aumentan la expresión de PCNA y la producción de IFN- γ , IL-6 e IL-10, además de activarse en ellos la vía de STAT4. En este efecto son imprescindibles los enterocitos, ya que en linfocitos T aislados los efectos

desaparecen en el protocolo prolongado. Además, la fosforilación de STAT-4 o la potenciación de otras citoquinas no se observa en el cultivo rutinario de linfocitos T, sino que la única modificación en este caso es la potenciación en la producción de IFN- γ . A su vez, debe existir un efecto directo sobre los linfocitos T, de modo que el pamidronato atravesará la monocapa de enterocitos y llegará al compartimento inferior del Transwell actuando sobre los linfocitos allí dispuestos. Esto se deduce de la desaparición del efecto observado en la preincubación de los enterocitos con Pamidronato antes de establecerse el cocultivo. La alteración que el pamidronato causa sobre los enterocitos no es suficiente para activar a los linfocitos, sino que el Pamidronato ha de estar en contacto con la monocapa epitelial durante el cocultivo. En la preincubación, el pamidronato sólo podrá actuar sobre los enterocitos, ya que durante la preincubación los linfocitos aún no han sido dispuestos en el compartimento inferior y, por tanto, el pamidronato no podrá contactar con ellos. Estos resultados muestran que existe una respuesta en la que la actuación del pamidronato sobre la monocapa intestinal durante un período de tiempo prolongado provoca alteraciones en el comportamiento de los enterocitos que hace que se potencie la activación de los linfocitos que puedan ponerse en contacto con ellos; pero este efecto, a su vez, se ve favorecido por el pamidronato que atraviesa el epitelio intestinal y que se pone en contacto directo con los linfocitos T. Así, son dos las condiciones necesarias para la obtención del efecto, el contacto del pamidronato con enterocitos y, a su vez, con los linfocitos T dispuestos próximos a éstos. De hecho, es necesaria la presencia de las células epiteliales intestinales, y no sólo de los mediadores solubles producidos por ellas, ya que al tratar linfocitos T aislados con medio condicionado de cultivo de IEC18 con pamidronato, no se observa ningún efecto (datos no mostrados). De este modo, los experimentos realizados con cocultivos de enterocitos y linfocitos T en Transwell apoyan la hipótesis de una interacción entre el epitelio intestinal y las células inmunes para el efecto del pamidronato.

El mecanismo de este efecto conjunto sobre enterocitos y linfocitos T no puede ser dilucidado con los resultados de los que disponemos, aunque pueden plantearse diferentes hipótesis. Las células epiteliales intestinales expresan tanto MHC de clase I y II [597, 1012] como moléculas coestimuladoras [1013-1016]. La polarización de los enterocitos también está implicada en la expresión de todas estas moléculas que participan en la presentación de antígenos, con un patrón de expresión diferente entre la cara apical y la basolateral de las células del epitelio intestinal [1017]. Los enterocitos se constituyen pues como un claro elemento de comunicación entre el lumen intestinal y las poblaciones linfocitarias que se encuentran por debajo del epitelio. Aunque se pensaba que esta función en la presentación antigénica sólo daba lugar a la activación de linfocitos T CD8⁺ mediante la molécula gp180 [1018-1021], y que las células intestinales no tenían la capacidad de activar a células CD4⁺ [1022], recientemente se ha puesto de manifiesto que este comportamiento sufre modificaciones en casos de EII. En esta enfermedad, las células del epitelio

intestinal activan a los linfocitos CD4⁺ adyacentes, ya que se produce una disminución en la expresión de gp180 [1020], lo que impide la activación de células CD8⁺ [563]. Así, el cocultivo de células epiteliales intestinales procedentes de pacientes de EII y linfocitos T provoca una activación de células CD4⁺ con un incremento en la proliferación y en la producción de IFN- γ , pero no de IL-2 [1023]. Según esto, puede considerarse a los enterocitos como células presentadoras de antígenos participando en la activación de los linfocitos T (sea cual sea el subtipo activado) por el pamidronato. La necesidad del contacto entre pamidronato y linfocitos T apoya la noción de una coestimulación, así como el hecho de que los efectos observados en el cocultivo sean de mayor magnitud que en el caso de experimentos realizados con linfocitos T aislados. La participación de las células epiteliales intestinales en la presentación de antígenos en la mucosa intestinal ha sido avalada en diversos estudios.

En el caso de la activación de linfocitos γ/δ , se ha establecido la dependencia de la coestimulación por parte de células de la línea mieloide (monocitos-macrófagos) [1024]. Un modelo para el efecto observado en nuestros cocultivos de enterocitos y linfocitos T es la activación de linfocitos T, probablemente γ/δ por la actuación directa del pamidronato que atraviesa la monocapa de epitelio intestinal y alcanza el compartimento inferior del Transwell; dicha activación recibe señales coestimuladores por parte de los enterocitos cuya capacidad de presentación de antígenos se ve a su vez modulada por el pamidronato. Asimismo este modelo podría explicar los efectos observados *in vivo*.

Los estudios del efecto de la administración de pamidronato a ratas sanas concuerdan con un efecto de activación de linfocitos de forma primaria a nivel gastrointestinal, seguida de una reacción a nivel sistémico. Así, el incremento en la producción de IFN- γ e IL-2 ocurre antes en células de ganglios linfáticos mesentéricos (3 días) que en esplenocitos (5 días) cuando estas células se estimulan con concanavalina A. Lo mismo ocurre con el incremento en el número de células mononucleares. Mientras que en el tratamiento a 8 días, se alcanza la normalización en estos dos parámetros, producción de citoquinas e infiltración celular en bazo y en ganglios mesentéricos.

Una de las hipótesis para explicar este aumento de la producción de IFN- γ desencadenada por el pamidronato es la activación del subtipo de linfocitos T γ/δ . Estos linfocitos responden frente a componentes no peptídicos, fundamentalmente de carácter lipídico, como pueden ser los restos isoprenoides. Aunque la mayoría de los linfocitos circulantes son de tipo α/β , existe una población minoritaria con un TCR característico compuesto por una subunidad γ y una subunidad δ , normalmente independiente de CD4 y CD8, son los linfocitos γ/δ [1025, 1026]. Estos linfocitos suelen localizarse en zonas de infección, y esto determina su papel en la defensa inmune [1027-1029], que se basa en una respuesta inmune temprana responsable de la eliminación de agentes extraños (por ejemplo, virus) hasta que se establece la respuesta citotóxica mediada por linfocitos CD8⁺ α/β , cuyo desarrollo es algo más lento [1030-1034]. A nivel

intestinal los linfocitos T γ/δ participan en el cambio de clase de inmunoglobulinas [1035], en la producción de factores de crecimiento epitelial [1036], en la primera línea de defensa frente a diversos patógenos [1037-1039] y son necesarios en la inducción de tolerancia oral [1040]. La importancia de este subtipo celular a nivel intestinal se demuestra por el mayor número de células γ/δ entre los linfocitos intraepiteliales intestinales cuando se compara con la sangre periférica, tanto en rata y ratón, como en humanos [1041-1043]. Aunque este subtipo de linfocitos puede diferenciarse en Th1 y Th2 [1044], el papel que desempeña el IFN- γ en la defensa antiviral [1045, 1046], así como las grandes cantidades producidas de esta citoquina hacen que sea considerada como la principal efectora en la respuesta mediada por linfocitos γ/δ [1047]. El incremento de IFN- γ observado en nuestros estudios con pamidronato puede proceder de una activación de linfocitos T γ/δ , pudiendo desempeñar un papel importante en mecanismos antibacterianos *in vivo*, como han demostrado otros grupos de investigación [1048]. La importancia de este subtipo de linfocitos ha sido demostrada previamente en el modelo de colitis por TNBS, de forma que la depleción de células γ/δ conlleva una mayor mortalidad en este modelo de colitis [1049]. La activación de las células γ/δ por parte del pamidronato puede contribuir al efecto beneficioso de estas células en el modelo de colitis en cuestión. De hecho, las células γ/δ disminuyen la respuesta frente a haptenos en experimentos *in vitro* [1050] o *in vivo* [1051], como en el caso de la diabetes. Aunque los datos referentes a la modificación en el número de este tipo celular en IBD son controvertidos [1052-1054], existen estudios en animales que apoyan un papel regulador de los linfocitos γ/δ en la IBD, como el desarrollo de colitis espontánea en ratones KO de la cadena γ del TCR. Esta función protectora puede deberse a diversas funciones desempeñadas por estas células, como la retirada de las células epiteliales dañadas, la secreción de factores de crecimiento epitelial o la defensa frente a patógenos entéricos. Además, se ha demostrado que en el desarrollo de colitis por TNBS los linfocitos T α/β no son indispensables, ya que se ha conseguido establecer la enfermedad en ratas atímicas [1055]; y, por otra parte, también podemos afirmar que el IFN- γ es dispensable en el desarrollo de la colitis, ya que el proceso inflamatorio inducido por TNBS ha sido desarrollado en ratones KO de IFN- γ [1056] o del receptor de esta citoquina. La activación de los linfocitos γ/δ ha de ser considerada como una hipótesis, ya que el estudio realizado no permite una afirmación taxativa al respecto.

La posibilidad de una respuesta temprana a nivel intestinal, posiblemente mediada en nuestro caso por linfocitos T γ/δ , concuerda con las publicaciones recientes en las que se ha comprobado que la inhibición de diversas moléculas o procesos dentro de la inmunidad innata o de la respuesta inmune temprana en el intestino supone un empeoramiento de la colitis [635, 1057]. En humanos, determinadas patologías caracterizadas por un defecto en la inmunidad innata como son la enfermedad granulomatosa crónica o el síndrome de Hermansky-Pudlak presentan una mayor incidencia de EII [1058, 1059]. Así la respuesta

inmune innata o aquélla que se desarrolla de forma temprana puede tener un papel crucial en la protección en la EII.

Junto con el efecto sobre IFN- γ , el pamidronato incrementa la expresión de Foxp3, al menos en los esplenocitos extraídos de ratas sanas tratadas con este bisfosfonato. La secuencia temporal de este efecto es similar a la que se observa en el caso de citoquinas, ya que el efecto en ganglios linfáticos mesentéricos es previo al que ocurre sobre esplenocitos. La variabilidad interindividual hace que los datos obtenidos en ganglios mesentéricos deban ser considerados con cautela, ya que no son significativos desde el punto de vista estadístico; pero aún así, la mayor expresión de Foxp3 en esplenocitos queda patente. Es interesante resaltar que este efecto sobre linfocitos T reguladores es más tardío si se compara con la activación de otros linfocitos, esto es, los responsables de la mayor producción de IFN- γ . De hecho, aunque a nivel de ganglios mesentéricos la expresión a los 8 días es normal, en el caso de esplenocitos no se normaliza la expresión de dicha proteína.

La cinética de inhibición de la prenilación también es un punto a destacar. En el caso de las células mononucleares, la inhibición de este proceso es más tardía si se compara con los enterocitos, de modo que sólo en el tratamiento a largo plazo se observa la inhibición de dicho fenómeno. Si se compara el efecto de los bisfosfonatos más activos sobre linfocitos T y macrófagos, podemos llegar a la conclusión de que la inhibición tardía de la prenilación determina su comportamiento a largo plazo, que coincide con el efecto observado con los inhibidores específicos; mientras que a corto plazo, cuando estas sustancias aún no han sido capaces de inhibir la prenilación, los efectos observados son independientes de este proceso y diferentes a los inhibidores del mismo. Por ejemplo, el ibandronato no modifica la secreción de IFN- γ o IL-2 en linfocitos T a las 48 horas de tratamiento, cuando aún no ha sido inhibida la prenilación, mientras que en las mismas condiciones, los tres inhibidores inhiben la producción de ambas citoquinas. En cambio, en el protocolo a largo plazo, tanto ibandronato como GGTI-298 inhiben la secreción de IFN- γ , como lo hacen otros bisfosfonatos como risedronato o zoledronato, considerados los más potentes en la inhibición de la prenilación dentro del grupo de sustancias ensayadas. Otro caso es el efecto del alendronato sobre macrófagos, de modo que la inhibición en la síntesis de IL-10 sólo es notoria en el tratamiento a largo plazo (5 días), mientras que el inhibidor GGTI-298 ejerce este efecto ya a las 24 horas, momento en el que sólo esta sustancia y la mevalonina son capaces de inhibir la prenilación en células mononucleares.

La otra estrategia empleada de forma paralela para caracterizar el efecto antiinflamatorio del pamidronato fue el estudio del transcriptoma colónico mediante microarray. Los resultados muestran que el efecto del Pamidronato es opuesto al de un fármaco antiinflamatorio típico. En primer lugar, el comportamiento observado no se basa solamente en la normalización de los genes modificados por el TNBS, como ocurre en el caso de la sulfasalazina, sino

que el pamidronato modula la expresión de un mayor número de genes que el propio TNBS. Esto nos indica que el efecto no se basa sólo en la normalización de los genes inflamatorios, es decir, de los genes que a su vez son modificados por el TNBS. Independientemente de esto, el Pamidronato da lugar a la normalización de 1456 de los 2018 genes modificados por TNBS (frente a 1097 genes en el caso de la sulfasalazina), demostrando asimismo su capacidad antiinflamatoria. Pero además este bisfosfonato provoca la potenciación en la modulación de algunos genes sensibles a TNBS, ya sea incremento o disminución en su expresión. Por otro lado existe un total de 3216 genes modificados por Pamidronato y que no fueron modulados por TNBS, lo que apoya la hipótesis de un mecanismo antiinflamatorio atípico.

La expresión de marcadores celulares muestra que existe una disminución en la infiltración de linfocitos T y B y, sobre todo, neutrófilos. Esta situación puede mostrar la menor infiltración celular debida al propio efecto antiinflamatorio que se observa en el modelo de TNBS y, por tanto, no se opone a la activación que el Pamidronato ha demostrado ejercer sobre linfocitos T en los experimentos *in vitro*. Por otro lado, si consideramos los experimentos realizados en animales sanos, la cinética de la activación e infiltración de linfocitos apoya esta observación, ya que en tras ocho días de tratamiento con pamidronato ya se ha alcanzado la normalización de los niveles de producción de citoquinas y de número de células mononucleares en ganglios linfáticos mesentéricos, e incluso en bazo.

En el análisis a través de la plataforma Ingenuity de las vías modificadas en el transcriptoma colónico destaca el efecto del pamidronato sobre la vía del ácido retinoico, de forma que el bisfosfonato incrementa la expresión de diversos genes relacionados con esta vía. Las propiedades inmunomoduladoras del ácido retinoico han sido ampliamente estudiadas, demostrándose el efecto antiinflamatorio del mismo en modelos preclínicos de EII [1060-1062]. El mecanismo implicado en este efecto se basa en la capacidad del ácido retinoico para modificar la diferenciación de linfocitos, de manera que disminuyen la respuesta Th1 o Th17 potenciándose la respuesta Th2 o Treg [1060, 1063-1066]. En este efecto podrían estar implicadas las células dendríticas y la modulación en la producción de citoquinas que el ácido retinoico provoca en estas células [1067]. Así, el ácido retinoico promueve una menor producción de IL-23, lo que explicaría la inhibición en la diferenciación hacia Th17 y la aparición de un mayor número de linfocitos T reguladores. A su vez, se han descrito efectos beneficiosos del ácido retinoico sobre la integridad de la barrera epitelial en situaciones en las que se produce un daño a nivel de la mucosa [1068].

Estos resultados obtenidos en los experimentos de genómica han de ser considerados como datos preliminares, ya que hasta la fecha no han sido confirmados mediante ensayos de postgenómica u otro tipo de experimentos no genómicos. Aún así, constituyen la base para profundizar en la caracterización del mecanismo de acción del pamidronato como antiinflamatorio en la EII.

Además del efecto observado con los bisfosfonatos, los ensayos *in vitro* con los inhibidores específicos, han permitido relacionar la inhibición de la prenilación con la alteración de la biología y función de varios tipos celulares fundamentales en la respuesta inmune a nivel intestinal. El efecto de la inhibición de la prenilación sobre células mononucleares es sorprendente. Todos los inhibidores demuestran un potencial efecto antiproliferativo, ya sea por inhibición en la incorporación de timidina o por una menor expresión de PCNA. Esto se acompaña de una clara inhibición en la producción de citoquinas, así como de una menor expresión de Foxp3, especialmente en el caso de GGTI-298 y mevalonina. Esta inhibición de la síntesis de citoquinas también se produce, con algunas salvedades, en el caso de linfocitos T o macrófagos purificados. Este carácter antiinflamatorio se pone de manifiesto igualmente en el caso de GGTI-298 en los estudios realizados en enterocitos, en los que muestra su capacidad para inhibir la síntesis de IL-8. Estos resultados obtenidos con los inhibidores específicos demuestran la importancia del proceso de prenilación en la respuesta inmune y corroboran los resultados prometedores obtenidos con estatinas como fármacos antiinflamatorios. De hecho, son escasos los estudios realizados con inhibidores de la farnesilación o la geranilgeranilación en inflamación y concretamente en EII. El estudio de los inhibidores específicos de la prenilación como fármacos antiinflamatorios y su potencial uso en la EII se constituyen como un nuevo campo en la investigación.

Modelo del mecanismo de acción de los Bisfosfonatos nitrogenados en la EII.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la discusión planteada, podemos formular una hipótesis sobre el modo de acción de los bisfosfonatos nitrogenados, particularmente el pamidronato, en la inflamación intestinal. En efecto, el pamidronato y el alendronato son los únicos bisfosfonatos nitrogenados ensayados *in vivo* que ejercen efectos beneficiosos globales, aunque por supuesto no puede descartarse que otros bisfosfonatos nitrogenados sean eficaces en la inflamación intestinal. Es claro que tanto el pamidronato como el alendronato requieren su administración oral para ser eficaz. Por tanto, consideramos que la acción terapéutica se ejerce a nivel local. De hecho, las acciones sistémicas o periféricas son probablemente perjudiciales, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos con ibandronato aun administrado por vía oral.

El requerimiento de la administración oral contrasta fuertemente con los niveles de biodisponibilidad considerablemente bajos que son harto conocidos en este grupo farmacológico, tanto en humanos como en la rata. No obstante, dado que se ha constatado el fracaso del tratamiento intraperitoneal a dosis cuantitativamente equivalentes a la fracción absorbida de la dosis oral en el caso del pamidronato, el éxito parece depender más del sitio de administración que de la cantidad absorbida. Por tanto, el mecanismo de acción del pamidronato puede estar relacionado con acciones sobre el epitelio, o bien sobre células

subyacentes inmunocompetentes que puedan ser moduladas de forma más eficiente mediante el acceso del fármaco desde la luz intestinal.

El estudio de los efectos del pamidronato en cultivos celulares de enterocitos (IEC18, HT29 y Caco-2) permite reproducir hasta cierto punto la acción del fármaco in vivo. Efectivamente, la escasa absorción de los bisfosfonatos nitrogenados a través de la mucosa intestinal propicia un contacto prolongado con el epitelio. Asumiendo que el 98% de la dosis oral ($80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) llegue intacta al colon, no es aventurado suponer que puedan alcanzarse concentraciones como las ensayadas in vitro ($100 \text{ }\mu\text{M}$). En estas condiciones el pamidronato es esencialmente inactivo, mientras que alendronato y otros bisfosfonatos nitrogenados estimulan la producción de IL-8 y activan vías MAPK, y el alendronato es además citotóxico. Por tanto, descartamos que el pamidronato actúe modulando la producción de citoquinas a nivel epitelial. Por el contrario, las acciones del alendronato sobre el epitelio podrían justificar el hecho de que pierda eficacia en tratamientos preventivos. Las diferencias de actuación entre los distintos bisfosfonatos nitrogenados pueden obedecer a su distinta capacidad para inhibir la prenilación celular en estas condiciones.

El pamidronato, por otra parte, tiene un efecto reproducible sobre los linfocitos T, coherente con una promoción de la diferenciación de linfocitos Th1 o con su activación. Este efecto es compartido con el alendronato, aunque éste parece ser menos potente, pero no con el ibandronato. Es decir, existe una correlación excelente entre esta acción y el efecto terapéutico. Estos experimentos fueron realizados con fines exploratorios con concentraciones de $100 \text{ }\mu\text{M}$ de fármaco, que son probablemente demasiado altas para la *lamina propria*. No obstante, se observan efectos similares en cocultivos de células IEC18 y linfocitos T primarios expuestos a pamidronato en su cara apical. De hecho, los efectos son más prolongados en este caso, ya que se mantienen e incluso potencian a 5 días, en tanto que el tratamiento directo de los linfocitos T no tiene efecto a los 5 días. La modulación en este modelo in vitro parece depender en buena medida de la exposición prolongada de los enterocitos, ya que el tratamiento previo de los mismos con pamidronato reproduce en parte el efecto. No obstante, éste se potencia cuando hay pamidronato en el medio apical durante el cocultivo, lo que sugiere que parte del efecto es achacable al paso del fármaco a través de la monocapa de IEC18 y a su modulación directa de los linfocitos T. En cualquier caso, nuestros datos tanto in vivo como in vitro indican que el pamidronato es capaz de modular la función linfocitaria actuando desde la luz intestinal.

En definitiva, nuestros datos sugieren que el pamidronato puede, directa o indirectamente, potenciar la función o diferenciación de linfocitos Th1 en la mucosa intestinal, y que este hecho está correlacionado con el efecto beneficioso in vivo. ¿Cómo puede traducirse esta activación inmunológica en un efecto antiinflamatorio? Nuestros datos no nos permiten responder a esta pregunta categóricamente, pero es perfectamente posible que la potenciación de la

defensa de la mucosa pueda determinar una respuesta inmunológica global reducida, mediante un control temprano de la invasión de antígenos y microorganismos. Existen numerosos estudios que preconizan esta teoría. Posiblemente uno de los más interesantes fue el llevado a cabo por el grupo de Neurath, en el cual la represión condicional de NEMO y, por tanto, de NF- κ B en células epiteliales, produce inflamación colónica de manera espontánea [635]. Otro estudio demostró que sargramostim, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), produce mejoría en CD [1069]. Los ratones deficientes en Cxcl1 (también conocida como KC o Gro- α), la quimioquina considerada equivalente a IL-8 en humanos, son más sensibles a la colitis experimental inducida por DSS [1070]. También se ha descrito que la ausencia de monocitos y células dendríticas empeora la colitis experimental [1071, 1072]. De hecho, las mismas variantes genéticas de NOD2 asociadas a un mayor riesgo de contraer IBD podrían estar asociadas no con una potenciación, sino a una disminución de la respuesta asociada a NF- κ B [234, 235]. En su conjunto, estos estudios apoyan la tesis de que la inflamación intestinal pueda desencadenarse como consecuencia de una respuesta no especialmente robusta del sistema inmunológico. Una respuesta inmunológica "tímida" es incapaz de eliminar rápidamente las bacterias que hayan sobrepasado la barrera epitelial, permitiendo la activación masiva del sistema inmune adaptativo, el cual es el responsable último de la inflamación crónica [1073].

Por tanto, nuestra hipótesis se resume de la siguiente manera: el pamidronato produce paulatinamente alteraciones moleculares en el enterocito no caracterizadas en detalle pero que son independientes de la preilación de proteínas, las cuales no alteran sustancialmente su estado de activación inmunológica pero permiten la modulación de linfocitos T subyacentes. El resultado es una potenciación de la defensa mucosal que en último término se traduce en una menor respuesta inflamatoria global, al ser más eficiente. Cabe recordar aquí que existen aspectos mecanísticos que sólo hemos empezado a explorar recientemente. En particular, el análisis genómico indica una modulación masiva de genes "no inflamatorios" que habrá de ser estudiada con detalle en una próxima etapa.

1. Nitrogen-containing bisphosphonates, particularly alendronate and pamidronate, have antiinflammatory effects in preclinical models of inflammatory bowel disease.
2. This effect is not a class effect, since some nitrogen-containing bisphosphonates are not able to reproduce it, such as ibandronate.
3. The improvement of colitis requires the oral administration of bisphosphonates. The contact between the bisphosphonate and the intestinal epithelium appears to be necessary for the anti-inflammatory effect.
4. The improvement of pamidronate-induced colitis is independent of prenylation.
5. The mechanism of action of pamidronate is complex, but the genomic analysis indicates that, unlike sulfasalazine and other drugs, it appears to involve the modulation of multiple genes not affected by the inflammatory reaction as well as the increased IFN- γ production in T lymphocytes.

1. Chen, C., Z.H. Ran, and S.D. Xiao, [Therapeutic effects of pravastatin on colitis induced by acetic acid and relevant mechanism: experiment with rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006. **86**(18): p. 1284-8.
2. Lee, J.Y., et al., Simvastatin inhibits NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates acute murine colitis. *Int Immunopharmacol*, 2007. **7**(2): p. 241-8.
3. Ikeda, M., et al., Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis. *Dig Dis Sci*, 2008. **53**(7): p. 1869-75.
4. Naito, Y., et al., Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, reduces the colonic inflammatory response in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med*, 2006. **17**(6): p. 997-1004.
5. Jahovic, N., et al., Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats. *Scand J Gastroenterol*, 2006. **41**(8): p. 954-62.
6. Sasaki, M., et al., The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor pravastatin reduces disease activity and inflammation in dextran-sulfate induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **305**(1): p. 78-85.
7. Mach, F., Statins as immunomodulators. *Transl Immunol*, 2002. **9**(2-4): p. 197-200.
8. Takada, Y., F.R. Khuri, and B.B. Aggarwal, Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J Biol Chem*, 2004. **279**(25): p. 26287-99.
9. Mazieres, J., A. Pradines, and G. Favre, Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett*, 2004. **206**(2): p. 159-67.
10. Ballester, I., et al., The bisphosphonate alendronate improves the damage associated with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Br J Pharmacol*, 2007. **151**(2): p. 206-15.
11. Stokes, M.A., Crohn's disease and nutrition. *Br J Surg*, 1992. **79**(5): p. 391-4.
12. Reimund, J.M., et al., Immune activation and nutritional status in adult Crohn's disease patients. *Dig Liver Dis*, 2005. **37**(6): p. 424-31.
13. O'Keefe, S., *Inflammatory Bowel disease: from bench to bedside*, ed. W. Wilkins. 1994, Baltimore. 461-77.
14. Rigaud, D., et al., Mechanisms of decreased food intake during weight loss in adult Crohn's disease patients without obvious malabsorption. *Am J Clin Nutr*, 1994. **60**(5): p. 775-81.
15. Hodges, P., et al., Protein-energy intake and malnutrition in Crohn's disease. *J Am Diet Assoc*, 1984. **84**(12): p. 1460-4.
16. Lanfranchi, G.A., et al., Assessment of nutritional status in Crohn's disease in remission or low activity. *Hepatogastroenterology*, 1984. **31**(3): p. 129-32.
17. Rocha, R., et al., Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. *Br J Nutr*, 2009. **101**(5): p. 676-9.
18. Vaisman, N., et al., Malabsorption is a major contributor to underweight in Crohn's disease patients in remission. *Nutrition*, 2006. **22**(9): p. 855-9.
19. Van Patter, W., *Gastroenterology* 1954. **26**: p. 347-350.
20. Bielefeldt, K., B. Davis, and D.G. Binion, Pain and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(5): p. 778-88.
21. Kulnigg, S. and C. Gasche, Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **24**(11-12): p. 1507-23.
22. de la Morena, F. and J.P. Gisbert, [Anemia and inflammatory bowel disease]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2008. **100**(5): p. 285-93.
23. Gasche, C., et al., Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*, 2004. **53**(8): p. 1190-7.
24. Gasche, C., Anemia in IBD: the overlooked villain. *Inflamm Bowel Dis*, 2000. **6**(2): p. 142-150; discussion 151.
25. Wilson, A., E. Reyes, and J. Ofman, Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med*, 2004. **116 Suppl 7A**: p. 44S-49S.
26. Kanof, M.E., A.M. Lake, and T.M. Bayless, Decreased height velocity in children and adolescents before the diagnosis of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1988. **95**(6): p. 1523-7.
27. Hildebrand, H., J. Karlberg, and B. Kristiansson, Longitudinal growth in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994. **18**(2): p. 165-73.
28. Kirschner, B.S., Growth and development in chronic inflammatory bowel disease. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1990. **366**: p. 98-104; discussion 105.
29. Shamir, R., M. Phillip, and A. Levine, Growth retardation in pediatric Crohn's disease: pathogenesis and interventions. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 620-8.
30. Heuschkel, R., et al., Guidelines for the management of growth failure in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(6): p. 839-49.

31. Freeman, H.J., *Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades*. J Clin Gastroenterol, 2003. **37**(3): p. 216-9.
32. Malchow, H., et al., [*Localization and extent of Crohn disease at initial diagnosis*]. Med Klin (Munich), 1987. **82**(4): p. 140-5.
33. Price, A.B. and B.C. Morson, *Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Hum Pathol, 1975. **6**(1): p. 7-29.
34. Bernstein, C.N., et al., *Patchiness of mucosal inflammation in treated ulcerative colitis: a prospective study*. Gastrointest Endosc, 1995. **42**(3): p. 232-7.
35. Bernstein, C.N., F. Shanahan, and W.M. Weinstein, *Histological patchiness and sparing of the rectum in ulcerative colitis: refuting the dogma*. J Clin Pathol, 1997. **50**(4): p. 354-5.
36. Hellers, G., et al., *Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease*. Gut, 1980. **21**(6): p. 525-7.
37. 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.
38. Kelly, J.K. and R.M. Preshaw, *Origin of fistulas in Crohn's disease*. J Clin Gastroenterol, 1989. **11**(2): p. 193-6.
39. Michelassi, F., et al., *Incidence, diagnosis, and treatment of enteric and colorectal fistulae in patients with Crohn's disease*. Ann Surg, 1993. **218**(5): p. 660-6.
40. Solomon, M.J., *Fistulae and abscesses in symptomatic perianal Crohn's disease*. Int J Colorectal Dis, 1996. **11**(5): p. 222-6.
41. Bell, S.J., et al., *The clinical course of fistulating Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(9): p. 1145-51.
42. Freeman, H.J., *Granuloma-positive Crohn's disease*. Can J Gastroenterol, 2007. **21**(9): p. 583-7.
43. Matsumoto, T., et al., *Role of granuloma in the immunopathogenesis of Crohn's disease*. Digestion, 2001. **63 Suppl 1**: p. 43-7.
44. Allen, A.C., *A unified concept of the vascular pathogenesis of enterocolitis of varied etiology. A pathophysiologic analysis*. Am J Gastroenterol, 1971. **55**(4): p. 347-78.
45. 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.
46. Erikson, U., et al., *Angiographic studies in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1970. **110**(2): p. 385-92.
47. Hulten, L., et al., *Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gastroenterology, 1977. **72**(3): p. 388-96.
48. Johansson, H., U. Krause, and L. Olding, *Microangiographic studies in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Acta Chir Scand, 1972. **138**(4): p. 409-14.
49. Tsuchiya, M., et al., *Angiographic evaluation of vascular changes in ulcerative colitis*. Angiology, 1980. **31**(3): p. 147-53.
50. 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.
51. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangioma-like lesions and pan-nodal vasodilatation*. J Pathol, 1983. **140**(3): p. 209-19.
52. Wong, C.K. and B.R. Yacyshyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
53. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. Gastroenterol Clin North Am, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
54. Regueiro, M.D., *Diagnosis and treatment of ulcerative proctitis*. J Clin Gastroenterol, 2004. **38**(9): p. 733-40.
55. Haghghi, D.B. and B.A. Lashner, *Left-sided ulcerative colitis*. Gastroenterol Clin North Am, 2004. **33**(2): p. 271-84, ix.
56. Lakatos, P.L. and L. Lakatos, *Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(25): p. 3937-47.
57. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. Gut, 2001. **48**(4): p. 526-35.
58. Lakatos, L., et al., *Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(3): p. 205-11.
59. Delaunoy, T., et al., *Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(3): p. 335-42.
60. Bernstein, C.N., et al., *Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study*. Cancer, 2001. **91**(4): p. 854-62.
61. Rutter, M.D., et al., *Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1030-8.
62. Eaden, J., *Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 4**: p. 24-30.
63. Riddell, R.H., et al., *Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical*

- applications. *Hum Pathol*, 1983. **14**(11): p. 931-68.
64. Lennard-Jones, J.E., et al., *Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years.* *Gut*, 1990. **31**(7): p. 800-6.
65. Nugent, F.W., et al., *Malignant potential of chronic ulcerative colitis. Preliminary report.* *Gastroenterology*, 1979. **76**(1): p. 1-5.
66. Geboes, K. and P. Rutgeerts, *Dysplasia in inflammatory bowel diseases: definition and clinical impact.* *Can J Gastroenterol*, 1999. **13**(8): p. 671-8.
67. Campbell, F.C. and R.J. Maxwell, *Rationale for cancer prevention strategies in high-risk ulcerative colitis.* *Surgeon*, 2009. **7**(2): p. 96-100.
68. Ahmadi, A., S. Polyak, and P.V. Draganov, *Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues.* *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(1): p. 61-6.
69. Ullman, T., R. Odze, and F.A. Farraye, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon.* *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(4): p. 630-8.
70. Blackstone, M.O., et al., *Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy.* *Gastroenterology*, 1981. **80**(2): p. 366-74.
71. Befrits, R., et al., *DNA aneuploidy and histologic dysplasia in long-standing ulcerative colitis. A 10-year follow-up study.* *Dis Colon Rectum*, 1994. **37**(4): p. 313-9; discussion 319-20.
72. Suzuki, K., et al., *Differential diagnosis of dysplasia-associated lesion or mass and coincidental adenoma in ulcerative colitis.* *Dis Colon Rectum*, 1998. **41**(3): p. 322-7.
73. Fogt, F., et al., *Distinction between dysplasia-associated lesion or mass (DALM) and adenoma in patients with ulcerative colitis.* *Hum Pathol*, 2000. **31**(3): p. 288-91.
74. Ullman, T., et al., *Progression of flat low-grade dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis.* *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1311-9.
75. Fu, K., et al., *Synchronous colitic cancers and microcarcinoids in a patient with long-standing and extensive ulcerative colitis: a case report and review of the literature.* *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2008. **18**(3): p. 304-7.
76. Dumot, J.A., et al., *Sarcoidosis presenting as granulomatous colitis.* *Am J Gastroenterol*, 1998. **93**(10): p. 1949-51.
77. Molnar, T., et al., *Clinical significance of granuloma in Crohn's disease.* *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(20): p. 3118-21.
78. 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.
79. Andersson, P., et al., *Increased anal resting pressure and rectal sensitivity in Crohn's disease.* *Dis Colon Rectum*, 2003. **46**(12): p. 1685-9.
80. Shepherd, N.A., *Pathological mimics of chronic inflammatory bowel disease.* *J Clin Pathol*, 1991. **44**(9): p. 726-33.
81. Higuero, T., et al., *Jejunioileal Crohn's disease: a case-control study.* *Gastroenterol Clin Biol*, 2004. **28**(2): p. 160-6.
82. Wright, C.L. and R.H. Riddell, *Histology of the stomach and duodenum in Crohn's disease.* *Am J Surg Pathol*, 1998. **22**(4): p. 383-90.
83. Maamouri, N., et al., *[Case report of isolated Crohn's disease of the stomach presenting as plastica linitis].* *Tunis Med*, 2006. **84**(8): p. 513-6.
84. Gyde, S.N., et al., *Malignancy in Crohn's disease.* *Gut*, 1980. **21**(12): p. 1024-9.
85. Ekblom, A., et al., *Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement.* *Lancet*, 1990. **336**(8711): p. 357-9.
86. Patel, M., et al., *Gastric Crohn's disease complicated by adenocarcinoma of the stomach: case report and review of the literature.* *Am J Gastroenterol*, 1997. **92**(8): p. 1368-71.
87. Ribeiro, M.B., et al., *Colorectal adenocarcinoma in Crohn's disease.* *Ann Surg*, 1996. **223**(2): p. 186-93.
88. Sigel, J.E., et al., *Intestinal adenocarcinoma in Crohn's disease: a report of 30 cases with a focus on coexisting dysplasia.* *Am J Surg Pathol*, 1999. **23**(6): p. 651-5.
89. Jess, T., et al., *Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies.* *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(12): p. 2724-9.
90. Canavan, C., K.R. Abrams, and J. Mayberry, *Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease.* *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23**(8): p. 1097-104.
91. Hemminki, K., et al., *Cancer risks in Crohn disease patients.* *Ann Oncol*, 2009. **20**(3): p. 574-80.
92. Fornaro, R., et al., *[Crohn's disease and cancer].* *Ann Ital Chir*, 2009. **80**(2): p. 119-25.
93. De la Fuente Perucho, A., et al., *[Correlation between dysplasia and malignization risk of Crohn disease].* *Rev Esp Enferm Dig*, 1992. **81**(4): p. 241-5.
94. Maykel, J.A., et al., *Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients.* *Dis Colon Rectum*, 2006. **49**(7): p. 950-7.

95. Svrcek, M., et al., *Colorectal neoplasia in Crohn's colitis: a retrospective comparative study with ulcerative colitis*. *Histopathology*, 2007. **50**(5): p. 574-83.
96. Price, A.B., *Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'*. *J Clin Pathol*, 1978. **31**(6): p. 567-77.
97. Martland, G.T. and N.A. Shepherd, *Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity*. *Histopathology*, 2007. **50**(1): p. 83-96.
98. Carvalho, R.S., et al., *Indeterminate colitis: a significant subgroup of pediatric IBD*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(4): p. 258-62.
99. Guindi, M. and R.H. Riddell, *Indeterminate colitis*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(12): p. 1233-44.
100. 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.
101. Sicilia, B., R. Vicente, and F. Gomollon, *[Epidemiology of inflammatory bowel disease: controversies in classical epidemiology]*. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 2009. **39**(2): p. 135-45.
102. Vind, I., et al., *Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database*. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(6): p. 1274-82.
103. Abakar-Mahamat, A., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease in Corsica from 2002 to 2003*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2007. **31**(12): p. 1098-103.
104. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. *Gut*, 1988. **29**(3): p. 346-51.
105. Moum, B., et al., *Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists*. *Scand J Gastroenterol*, 1996. **31**(4): p. 362-6.
106. Ekbohm, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(2): p. 350-8.
107. Bjornsson, S. and J.H. Johannsson, *Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000. **12**(1): p. 31-8.
108. Munkholm, P., et al., *Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence*. *Scand J Gastroenterol*, 1992. **27**(7): p. 609-14.
109. Roin, F. and J. Roin, *Inflammatory bowel disease of the Faroe Islands, 1981-1988. A prospective epidemiologic study: primary report*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1989. **170**: p. 44-6; discussion 50-5.
110. Loftus, E.V., Jr., et al., *Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival*. *Gastroenterology*, 1998. **114**(6): p. 1161-8.
111. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
112. Brullet, E., et al., *[Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]*. *Med Clin (Barc)*, 1998. **110**(17): p. 651-6.
113. Lopez Miguel, C., et al., *[Incidence of inflammatory bowel disease in Aragon: outcome of a prospective population-based study]*. *Gastroenterol Hepatol*, 1999. **22**(7): p. 323-8.
114. Arin Letamendia, A., et al., *[High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2008. **31**(3): p. 111-6.
115. Loftus, E.V., Jr., et al., *Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival*. *Gut*, 2000. **46**(3): p. 336-43.
116. Nordenvall, B., et al., *Incidence of ulcerative colitis in Stockholm County 1955-1979*. *Scand J Gastroenterol*, 1985. **20**(7): p. 783-90.
117. Norlen, B.J., U. Krause, and L. Bergman, *An epidemiological study of Crohn's disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1970. **5**(5): p. 385-90.
118. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 206-11.
119. Askling, J., et al., *Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden*. *Lancet*, 1999. **354**(9185): p. 1179.
120. Lindberg, E., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000. **30**(3): p. 259-64.
121. Grieci, T. and A. Butter, *The incidence of inflammatory bowel disease in the pediatric population of Southwestern Ontario*. *J Pediatr Surg*, 2009. **44**(5): p. 977-80.
122. Orel, R., et al., *Epidemiology of pediatric chronic inflammatory bowel disease in central and western Slovenia, 1994-2005*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. **48**(5): p. 579-86.
123. White, J.M., et al., *Inflammatory bowel disease in African American children*

- compared with other racial/ethnic groups in a multicenter registry. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(12): p. 1361-9.
124. Castro, M., et al., *Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Italy: data from the pediatric national IBD register (1996-2003)*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(9): p. 1246-52.
125. Turunen, P., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987-2003*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(8): p. 677-83.
126. Karolewska-Bochenek, K., et al., *Epidemiology of inflammatory bowel disease among children in Poland. A prospective, population-based, 2-year study, 2002-2004*. *Digestion*, 2009. **79**(2): p. 121-9.
127. 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.
128. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *Eur J Radiol*, 2000. **35**(3): p. 154-67.
129. 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.
130. Kyle, J., *Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(2): p. 392-9.
131. Sonnenberg, A., D.J. McCarty, and S.J. Jacobsen, *Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(1): p. 143-9.
132. Loftus, E.V., Jr., P. Schoenfeld, and W.J. Sandborn, *The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002. **16**(1): p. 51-60.
133. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. *Gut*, 1996. **39**(5): p. 690-7.
134. Ekbom, A., *The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed?* *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10** **Suppl 1**: p. S32-4.
135. Lakatos, L. and P.L. Lakatos, *[Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]*. *Orv Hetil*, 2007. **148**(5): p. 223-8.
136. 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.
137. 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.
138. Vucelic, B., et al., *Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980-1989*. *Int J Epidemiol*, 1991. **20**(4): p. 1043-7.
139. Wang, Y.F., H. Zhang, and Q. Ouyang, *Clinical manifestations of inflammatory bowel disease: East and West differences*. *J Dig Dis*, 2007. **8**(3): p. 121-7.
140. Lakatos, P.L., *Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down?* *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(38): p. 6102-8.
141. Brahme, F., C. Lindstrom, and A. Wenckert, *Crohn's disease in a defined population. An epidemiological study of incidence, prevalence, mortality, and secular trends in the city of Malmo, Sweden*. *Gastroenterology*, 1975. **69**(2): p. 342-51.
142. Acheson, E.D. and M.D. Nefzger, *Ulcerative colitis in the United States Army in 1944. Epidemiology: comparisons between patients and controls*. *Gastroenterology*, 1963. **44**: p. 7-19.
143. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1967. **2**(2): p. 129-36.
144. Blanchard, J.F., et al., *Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Am J Epidemiol*, 2001. **154**(4): p. 328-35.
145. Sonnenberg, A., *Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany*. *Gut*, 1989. **30**(3): p. 367-70.
146. Gilat, T., et al., *Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study*. *Scand J Gastroenterol*, 1987. **22**(8): p. 1009-24.
147. Ekbom, A., et al., *Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study*. *Am J Epidemiol*, 1990. **132**(6): p. 1111-9.
148. Bernstein, C.N., et al., *The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(7): p. 2117-25.
149. Yang, H., et al., *Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews*. *Gut*, 1993. **34**(4): p. 517-24.
150. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. *Lancet*, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
151. Klement, E., et al., *Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study*.

- Am J Gastroenterol, 2008. **103**(7): p. 1775-168. 82.
152. Acheson, E.D., *The distribution of ulcerative colitis and regional enteritis in United States veterans with particular reference to the Jewish religion.* Gut, 1960. **1**: p. 291-3. 169.
153. Wright, J.P., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984.* S Afr Med J, 1986. **70**(1): p. 10-5. 170.
154. Mayberry, J.F., et al., *Crohn's disease in Jewish people--an epidemiological study in south-east Wales.* Digestion, 1986. **35**(4): p. 237-40. 171.
155. Monk, M., et al., *An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis among adults in Baltimore. I. Hospital incidence and prevalence, 1960 to 1963.* Gastroenterology, 1968. **54**(4): p. Suppl:822-4. 172.
156. 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. 173.
157. Logan, R.F., et al., *Smoking and ulcerative colitis.* Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **288**(6419): p. 751-3. 174.
158. Calkins, B.M., *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(12): p. 1841-54. 175.
159. Beaugerie, L., et al., *Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis.* Am J Gastroenterol, 2001. **96**(7): p. 2113-6. 176.
160. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study.* Int J Colorectal Dis, 1993. **8**(2): p. 71-4. 177.
161. Somerville, K.W., et al., *Smoking and Crohn's disease.* Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6450): p. 954-6. 178.
162. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking.* Am J Epidemiol, 1987. **125**(3): p. 445-52. 179.
163. 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. 180.
164. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease.* Gastroenterology, 1994. **106**(3): p. 643-8. 181.
165. Kane, S.V., M. Flicker, and F. Katz-Nelson, *Tobacco use is associated with accelerated clinical recurrence of Crohn's disease after surgically induced remission.* J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(1): p. 32-5. 182.
166. Mahid, S.S., et al., *Active and passive smoking in childhood is related to the development of inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(4): p. 431-8. 183.
167. van der Heide, F., et al., *Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(8): p. 1199-207. 184.
- Seksik, P., et al., *Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(5): p. 734-41. 185.
- Lakatos, L., et al., *Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001.* World J Gastroenterol, 2004. **10**(3): p. 404-9. 186.
- Cosnes, J., et al., *Gender differences in the response of colitis to smoking.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(1): p. 41-8. 187.
- Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis.* Gastroenterology, 1994. **106**(5): p. 1251-3. 188.
- 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. 189.
- 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. 190.
- Ekbohm, A., *Appendectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* Gut, 1998. **43**(4): p. 451. 191.
- Andersson, R.E., et al., *Appendectomy and protection against ulcerative colitis.* N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 808-14. 192.
- Koutroubakis, I.E., I.G. Vlachonikolis, and E.A. Kouroumalis, *Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review.* Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(4): p. 277-86. 193.
- 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. 194.
- Cosnes, J., et al., *Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis.* Gut, 2002. **51**(6): p. 803-7. 195.
- de Saussure, P., et al., *Appendectomy, smoking habits and the risk of developing ulcerative colitis: a case control study in private practice setting.* Gastroenterol Clin Biol, 2007. **31**(5): p. 493-7. 196.
- Chiadini, 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. 197.
- Van Kruiningen, H.J., *Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans.* Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(3): p. 183-91. 198.
- Afdhal, N.H., et al., *Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo.* Dig Dis Sci, 1991. **36**(4): p. 449-53. 199.
- Morgan, K.L., *Johne's and Crohn's. Chronic inflammatory bowel diseases of infectious*

- aetiology? *Lancet*, 1987. **1**(8540): p. 1017-9.
184. Burnham, W.R., et al., *Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease*. *Lancet*, 1978. **2**(8092 Pt 1): p. 693-6.
185. Liu, Y., et al., *Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1995. **108**(5): p. 1396-404.
186. 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.
187. 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.
188. Dragstedt, L.R., G.M. Dack, and J.B. Kirsner, *Chronic Ulcerative Colitis: a Summary of Evidence Implicating Bacterium Necrophorum as an Etiologic Agent*. *Ann Surg*, 1941. **114**(4): p. 653-62.
189. Matsuda, H., et al., *Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000. **15**(1): p. 61-8.
190. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. *Bmj*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
191. 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.
192. Ohkusa, T., et al., *Induction of experimental ulcerative colitis by Fusobacterium varium isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2003. **52**(1): p. 79-83.
193. Ekblom, A., et al., *Crohn's disease after in-utero measles virus exposure*. *Lancet*, 1996. **348**(9026): p. 515-7.
194. Iizuka, M., et al., *No evidence of persistent mumps virus infection in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2001. **48**(5): p. 637-41.
195. Pardi, D.S., et al., *Early measles virus infection is associated with the development of inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(6): p. 1480-5.
196. Luther, J., et al., *Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009.
197. Montgomery, S.M., R.E. Pounder, and A.J. Wakefield, *Infant mortality and the incidence of inflammatory bowel disease*. *Lancet*, 1997. **349**(9050): p. 472-3.
198. Montgomery, S.M., et al., *Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(4): p. 796-803.
199. Morita, N., et al., *Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991*. *J Gastroenterol*, 1995. **30 Suppl 8**: p. 1-4.
200. Yoon, C.M., et al., *Clinical features of Crohn's disease in Korea*. *Gastroenterol Jpn*, 1988. **23**(5): p. 576-81.
201. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 900-4.
202. Zlotogora, J., J. Zimmerman, and D. Rachmilewitz, *Crohn's disease in Ashkenazi Jews*. *Gastroenterology*, 1990. **99**(1): p. 286-7.
203. Joossens, M., et al., *Familial aggregation and antimicrobial response dose-dependently affect the risk for Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*. **16**(1): p. 58-67.
204. Park, J.B., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease in Korea*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(12): p. 1146-51.
205. Cipolla, C., et al., *Familial aggregation of inflammatory bowel disease in a Mediterranean area*. *Eur J Epidemiol*, 1996. **12**(2): p. 205-10.
206. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1994. **35**(5): p. 696-700.
207. Probert, C.S., et al., *Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire*. *Gut*, 1993. **34**(11): p. 1547-51.
208. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 1991. **324**(2): p. 84-8.
209. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. *Ann Intern Med*, 1963. **59**: p. 133-44.
210. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijón, Asturias]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2001. **24**(5): p. 228-35.
211. 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.
212. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. **88**: p. 14-6.
213. Spehlmann, M.E., et al., *Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German*

- twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(7): p. 968-76.
214. 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.
215. 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.
216. 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.
217. Orholm, M., et al., *Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study.* *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(10): p. 1075-81.
218. Greenberg, D.A. and J.I. Rotter, *Two locus models for gluten sensitive enteropathy: population genetic considerations.* *Am J Med Genet*, 1981. **8**(2): p. 205-14.
219. Rotter, J.I. and E.M. Landaw, *Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease.* *Clin Genet*, 1984. **26**(6): p. 529-42.
220. Lin, H.J., J.I. Rotter, and W.J. Conte, *Use of HLA marker associations and HLA haplotype linkage to estimate disease risks in families with gluten-sensitive enteropathy.* *Clin Genet*, 1985. **28**(3): p. 185-98.
221. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications.* *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003. **17**(1): p. 3-18.
222. Zhang, H., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis.* *Br Med Bull*, 2008. **87**: p. 17-30.
223. 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.
224. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.* *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
225. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.* *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
226. Lesage, S., et al., *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.* *Am J Hum Genet*, 2002. **70**(4): p. 845-57.
227. Hampe, J., et al., *Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations.* *Lancet*, 2001. **357**(9272): p. 1925-8.
228. Hampe, J., et al., *Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 321-6.
229. Leong, R.W., et al., *NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population.* *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **17**(12): p. 1465-70.
230. Yamazaki, K., et al., *Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease.* *J Hum Genet*, 2002. **47**(9): p. 469-72.
231. Guo, Q.S., et al., *NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality.* *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(7): p. 1069-71.
232. 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.
233. 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.
234. McKay, D.M., *Intestinal inflammation and the gut microflora.* *Can J Gastroenterol*, 1999. **13**(6): p. 509-16.
235. Kelsall, B., *Getting to the guts of NOD2.* *Nat Med*, 2005. **11**(4): p. 383-4.
236. Parkes, M., et al., *The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease.* *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(6): p. 1605-10.
237. Achkar, J.P., et al., *Phenotype-stratified genetic linkage study demonstrates that IBD2 is an extensive ulcerative colitis locus.* *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(3): p. 572-80.
238. Barmada, M.M., et al., *A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs.* *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(5): p. 513-20.
239. Hampe, J., et al., *The interferon-gamma gene as a positional and functional candidate gene for inflammatory bowel disease.* *Int J Colorectal Dis*, 1998. **13**(5-6): p. 260-3.
240. Cantor, M.J., P. Nickerson, and C.N. Bernstein, *The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease.* *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(5): p. 1134-42.
241. Stokkers, P.C., et al., *Analysis of a positional candidate gene for inflammatory bowel disease: NRAMP2.* *Inflamm Bowel Dis*, 2000. **6**(2): p. 92-8.
242. Simmons, J.D., et al., *Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility.* *Gut*, 2000. **47**(2): p. 211-4.

243. Dresner-Pollak, R., et al., *The BsmI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in Jewish Ashkenazi patients*. Genet Test, 2004. **8**(4): p. 417-20.
244. de Jong, D.J. and J.P. Drenth, *Absence of an association of the IBD2 locus gene keratin 8 and inflammatory bowel disease in a large genetic association study*. Dig Liver Dis, 2004. **36**(6): p. 380-3.
245. Tumer, Z., et al., *Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AVIL gene, and its exclusion as a candidate for locus for inflammatory bowel disease at 12q13-14 (IBD2)*. Gene, 2002. **288**(1-2): p. 179-85.
246. Klein, W., et al., *The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease*. Dig Liver Dis, 2005. **37**(3): p. 159-61.
247. Zhu, J., et al., *Distribution of signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism in Chinese patients with ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(12): p. 1854-7.
248. de Jong, D.J., et al., *No evidence for involvement of IL-4R and CD11B from the IBD1 region and STAT6 in the IBD2 region in Crohn's disease*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(11): p. 884-7.
249. Xia, B., et al., *Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(3): p. 446-50.
250. Satsangi, J., et al., *Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1996. **347**(9010): p. 1212-7.
251. Stokkers, P.C., et al., *HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Gut, 1999. **45**(3): p. 395-401.
252. Fisher, S.A., et al., *Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 710-2.
253. Ferguson, L.R., et al., *Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(29): p. 4652-61.
254. Bouma, G., et al., *Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC)*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(2): p. 294-300.
255. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *Complotype SC30 is associated with susceptibility to develop ulcerative colitis in Mexicans*. J Clin Gastroenterol, 1998. **27**(2): p. 178-9.
256. Yamamoto-Furusho, J.K., et al., *Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis*. Immunol Lett, 2004. **95**(1): p. 31-5.
257. Bouma, G., et al., *Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD)*. Clin Exp Immunol, 1996. **103**(3): p. 391-6.
258. Louis, E., et al., *Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease*. Gut, 1996. **39**(5): p. 705-10.
259. Duerr, R.H., et al., *High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1857-62.
260. Vermeire, S., et al., *Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis*. Gut, 2004. **53**(7): p. 980-6.
261. Pierik, M., et al., *The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(1): p. 1-7.
262. Owyang, A.M., et al., *Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 843-9.
263. Buning, C., et al., *The interleukin-25 gene located in the inflammatory bowel disease (IBD) 4 region: no association with inflammatory bowel disease*. Eur J Immunogenet, 2003. **30**(5): p. 329-33.
264. Ma, Y., et al., *A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 271-8.
265. Silverberg, M.S., *OCTNs: will the real IBD5 gene please stand up?* World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3678-81.
266. Rioux, J.D., et al., *Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1863-70.
267. Armuzzi, A., et al., *Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31*. Gut, 2003. **52**(8): p. 1133-9.
268. Vermeire, S., et al., *Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD*. Gastroenterology, 2005. **129**(6): p. 1845-53.
269. Tomer, G., et al., *Polymorphisms in the IBD5 locus are associated with Crohn disease in pediatric Ashkenazi Jewish patients*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48**(5): p. 531-7.
270. Brescianini, S., et al., *IBD5 is associated with an extensive complicated Crohn's*

- disease feature: implications from genotype-phenotype analysis. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 149-50.
271. Waller, S., et al., Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut*, 2006. **55**(6): p. 809-14.
272. Peltekova, V.D., et al., Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*, 2004. **36**(5): p. 471-5.
273. Giallourakis, C., et al., IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(1): p. 205-11.
274. Torok, H.P., et al., Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut*, 2005. **54**(10): p. 1421-7.
275. Noble, C.L., et al., The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2005. **129**(6): p. 1854-64.
276. Russell, R.K., et al., Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut*, 2006. **55**(8): p. 1114-23.
277. Torkvist, L., et al., Contribution of the IBD5 locus to Crohn's disease in the Swedish population. *Scand J Gastroenterol*, 2007. **42**(2): p. 200-6.
278. Stoll, M., et al., Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 2004. **36**(5): p. 476-80.
279. Bodor, M., E.J. Kelly, and R.J. Ho, Characterization of the human MDR1 gene. *Aaps J*, 2005. **7**(1): p. E1-5.
280. Brant, S.R., et al., MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(6): p. 1282-92.
281. Glas, J., et al., MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2004. **126**(1): p. 367.
282. Ho, G.T., et al., Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2005. **128**(2): p. 288-96.
283. McAlindon, M.E. and Y.R. Mahida, Pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996. **10 Suppl 2**: p. 72-4.
284. Mahida, Y.R., et al., High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*, 1991. **32**(12): p. 1531-4.
285. Waterman, M., et al., [The significance of IL-13 gene +2044G/A mutation in patients with inflammatory bowel disease]. *Harefuah*, 2006. **145**(11): p. 789-92, 864.
286. Mahler, M., et al., Genetic analysis of susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Genomics*, 1999. **55**(2): p. 147-56.
287. Williams, C.N., et al., Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. **8**(6): p. 375-81.
288. van Heel, D.A., et al., Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(7): p. 763-70.
289. Low, J.H., et al., Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(3): p. 173-81.
290. Tello-Ruiz, M.K., et al., Haplotype-based association analysis of 56 functional candidate genes in the IBD6 locus on chromosome 19. *Eur J Hum Genet*, 2006. **14**(6): p. 780-90.
291. Marek, A., et al., TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit*, 2002. **8**(7): p. RA145-51.
292. Lee, Y.J., et al., TGF-beta suppresses IFN-gamma induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol*, 1997. **158**(5): p. 2065-75.
293. McKaig, B.C., et al., Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(1): p. C172-82.
294. Brant, S.R. and Y.Y. Shugart, Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(3): p. 300-11.
295. Satsangi, J., et al., Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*, 1996. **14**(2): p. 199-202.
296. Rector, A., et al., Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Hum Genet*, 2001. **108**(3): p. 190-3.
297. Tremelling, M., et al., IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1657-64.
298. Duerr, R.H., et al., A genome-wide association study identifies IL23R as an

- inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
299. Newman, W.G., et al., *Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in a Canadian population*. J Clin Gastroenterol, 2009. **43**(5): p. 444-7.
300. Lakatos, P.L., et al., *ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients*. Dig Liver Dis, 2008. **40**(11): p. 867-73.
301. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
302. Rioux, J.D., et al., *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 596-604.
303. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
304. Weersma, R.K., et al., *Confirmation of multiple Crohn's disease susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(3): p. 630-8.
305. Weersma, R.K., et al., *Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort*. Gut, 2009. **58**(3): p. 388-95.
306. Latiano, A., et al., *Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(29): p. 4643-51.
307. Fowler, E.V., et al., *ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(10): p. 2519-26.
308. Marquez, A., et al., *Role of ATG16L1 Thr300Ala polymorphism in inflammatory bowel disease: a Study in the Spanish population and a meta-analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(11): p. 1697-704.
309. Glas, J., et al., *The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(3): p. 682-91.
310. Parkes, M., et al., *Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 830-2.
311. Roberts, R.L., et al., *Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort*. Genes Immun, 2008. **9**(6): p. 561-5.
312. Massey, D.C. and M. Parkes, *Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease*. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 649-51.
313. Latiano, A., et al., *Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(1): p. 110-6.
314. Ouburg, S., et al., *The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the Saccharomyces cerevisiae mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway*. Gut, 2005. **54**(3): p. 439-40.
315. Torok, H.P., et al., *Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis*. Clin Immunol, 2004. **112**(1): p. 85-91.
316. Pierik, M., et al., *Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(1): p. 1-8.
317. Gewirtz, A.T., et al., *Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(6): p. G1157-63.
318. McGovern, D.P., et al., *Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(10): p. 1245-50.
319. Klein, W., et al., *A polymorphism in the IL11 gene is associated with ulcerative colitis*. Genes Immun, 2002. **3**(8): p. 494-6.
320. Takagawa, T., et al., *Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Japanese population*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(12): p. 1038-43.
321. Fiocchi, C., *Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand?* Dig Dis, 2009. **27**(3): p. 226-35.
322. Cargill, M., et al., *A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(2): p. 273-90.
323. Einarsdottir, E., et al., *IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 8.
324. Rahman, P., et al., *Association of interleukin-23 receptor variants with*

- ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(4): p. 1020-5.
325. Sun, S., et al., *TLR7/9 antagonists as therapeutics for immune-mediated inflammatory disorders*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2007. **6**(4): p. 223-35.
326. Burton, P.R., et al., *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. *Nat Genet*, 2007. **39**(11): p. 1329-37.
327. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
328. Engel, G.L., *Psychological factors in ulcerative colitis in man and gibbon*. *Gastroenterology*, 1969. **57**(3): p. 362-5.
329. Alexander, T., *An Objective Study of Psychological Factors in Ulcerative Colitis in Children*. *J Lancet*, 1965. **85**: p. 22-4.
330. Robertson, D.A., et al., *Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1989. **30**(5): p. 623-6.
331. Helzer, J.E., et al., *A controlled study of the association between ulcerative colitis and psychiatric diagnoses*. *Dig Dis Sci*, 1982. **27**(6): p. 513-8.
332. Helzer, J.E., et al., *A study of the association between Crohn's disease and psychiatric illness*. *Gastroenterology*, 1984. **86**(2): p. 324-30.
333. North, C.S., et al., *The relation of ulcerative colitis to psychiatric factors: a review of findings and methods*. *Am J Psychiatry*, 1990. **147**(8): p. 974-81.
334. Wood, J.D., et al., *Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*)*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(2): p. 385-93.
335. Gue, M., et al., *Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(1 Pt 1): p. G84-91.
336. Collins, S.M., *The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(6): p. 1683-99.
337. Qiu, B.S., et al., *The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1178-82.
338. Milde, A.M., O. Enger, and R. Murison, *The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats*. *Physiol Behav*, 2004. **81**(1): p. 71-84.
339. Bitton, A., et al., *Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(10): p. 2203-8.
340. Mardini, H.E., K.E. Kip, and J.W. Wilson, *Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity*. *Dig Dis Sci*, 2004. **49**(3): p. 492-7.
341. Garrett, V.D., et al., *The relation between daily stress and Crohn's disease*. *J Behav Med*, 1991. **14**(1): p. 87-96.
342. Greene, B.R., E.B. Blanchard, and C.K. Wan, *Long-term monitoring of psychosocial stress and symptomatology in inflammatory bowel disease*. *Behav Res Ther*, 1994. **32**(2): p. 217-26.
343. Kiliaan, A.J., et al., *Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5 Pt 1): p. G1037-44.
344. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
345. Soderholm, J.D., et al., *Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(6): p. G1257-63.
346. 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.
347. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. *Gut*, 1989. **30**(4): p. 455-9.
348. 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.
349. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1988. **94**(4): p. 994-8.
350. Saunders, P.R., et al., *Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G794-9.
351. Velin, A.K., et al., *Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats*. *Gut*, 2004. **53**(4): p. 494-500.
352. Saunders, P.R., N.P. Hanssen, and M.H. Perdue, *Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G486-90.
353. Santos, J., et al., *Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **278**(6): p. G847-54.
354. Bale, T.L. and W.W. Vale, *CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. **44**: p. 525-57.

355. Leu, S.J. and V.K. Singh, *Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor*. *Cell Immunol*, 1992. **143**(1): p. 220-7.
356. Singh, V.K., *Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression*. *J Neuroimmunol*, 1989. **23**(3): p. 257-62.
357. Leu, S.J. and V.K. Singh, *Modulation of natural killer cell-mediated lysis by corticotropin-releasing neurohormone*. *J Neuroimmunol*, 1991. **33**(3): p. 253-60.
358. Cantarella, G., et al., *Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(4): p. 837-44.
359. Wlk, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(2): p. 505-15.
360. van Tol, E.A., et al., *Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats*. *Gut*, 1996. **39**(3): p. 385-92.
361. Kawahito, Y., et al., *Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 1995. **37**(4): p. 544-51.
362. Muramatsu, Y., et al., *Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in the human colonic mucosa*. *Peptides*, 2000. **21**(12): p. 1799-809.
363. 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.
364. 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.
365. Milne, H.A. and C.L. McWilliam, *Considering nursing resource as "caring time"*. *J Adv Nurs*, 1996. **23**(4): p. 810-9.
366. Truelove, S.C., *Ulcerative colitis provoked by milk*. *Br Med J*, 1961. **1**(5220): p. 154-60.
367. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. *Am J Dig Dis*, 1966. **11**(11): p. 858-64.
368. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Crohn's disease and ulcerative colitis. A review of dietary studies with emphasis on methodologic aspects*. *Scand J Gastroenterol*, 1987. **22**(4): p. 385-9.
369. Guthy, E., *[Crohn's disease and nutritional lipids. Hypothesis on etiology of regional enteritis]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 1982. **107**(2): p. 71-3.
- James, A.H., *Breakfast and Crohn's disease*. *Br Med J*, 1977. **1**(6066): p. 943-5.
- Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. *Epidemiology*, 1992. **3**(1): p. 47-52.
- 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.
- Dietary and other risk factors of ulcerative colitis. A case-control study in Japan*. *Epidemiology Group of the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease in Japan*. *J Clin Gastroenterol*, 1994. **19**(2): p. 166-71.
- A case-control study of ulcerative colitis in relation to dietary and other factors in Japan*. *The Epidemiology Group of the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease in Japan*. *J Gastroenterol*, 1995. **30 Suppl 8**: p. 9-12.
- O'Morain, C., et al., *Risk factors in inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1989. **170**: p. 58-60; discussion 66-8.
- Probert, C.S., et al., *Diet of South Asians with inflammatory bowel disease*. *Arq Gastroenterol*, 1996. **33**(3): p. 132-5.
- Reif, S., et al., *Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1997. **40**(6): p. 754-60.
- Russel, M.G. and R.W. Stockbrugger, *Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update*. *Scand J Gastroenterol*, 1996. **31**(5): p. 417-27.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kim, Y.I., *Can fish oil maintain Crohn's disease in remission?* *Nutr Rev*, 1996. **54**(8): p. 248-52.
- Salomon, P., A.A. Kornbluth, and H.D. Janowitz, *Treatment of ulcerative colitis with fish oil n-3-omega-fatty acid: an open trial*. *J Clin Gastroenterol*, 1990. **12**(2): p. 157-61.

384. Stenson, W.F., et al., *Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis*. *Ann Intern Med*, 1992. **116**(8): p. 609-14.
385. Lorenz-Meyer, H., et al., *Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group)*. *Scand J Gastroenterol*, 1996. **31**(8): p. 778-85.
386. Kromann, N. and A. Green, *Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974*. *Acta Med Scand*, 1980. **208**(5): p. 401-6.
387. Bang, H.O., J. Dyerberg, and H.M. Sinclair, *The composition of the Eskimo food in north western Greenland*. *Am J Clin Nutr*, 1980. **33**(12): p. 2657-61.
388. Grimble, R.F. and P.S. Tappia, *Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids*. *Z Ernahrungswiss*, 1998. **37 Suppl 1**: p. 57-65.
389. 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.
390. Belluzzi, A., et al., *Polyunsaturated fatty acid pattern and fish oil treatment in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1993. **34**(9): p. 1289-90.
391. Macdonald, A., *Omega-3 fatty acids as adjunctive therapy in Crohn's disease*. *Gastroenterol Nurs*, 2006. **29**(4): p. 295-301; quiz 302-3.
392. Hawthorne, A.B., et al., *Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial*. *Gut*, 1992. **33**(7): p. 922-8.
393. Meister, D. and S. Ghosh, *Effect of fish oil enriched enteral diet on inflammatory bowel disease tissues in organ culture: differential effects on ulcerative colitis and Crohn's disease*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(47): p. 7466-72.
394. Barbosa, D.S., et al., *Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids*. *Nutrition*, 2003. **19**(10): p. 837-42.
395. Nieto, N., et al., *Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis*. *J Nutr*, 2002. **132**(1): p. 11-9.
396. Almallah, Y.Z., et al., *Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ*. *J Clin Immunol*, 2000. **20**(1): p. 68-76.
397. Chapman, M.A., et al., *Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis*. *Gut*, 1994. **35**(1): p. 73-6.
- Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. *Nutr Rev*, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
- 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.
- Whorwell, P.J., et al., *Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease*. *Br Med J*, 1979. **1**(6160): p. 382.
- Corrao, G., et al., *Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC)*. *Int J Epidemiol*, 1998. **27**(3): p. 397-404.
- 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.
- Koletzko, S., et al., *Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood*. *Bmj*, 1989. **298**(6688): p. 1617-8.
- Beaudry, M., R. Dufour, and S. Marcoux, *Relation between infant feeding and infections during the first six months of life*. *J Pediatr*, 1995. **126**(2): p. 191-7.
- Duffy, L.C., et al., *The effects of infant feeding on rotavirus-induced gastroenteritis: a prospective study*. *Am J Public Health*, 1986. **76**(3): p. 259-63.
- Howie, P.W., et al., *Protective effect of breast feeding against infection*. *Bmj*, 1990. **300**(6716): p. 11-6.
- Pittard, W.B., 3rd, *Breast milk immunology. A frontier in infant nutrition*. *Am J Dis Child*, 1979. **133**(1): p. 83-7.
- Pittard, W.B., 3rd and K. Bill, *Immunoregulation by breast milk cells*. *Cell Immunol*, 1979. **42**(2): p. 437-41.
- Bernt, K.M. and W.A. Walker, *Human milk as a carrier of biochemical messages*. *Acta Paediatr Suppl*, 1999. **88**(430): p. 27-41.
- Carver, J.D. and L.A. Barness, *Trophic factors for the gastrointestinal tract*. *Clin Perinatol*, 1996. **23**(2): p. 265-85.
- Harris, J.E. and A.M. Lammerding, *Crohn's disease and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: current issues*. *J Food Prot*, 2001. **64**(12): p. 2103-10.
- 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.
- Knoflach, P., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in ulcerative colitis and*

- Crohn's disease. *Gastroenterology*, 1987. **92**(2): p. 479-85.
414. Martini, G.A. and J.W. Brandes, *Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease*. *Klin Wochenschr*, 1976. **54**(8): p. 367-71.
415. Miller, B., et al., *[Sugar consumption in patients with Crohn's disease]*. *Verh Dtsch Ges Inn Med*, 1976. **82 Pt 1**: p. 922-4.
416. Mayberry, J.F., J. Rhodes, and R.G. Newcombe, *Increased sugar consumption in Crohn's disease*. *Digestion*, 1980. **20**(5): p. 323-6.
417. Geerling, B.J., R.W. Stockbrugger, and R.J. Brummer, *Nutrition and inflammatory bowel disease: an update*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1999. **230**: p. 95-105.
418. Thornton, J.R., P.M. Emmett, and K.W. Heaton, *Smoking, sugar, and inflammatory bowel disease*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985. **290**(6484): p. 1786-7.
419. Husain, A. and J.R. Korzenik, *Nutritional issues and therapy in inflammatory bowel disease*. *Semin Gastrointest Dis*, 1998. **9**(1): p. 21-30.
420. Ritchie, J.K., et al., *Controlled multicentre therapeutic trial of an unrefined carbohydrate, fibre rich diet in Crohn's disease*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987. **295**(6597): p. 517-20.
421. Young, E., et al., *A population study of food intolerance*. *Lancet*, 1994. **343**(8906): p. 1127-30.
422. Bischoff, S.C., A. Herrmann, and M.P. Manns, *Prevalence of adverse reactions to food in patients with gastrointestinal disease*. *Allergy*, 1996. **51**(11): p. 811-8.
423. Gjaffer, M.H., P. Cann, and C.D. Holdsworth, *Long-term effects of elemental and exclusion diets for Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1991. **5**(2): p. 115-25.
424. Pearson, M., et al., *Food intolerance and Crohn's disease*. *Gut*, 1993. **34**(6): p. 783-7.
425. Mokbel, M., et al., *[Effect of smoking on the long-term course of ulcerative colitis]*. *Gastroenterol Clin Biol*, 1998. **22**(11): p. 858-62.
426. Boyko, E.J., et al., *Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1988. **23**(9): p. 1147-52.
427. Samuelsson, S.M., et al., *Risk factors for extensive ulcerative colitis and ulcerative proctitis: a population based case-control study*. *Gut*, 1991. **32**(12): p. 1526-30.
428. Loftus, E.V., Jr., et al., *Primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking: a case-control study*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(5): p. 1496-502.
429. Aldhous, M.C., et al., *Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis*. *Am J Gastroenterol*, 2007. **102**(3): p. 589-97.
430. Merrett, M.N., et al., *Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis*. *Gut*, 1996. **38**(3): p. 362-4.
431. Louis, E., et al., *Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype*. *Gut*, 2003. **52**(4): p. 552-7.
432. Mahid, S.S., et al., *The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables*. *Dig Dis Sci*, 2007. **52**(11): p. 2897-903.
433. Cosnes, J., et al., *Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. **13**(11): p. 1403-11.
434. Breuer-Katschinski, B.D., N. Hollander, and H. Goebell, *Effect of cigarette smoking on the course of Crohn's disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996. **8**(3): p. 225-8.
435. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. *J Pharm Pharmacol*, 1990. **42**(4): p. 288-9.
436. 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.
437. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. *Nature*, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
438. King, T.E., Jr., D. Savici, and P.A. Campbell, *Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers*. *J Infect Dis*, 1988. **158**(6): p. 1309-16.
439. Geng, Y., et al., *Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy*. *J Immunol*, 1996. **156**(7): p. 2384-90.
440. 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.
441. Hatoum, O.A., et al., *Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(1): p. 58-69.
442. Wakefield, A.J., et al., *Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 1991. **36**(8): p. 1147-50.
443. Pullan, R.D., et al., *Transdermal nicotine for active ulcerative colitis*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(12): p. 811-5.
444. Aldhous, M.C., et al., *Does nicotine influence cytokine profile and subsequent cell cycling/apoptotic responses in inflammatory*

- bowel disease? *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(11): p. 1469-82.
445. Ingram, J.R., et al., *Nicotine enemas for active Crohn's colitis: an open pilot study*. *Gastroenterol Res Pract*, 2008. **2008**: p. 237185.
446. Selby, W.S., et al., *Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(11): p. 2834-8.
447. Uzan, A., et al., *[Protective effect of appendectomy on the development of ulcerative colitis. A case-control study]*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2001. **25**(3): p. 239-42.
448. Frisch, M., et al., *Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases*. *Surgery*, 2001. **130**(1): p. 36-43.
449. Naganuma, M., et al., *Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(4): p. 1123-6.
450. Garcia Rodriguez, L.A., et al., *Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(4): p. 309-15.
451. Rhodes, J.M., et al., *Colonic Crohn's disease and use of oral contraception*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. **288**(6417): p. 595-6.
452. Lesko, S.M., et al., *Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users*. *Gastroenterology*, 1985. **89**(5): p. 1046-9.
453. Boyko, E.J., et al., *Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use*. *Am J Epidemiol*, 1994. **140**(3): p. 268-78.
454. Godet, P.G., G.R. May, and L.R. Sutherland, *Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1995. **37**(5): p. 668-73.
455. Cosnes, J., et al., *Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study*. *Gut*, 1999. **45**(2): p. 218-22.
456. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(1): p. 182-205.
457. Shanahan, F., *Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **278**(2): p. G191-6.
458. Marteau, P., P. Seksik, and F. Shanahan, *Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003. **17**(1): p. 47-61.
459. Cong, Y., et al., *CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease*. *J Exp Med*, 1998. **187**(6): p. 855-64.
- Shanahan, F., *Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and eotherapeutics*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(3): p. 622-35.
461. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 44-54.
462. Seksik, P., et al., *Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon*. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 237-42.
463. Huang, G.T., et al., *Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(2): p. 572-83.
464. Jung, H.C., et al., *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(1): p. 55-65.
465. Merger, M. and K. Croitoru, *Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease*. *Semin Immunol*, 1998. **10**(1): p. 69-78.
466. Sartor, R.B., *Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Gastroenterol Clin North Am*, 1995. **24**(3): p. 475-507.
467. 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.
468. Jyonouchi, H., et al., *Aberrant responses to TLR agonists in pediatric IBD patients; the possible association with increased production of Th1/Th17 cytokines in response to candida, a luminal antigen*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009.
- Baumgart, D.C., et al., *Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **157**(3): p. 423-36.
- 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.
- Vijay-Kumar, M., et al., *Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(12): p. 3909-21.
- De Jager, P.L., et al., *The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases*. *Genes Immun*, 2007. **8**(5): p. 387-97.
- Szebeni, B., et al., *Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the*

- colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 2008. **151**(1): p. 34-41.
474. Cunliffe, R.N., et al., *Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2001. **48**(2): p. 176-85.
475. Ouellette, A.J. and M.E. Selsted, *Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense*. *Faseb J*, 1996. **10**(11): p. 1280-9.
476. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. *J Immunol*, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
477. Yamaguchi, N., et al., *Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(4): p. 192-7.
478. Ferguson, L.R., et al., *Single nucleotide polymorphisms in human Paneth cell defensin A5 may confer susceptibility to inflammatory bowel disease in a New Zealand Caucasian population*. *Dig Liver Dis*, 2008. **40**(9): p. 723-30.
479. Salzman, N.H., M.A. Underwood, and C.L. Bevins, *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(2): p. 70-83.
480. Cunliffe, R.N., et al., *Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(4): p. 298-304.
481. Stange, E.F., et al., *[Chronic inflammatory bowel diseases (IBD): novel pathophysiological concepts and their clinical relevance]*. *Praxis (Bern 1994)*, 2005. **94**(37): p. 1429-32.
482. Wehkamp, J., et al., *Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **14**(7): p. 745-52.
483. Ramasundara, M., et al., *Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(2): p. 202-8.
484. Prantera, C., et al., *An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin*. *Am J Gastroenterol*, 1996. **91**(2): p. 328-32.
485. Turunen, U., Farkkila, and V. Valtonen, *Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(1): p. 282-3.
486. Colombel, J.F., et al., *A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease*. *Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID)*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(3): p. 674-8.
487. Turunen, U.M., et al., *Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(5): p. 1072-8.
488. Hurst, R.D., et al., *Prospective study of the incidence, timing and treatment of pouchitis in 104 consecutive patients after restorative proctocolectomy*. *Arch Surg*, 1996. **131**(5): p. 497-500; discussion 501-2.
489. Lahat, G., et al., *Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 557-65.
490. Picciotto, A., et al., *Antimycobacterial chemotherapy in inflammatory bowel disease*. *Biomed Pharmacother*, 1989. **43**(2): p. 141-3.
491. Warren, J.B., H.C. Rees, and T.M. Cox, *Remission of Crohn's disease with tuberculosis chemotherapy*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(3): p. 182.
492. Schultz, M.G., et al., *Remission of Crohn's disease with antimycobacterial chemotherapy*. *Lancet*, 1987. **2**(8572): p. 1391-2.
493. Shaffer, J.L., et al., *Controlled trial of rifampicin and ethambutol in Crohn's disease*. *Gut*, 1984. **25**(2): p. 203-5.
494. Swift, G.L., et al., *Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's disease*. *Gut*, 1994. **35**(3): p. 363-8.
495. Thomas, G.A., et al., *Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study*. *Gut*, 1998. **42**(4): p. 497-500.
496. Hulten, K., et al., *Antibacterial therapy for Crohn's disease: a review emphasizing therapy directed against mycobacteria*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(3): p. 445-56.
497. Graham, M.F., et al., *Corticosteroids increase procollagen gene expression, synthesis, and secretion by human intestinal smooth muscle cells*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(5): p. 1454-61.
498. Prantera, C., et al., *Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen*. *Am J Gastroenterol*, 1994. **89**(4): p. 513-8.
499. Borgaonkar, M.R., D.G. MacIntosh, and J.M. Fardy, *A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(3): p. 725-9.
500. Gui, G.P., et al., *Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics*. *J*

- Antimicrob Chemother, 1997. **39**(3): p. 393-400.
501. Savidge, R.S., *Trimethoprim and sulphamethoxazole in ulcerative colitis*. Postgrad Med J, 1969. **45**: p. Suppl:101-4.
502. Ambrose, N.S., et al., *Antibiotic therapy for treatment in relapse of intestinal Crohn's disease. A prospective randomized study*. Dis Colon Rectum, 1985. **28**(2): p. 81-5.
503. Gionchetti, P., et al., *Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double-blind, placebo-controlled trial*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(6): p. 1220-1.
504. Muniyappa, P., et al., *Use and safety of rifaximin in children with inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **49**(4): p. 400-4.
505. Gionchetti, P., et al., *Antimicrobials in the management of inflammatory bowel disease*. Digestion, 2006. **73 Suppl 1**: p. 77-85.
506. Gionchetti, P., et al., *Management of inflammatory bowel disease: does rifaximin offer any promise?* Chemotherapy, 2005. **51 Suppl 1**: p. 96-102.
507. Bernstein, L.H., et al., *Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole*. Gastroenterology, 1980. **79**(3): p. 599.
508. Jakobovits, J. and M.M. Schuster, *Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae*. Am J Gastroenterol, 1984. **79**(7): p. 533-40.
509. McKee, R.F. and R.A. Keenan, *Perianal Crohn's disease--is it all bad news?* Dis Colon Rectum, 1996. **39**(2): p. 136-42.
510. Brandt, L.J., et al., *Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study*. Gastroenterology, 1982. **83**(2): p. 383-7.
511. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 1989. **66**(5): p. 365-78.
512. Marteau, P.R., et al., *Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 430S-436S.
513. Fabia, R., et al., *The effect of exogenous administration of Lactobacillus reuteri R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat*. Scand J Gastroenterol, 1993. **28**(2): p. 155-62.
514. Mao, Y., et al., *The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats*. Gastroenterology, 1996. **111**(2): p. 334-44.
515. Matsumoto, S., et al., *A component of polysaccharide peptidoglycan complex on Lactobacillus induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e170-80.
516. Lin, P.W., et al., *Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(8): p. 1205-11.
517. Lee, J.H., et al., *Lactobacillus suntoryeus inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF-kappaB activation in experimental colitis*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(2): p. 231-7.
518. Lee, H.S., et al., *Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(4): p. 574-80.
519. Feighery, L.M., et al., *Effects of Lactobacillus salivarius 433118 on intestinal inflammation, immunity status and in vitro colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci, 2008. **53**(9): p. 2495-506.
520. Carroll, I.M., et al., *Anti-inflammatory properties of Lactobacillus gasseri expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(4): p. G729-38.
521. Geier, M.S., et al., *Lactobacillus fermentum BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats*. Int J Food Microbiol, 2007. **114**(3): p. 267-74.
522. Kim, N., et al., *Oral feeding of Bifidobacterium bifidum (BGN4) prevents CD4(+) CD45RB(high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation*. Clin Immunol, 2007. **123**(1): p. 30-9.
523. Rembacken, B.J., et al., *Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial*. Lancet, 1999. **354**(9179): p. 635-9.
524. Schreiber, S., et al., *Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1339-46.
525. McCann, M.L., R.S. Abrams, and R.P. Nelson, Jr., *Recolonization therapy with nonadhesive Escherichia coli for treatment of inflammatory bowel disease*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **730**: p. 243-5.
526. Kruis, W., et al., *Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1997. **11**(5): p. 853-8.
527. Henker, J., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(9): p. 874-5.
528. Imaoka, A., et al., *Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: enhancement*

- of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(16): p. 2511-6.
529. Miele, E., et al., *Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis*. *Am J Gastroenterol*, 2009. **104**(2): p. 437-43.
530. Huynh, H.Q., et al., *Probiotic preparation VSL#3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: a pilot study*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(5): p. 760-8.
531. Bibiloni, R., et al., *VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(7): p. 1539-46.
532. Plein, K. and J. Hotz, *Therapeutic effects of Saccharomyces boulardii on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study*. *Z Gastroenterol*, 1993. **31**(2): p. 129-34.
533. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(7): p. 1462-4.
534. Garcia Vilela, E., et al., *Influence of Saccharomyces boulardii on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission*. *Scand J Gastroenterol*, 2008. **43**(7): p. 842-8.
535. Malchow, H.A., *Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?* *J Clin Gastroenterol*, 1997. **25**(4): p. 653-8.
536. Boudeau, J., et al., *Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **18**(1): p. 45-56.
537. Llopis, M., et al., *Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 275-83.
538. Schultz, M., et al., *IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 1): p. G1461-72.
539. Dianda, L., et al., *T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(1): p. 91-7.
540. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 514-21.
541. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 495-549.
542. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
543. Neurath, M.F., et al., *Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(7): p. 1743-50.
544. Camoglio, L., et al., *Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 1998. **4**(4): p. 285-90.
545. Kallel, L., et al., *[Colonic expression of gamma-interferon and interleukin-10 in Crohn's disease and ulcerative colitis]*. *Presse Med*, 2005. **34**(1): p. 8-12.
546. Fais, S., et al., *Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells*. *J Interferon Res*, 1994. **14**(5): p. 235-8.
547. Fais, S., et al., *Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers*. *Gut*, 1991. **32**(4): p. 403-7.
548. Monteleone, G., et al., *Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(4): p. 1169-78.
549. Parronchi, P., et al., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(3): p. 823-32.
550. Berrebi, D., et al., *Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(3): p. 667-72.
551. Parrello, T., et al., *Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 7234-9.
552. Fuss, I.J., et al., *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5*. *J Immunol*, 1996. **157**(3): p. 1261-70.
553. Kadivar, K., et al., *Intestinal interleukin-13 in pediatric inflammatory bowel disease patients*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(5): p. 593-8.
554. Vainer, B., et al., *Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease*. *Cytokine*, 2000. **12**(10): p. 1531-6.

555. 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.
556. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.* Immunity, 2008. **28**(4): p. 454-67.
557. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD.* Gut, 2007. **56**(10): p. 1333-6.
558. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease.* Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
559. Elson, C.O., et al., *Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice.* Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2359-70.
560. Izcue, A. and F. Powrie, *Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier.* Immunology, 2008. **123**(1): p. 6-10.
561. Simpson, S.J., et al., *Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis.* Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2618-25.
562. Nancey, S., et al., *CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice.* Gastroenterology, 2006. **131**(2): p. 485-96.
563. Brimnes, J., et al., *Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease.* J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5814-22.
564. Bisping, G., et al., *Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells.* Clin Exp Immunol, 2001. **123**(1): p. 15-22.
565. Fort, M.M., M.W. Leach, and D.M. Rennick, *A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis.* J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3256-61.
566. Saubermann, L.J., et al., *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice.* Gastroenterology, 2000. **119**(1): p. 119-28.
567. Ikeda, Y., et al., *Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. **13**(7): p. 841-50.
568. Krajina, T., et al., *Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis.* Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 1073-83.
569. Verstege, M.I., et al., *Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease.* J Histochem Cytochem, 2008. **56**(3): p. 233-41.
570. Leon, F., et al., *Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Adv Exp Med Biol, 2006. **579**: p. 117-32.
571. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases.* Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 50-65.
572. Mizoguchi, E., et al., *Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease.* Int Immunol, 2000. **12**(5): p. 597-605.
573. Mishima, Y., et al., *Alterations of peripheral blood CD5+ B cells in inflammatory bowel disease.* Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(2): p. 172-9.
574. Duchmann, R., et al., *Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD).* Clin Exp Immunol, 1995. **102**(3): p. 448-55.
575. Mow, W.S., et al., *Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease.* Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 414-24.
576. Katz, J.A., J. Itoh, and C. Fiocchi, *Pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Curr Opin Gastroenterol, 1999. **15**(4): p. 291-7.
577. Mitsuyama, K., et al., *Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6.* Gut, 1995. **36**(1): p. 45-9.
578. Mitsuyama, K., et al., *IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease.* Clin Exp Immunol, 1994. **96**(3): p. 432-6.
579. Shigematsu, S., *Therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease.* Kurume Med J, 1998. **45**(2): p. 175-9.
580. Shirachi, A., *Therapeutic implications of interleukin-10 in inflammatory bowel disease.* Kurume Med J, 1998. **45**(1): p. 63-7.
581. Tateishi, H., et al., *Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability.* Digestion, 1997. **58**(3): p. 271-81.
582. Harada, K., et al., *Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in rat experimental colitis.* Digestion, 1994. **55**(3): p. 179-84.
583. Tomoyose, M., et al., *Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis.* Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(4): p. 435-40.
584. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells.* Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.

585. 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.
586. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgamma and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
587. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(6): p. 641-9.
588. Kirsner, J.B., *Inflammatory bowel disease. Considerations of etiology and pathogenesis*. *Am J Gastroenterol*, 1978. **69**(3 Pt 1): p. 253-71.
589. 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.
590. Grisham, M.B., *Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease*. *Lancet*, 1994. **344**(8926): p. 859-61.
591. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
592. Grisham, M.B., D. Jourdain, and D.A. Wink, *Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(2 Pt 1): p. G315-21.
593. Goke, M. and D.K. Podolsky, *Regulation of the mucosal epithelial barrier*. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1996. **10**(3): p. 393-405.
594. Wilson, A.J. and P.R. Gibson, *Epithelial migration in the colon: filling in the gaps*. *Clin Sci (Lond)*, 1997. **93**(2): p. 97-108.
595. Olaison, G., R. Sjobahl, and C. Tagesson, *Abnormal intestinal permeability in Crohn's disease. A possible pathogenic factor*. *Scand J Gastroenterol*, 1990. **25**(4): p. 321-8.
596. Sartor, R.B., *Postoperative recurrence of Crohn's disease: the enemy is within the fecal stream*. *Gastroenterology*, 1998. **114**(2): p. 398-400.
597. Mayer, L., et al., *Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1991. **100**(1): p. 3-12.
598. Kern, F., Jr., et al., *The motility of the distal colon in nonspecific ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1951. **19**(3): p. 492-503.
599. Collins, S.M., *Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(3): p. G315-8.
600. Tomita, R. and K. Tanjoh, *Role of nitric oxide in the colon of patients with ulcerative colitis*. *World J Surg*, 1998. **22**(1): p. 88-91; discussion 92.
601. McCafferty, D.M., J.L. Wallace, and K.A. Sharkey, *Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(2 Pt 1): p. G272-80.
602. 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.
603. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
604. Kotler, D.P., *Cachexia*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(8): p. 622-34.
605. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. *J Infect Dis*, 1999. **179** Suppl 2: p. S294-304.
606. 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.
607. 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.
608. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. *Q J Med*, 1972. **41**(164): p. 419-36.
609. 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.
610. 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.
611. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 649-63.
612. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. *Dig Dis Sci*, 1989. **34**(9): p. 1457-61.
613. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. *South Med J*, 1981. **74**(3): p. 359-61.
614. 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.
615. 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.
616. Loftus, E.V., Jr., et al., Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
617. Connell, W.R., et al., Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
618. Caspi, O., et al., The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not? *Leuk Lymphoma*, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
619. 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.
620. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
621. Rutter, M., et al., Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2004. **126**(2): p. 451-9.
622. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol*, 2005. **26**(6): p. 318-25.
623. Eberhart, C.E., et al., Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994. **107**(4): p. 1183-8.
624. Sinicrope, F.A. and S. Gill, Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(1-2): p. 63-75.
625. Szlosarek, P.W. and F.R. Balkwill, Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(9): p. 565-73.
626. Burstein, E. and E.R. Fearon, Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 464-7.
627. Lenardo, M.J. and D. Baltimore, NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, 1989. **58**(2): p. 227-9.
628. Baeuerle, P.A., The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1072**(1): p. 63-80.
629. Neurath, M.F., et al., Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 998-1004.
630. Conner, E.M., et al., Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **282**(3): p. 1615-22.
631. Herfarth, H., et al., Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol*, 2000. **120**(1): p. 59-65.
632. Jobin, C., et al., Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut*, 1998. **42**(6): p. 779-87.
633. Rogler, G., et al., Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 1998. **115**(2): p. 357-69.
634. Wang, L., et al., IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. *J Immunol*, 2003. **171**(6): p. 3194-201.
635. Nenci, A., et al., Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
636. Zaph, C., et al., Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*, 2007. **446**(7135): p. 552-6.
637. Lewis, A.J. and A.M. Manning, New targets for anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Chem Biol*, 1999. **3**(4): p. 489-94.
638. Bianchi, M., et al., Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanylhydrazone. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 927-36.
639. Tracey, K.J., Suppression of TNF and other proinflammatory cytokines by the tetravalent guanylhydrazone CNI-1493. *Prog Clin Biol Res*, 1998. **397**: p. 335-43.
640. Mitsuyama, K., et al., Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med*, 2006. **17**(3): p. 449-55.
641. Waetzig, G.H., et al., p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 2002. **168**(10): p. 5342-51.
642. Assi, K., et al., The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology*, 2006. **118**(1): p. 112-21.
643. 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.

644. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 39-49.
645. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
646. Tontonoz, P., et al., *mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer*. *Genes Dev*, 1994. **8**(10): p. 1224-34.
647. Su, C.G., et al., *A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(4): p. 383-9.
648. Liang, H.L. and Q. Ouyang, *A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(1): p. 114-9.
649. Neurath, M.F., et al., *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. *J Exp Med*, 1995. **182**(5): p. 1281-90.
650. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
651. Hollenbach, E., et al., *Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(15): p. 14981-8.
652. Fichtner-Feigl, S., et al., *Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(11): p. 3057-71.
653. Elson, C.O., et al., *Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance*. *J Immunol*, 1996. **157**(5): p. 2174-85.
654. Neurath, M.F., et al., *Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance*. *J Exp Med*, 1996. **183**(6): p. 2605-16.
655. 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.
656. Tanaka, T., et al., *A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate*. *Cancer Sci*, 2003. **94**(11): p. 965-73.
657. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. *Gastroenterology*, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
658. Rath, H.C., et al., *Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice*. *Infect Immun*, 2001. **69**(4): p. 2277-85.
659. Dieleman, L.A., et al., *Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines*. *Clin Exp Immunol*, 1998. **114**(3): p. 385-91.
660. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. *Lab Invest*, 1993. **69**(2): p. 238-49.
661. Cooper, H.S., et al., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(4): p. 757-68.
662. Gisbert, J.P., et al., *Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review*. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(3): p. 471-88.
663. Sutherland, L., et al., *Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(4): p. CD000544.
664. Azad Khan, A.K., J. Piris, and S.C. Truelove, *An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. *Lancet*, 1977. **2**(8044): p. 892-5.
665. van Hees, P.A., J.H. Bakker, and J.H. van Tongeren, *Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine*. *Gut*, 1980. **21**(7): p. 632-5.
666. Nikolaus, S., U. Folschn, and S. Schreiber, *Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease*. *Hepatogastroenterology*, 2000. **47**(31): p. 71-82.
667. Greenfield, S.M., et al., *Review article: the mode of action of the aminosaliculates in inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1993. **7**(4): p. 369-83.
668. Wahl, C., et al., *Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(5): p. 1163-74.
669. Weber, C.K., et al., *Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(5): p. 1209-18.
670. Martínez-Augustin, O., et al., *Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with modulation of NF-kB but not PPAR-g*

- signaling. Pharmacogenetics and genomics, 2009. **19**: p. 363-372.
671. Egan, L.J., et al., *Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity.* J Biol Chem, 1999. **274**(37): p. 26448-53.
672. Tromm, A., T. Griga, and B. May, *Oral mesalazine for the treatment of Crohn's disease: clinical efficacy with respect to pharmacokinetic properties.* Hepatogastroenterology, 1999. **46**(30): p. 3124-35.
673. Small, R.E. and C.C. Schraa, *Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical applications of mesalamine for the treatment of inflammatory bowel disease.* Pharmacotherapy, 1994. **14**(4): p. 385-98.
674. Reinacher-Schick, A., et al., *Mesalazine changes apoptosis and proliferation in normal mucosa of patients with sporadic polyps of the large bowel.* Endoscopy, 2000. **32**(3): p. 245-54.
675. Bus, P.J., et al., *Mesalazine-induced apoptosis of colorectal cancer: on the verge of a new chemopreventive era?* Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(11): p. 1397-402.
676. Liptay, S., et al., *Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine.* Br J Pharmacol, 1999. **128**(7): p. 1361-9.
677. Shanahan, F., et al., *Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor.* Immunopharmacology, 1990. **20**(3): p. 217-24.
678. Crotty, B., et al., *Inhibition of binding of interferon-gamma to its receptor by salicylates used in inflammatory bowel disease.* Gut, 1992. **33**(10): p. 1353-7.
679. Lauritsen, K., et al., *Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis.* Gastroenterology, 1986. **91**(4): p. 837-44.
680. Dallegri, F., et al., *Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis.* Gut, 1990. **31**(2): p. 184-6.
681. Sandoval, M., et al., *Peroxytrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine.* Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1480-8.
682. Burrell, G.C., et al., *Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells.* Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1474-9.
683. MacDermott, R.P., *Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(12): p. 3343-5.
684. Forbes, A., et al., *Review article: Oral, modified-release mesalazine formulations--proprietary versus generic.* Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(10): p. 1207-14.
685. Christensen, L.A., et al., *Release of 5-aminosalicylic acid from Pentasa during normal and accelerated intestinal transit time.* Br J Clin Pharmacol, 1987. **23**(3): p. 365-9.
686. Yu, D.K., et al., *Effect of food coadministration on 5-aminosalicylic acid oral suspension bioavailability.* Clin Pharmacol Ther, 1990. **48**(1): p. 26-33.
687. Allgayer, H., et al., *Colonic N-acetylation of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 1989. **97**(1): p. 38-41.
688. Ireland, A., J.D. Priddle, and D.P. Jewell, *Acetylation of 5-aminosalicylic acid by isolated human colonic epithelial cells.* Clin Sci (Lond), 1990. **78**(1): p. 105-11.
689. Schroeder, K.W., W.J. Tremaine, and D.M. Ilstrup, *Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study.* N Engl J Med, 1987. **317**(26): p. 1625-9.
690. Sninsky, C.A., et al., *Oral mesalamine (Asacol) for mildly to moderately active ulcerative colitis. A multicenter study.* Ann Intern Med, 1991. **115**(5): p. 350-5.
691. O'Morain, C., et al., *Reversible male infertility due to sulphasalazine: studies in man and rat.* Gut, 1984. **25**(10): p. 1078-84.
692. Franklin, J.L. and H.H. Rosenberg, *Impaired folic acid absorption in inflammatory bowel disease: effects of salicylazosulfapyridine (Azulfidine).* Gastroenterology, 1973. **64**(4): p. 517-25.
693. Novis, B.H., et al., *Nephrotic syndrome after treatment with 5-aminosalicylic acid.* Br Med J (Clin Res Ed), 1988. **296**(6634): p. 1442.
694. Barbour, V.M. and P.F. Williams, *Nephrotic syndrome associated with sulphasalazine.* Bmj, 1990. **301**(6755): p. 818.
695. Smoak, K.A. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation.* Mech Ageing Dev, 2004. **125**(10-11): p. 697-706.
696. Webster, J.I., L. Tonelli, and E.M. Sternberg, *Neuroendocrine regulation of immunity.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 125-63.
697. Singleton, J.W., et al., *National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs.* Gastroenterology, 1979. **77**(4 Pt 2): p. 870-82.
698. Bjarnason, I., et al., *Reduced bone density in patients with inflammatory bowel disease.* Gut, 1997. **40**(2): p. 228-33.
699. Abitbol, V., et al., *Metabolic bone assessment in patients with inflammatory*

- bowel disease. *Gastroenterology*, 1995. **108**(2): p. 417-22.
700. Truelove, S.C. and L.J. Witts, *Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial*. *Br Med J*, 1955. **2**(4947): p. 1041-8.
701. Rutgeerts, P., et al., *A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(13): p. 842-5.
702. Lennard, L., *The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992. **43**(4): p. 329-39.
703. Lennard, L., et al., *Azathioprine metabolism in kidney transplant recipients*. *Br J Clin Pharmacol*, 1984. **18**(5): p. 693-700.
704. Weinshilboum, R.M. and S.L. Sladek, *Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity*. *Am J Hum Genet*, 1980. **32**(5): p. 651-62.
705. Jolivet, J., et al., *Synthesis, retention, and biological activity of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells*. *J Clin Invest*, 1982. **70**(2): p. 351-60.
706. Allegra, C.J., et al., *Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(15): p. 4881-5.
707. Baggott, J.E., W.H. Vaughn, and B.B. Hudson, *Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide*. *Biochem J*, 1986. **236**(1): p. 193-200.
708. Egan, L.J., et al., *Systemic and intestinal pharmacokinetics of methotrexate in patients with inflammatory bowel disease*. *Clin Pharmacol Ther*, 1999. **65**(1): p. 29-39.
709. Jolivet, J. and B.A. Chabner, *Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₄ and 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₅ to dihydrofolate reductase*. *J Clin Invest*, 1983. **72**(3): p. 773-8.
710. Morgan, S.L., et al., *Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial*. *Ann Intern Med*, 1994. **121**(11): p. 833-41.
711. Gorlick, R., et al., *Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(14): p. 1041-8.
712. Flanagan, W.M., et al., *Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A*. *Nature*, 1991. **352**(6338): p. 803-7.
713. Cominelli, F., et al., *Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(1): p. 65-71.
714. Schreiber, S., et al., *Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease*. *Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1461-72.
715. Fedorak, R.N., et al., *Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease*. *The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1473-82.
716. Podolsky, D.K., et al., *Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti-alpha 4 integrin monoclonal antibody*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(1): p. 372-80.
717. Knight, D.M., et al., *Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody*. *Mol Immunol*, 1993. **30**(16): p. 1443-53.
718. Mohler, K.M., et al., *Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists*. *J Immunol*, 1993. **151**(3): p. 1548-61.
719. Siegel, S.A., et al., *The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo*. *Cytokine*, 1995. **7**(1): p. 15-25.
720. Scallon, B.J., et al., *Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions*. *Cytokine*, 1995. **7**(3): p. 251-9.
721. Suitters, A.J., et al., *Differential effect of isotype on efficacy of anti-tumor necrosis factor alpha chimeric antibodies in experimental septic shock*. *J Exp Med*, 1994. **179**(3): p. 849-56.
722. Reimund, J.M., et al., *In vitro effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1997. **40**(4): p. 475-80.
723. Levi, M., et al., *Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 114-20.
724. Bauditz, J., et al., *Treatment with tumour necrosis factor inhibitor oxpentifylline does not improve corticosteroid dependent*

- chronic active Crohn's disease. *Gut*, 1997. **40**(4): p. 470-4.
725. Bielekova, B., et al., *Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 1117-24.
726. Zou, L.P., et al., *Rolipram suppresses experimental autoimmune neuritis and prevents relapses in Lewis rats*. *Neuropharmacology*, 2000. **39**(2): p. 324-33.
727. Hartmann, G., et al., *Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **292**(1): p. 22-30.
728. Vasilias, E.A., et al., *An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(6): p. 1278-87.
729. Ehrenpreis, E.D., et al., *Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(6): p. 1271-7.
730. Haslett, P.A., et al., *Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. **15**(13): p. 1169-79.
731. Juffermans, N.P., et al., *Thalidomide suppresses Up-regulation of human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4+ T cells in humans*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(5): p. 1813-6.
732. Sykes, A.P., et al., *The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. **13**(11): p. 1535-42.
733. Richards, C.D., et al., *Adenovirus vectors for cytokine gene expression*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **762**: p. 282-92; discussion 292-3.
734. Wilson, J.M., *Adenoviruses as gene-delivery vehicles*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(18): p. 1185-7.
735. Chao, H., et al., *Persistent expression of canine factor IX in hemophilia B canines*. *Gene Ther*, 1999. **6**(10): p. 1695-704.
736. During, M.J., et al., *Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adenovirus-associated virus vector*. *Nat Med*, 1998. **4**(10): p. 1131-5.
737. Abe, A., et al., *In vitro cell-free conversion of noninfectious Moloney retrovirus particles to an infectious form by the addition of the vesicular stomatitis virus surrogate envelope G protein*. *J Virol*, 1998. **72**(8): p. 6356-61.
738. Palomba, S., et al., *Effectiveness of risedronate in osteoporotic postmenopausal women with inflammatory bowel disease: a prospective, parallel, open-label, two-year extension study*. *Menopause*, 2008. **15**(4 Pt 1): p. 730-6.
739. Abitbol, V., et al., *A double-blind placebo-controlled study of intravenous clodronate for prevention of steroid-induced bone loss in inflammatory bowel disease*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(10): p. 1184-9.
740. Stokkers, P.C., et al., *Intravenous pamidronate in combination with calcium and vitamin D: highly effective in the treatment of low bone mineral density in inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2006. **41**(2): p. 200-4.
741. Henderson, S., N. Hoffman, and R. Prince, *A double-blind placebo-controlled study of the effects of the bisphosphonate risedronate on bone mass in patients with inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(1): p. 119-23.
742. Palomba, S., et al., *Efficacy of risedronate administration in osteoporotic postmenopausal women affected by inflammatory bowel disease*. *Osteoporos Int*, 2005. **16**(9): p. 1141-9.
743. Lobell, R.B., *Prenylation of Ras GTPase superfamily proteins and their function in immunobiology*. *Adv Immunol*, 1998. **68**: p. 145-89.
744. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(1): p. 153-208.
745. Magee, T. and C. Marshall, *New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane*. *Cell*, 1999. **98**(1): p. 9-12.
746. Sebti, S.M., *Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 297-300.
747. Harris, C.M. and C.D. Poulter, *Recent studies of the mechanism of protein prenylation*. *Nat Prod Rep*, 2000. **17**(2): p. 137-44.
748. Zhang, F.L. and P.J. Casey, *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences*. *Annu Rev Biochem*, 1996. **65**: p. 241-69.
749. Kawata, M., et al., *Posttranslationally processed structure of the human platelet protein smg p21B: evidence for geranylgeranylation and carboxyl methylation of the C-terminal cysteine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(22): p. 8960-4.
750. Stephenson, R.C. and S. Clarke, *Identification of a C-terminal protein carboxyl methyltransferase in rat liver membranes utilizing a synthetic farnesyl cysteine-containing peptide substrate*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(27): p. 16248-54.
751. Babu, P., R.J. Deschenes, and L.C. Robinson, *Akr1p-dependent palmitoylation of Yck2p yeast casein kinase 1 is necessary and*

- sufficient for plasma membrane targeting. *J Biol Chem*, 2004. **279**(26): p. 27138-47.
752. Chenette, E.J., A. Abo, and C.J. Der, *Critical and distinct roles of amino- and carboxyl-terminal sequences in regulation of the biological activity of the Chp atypical Rho GTPase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 13784-92.
753. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth*. *J Lipid Res*, 1980. **21**(5): p. 505-17.
754. Allal, C., et al., *RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31001-8.
755. Lebowitz, P.F., W. Du, and G.C. Prendergast, *Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(26): p. 16093-5.
756. Fiordalisi, J.J., et al., *A distinct class of dominant negative Ras mutants: cytosolic GTP-bound Ras effector domain mutants that inhibit Ras signaling and transformation and enhance cell adhesion*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 10813-23.
757. Miyake, M., et al., *Unfarnesylated transforming Ras mutant inhibits the Ras-signaling pathway by forming a stable Ras.Raf complex in the cytosol*. *FEBS Lett*, 1996. **378**(1): p. 15-8.
758. Roos, W., et al., *Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids . Phytoalexin biosynthesis in cultured cells of eschscholtzia californica*. *Plant Physiol*, 1998. **118**(2): p. 349-64.
759. Mekkiengkrai, D., et al., *Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom *Lactarius chrysorrheus**. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004. **68**(11): p. 2360-8.
760. Cornforth, J.W., et al., *Studies on the biosynthesis of cholesterol. XX. Steric course of decarboxylation of 5-pyrophosphomevalonate and of the carbon to carbon bond formation in the biosynthesis of farnesyl pyrophosphate*. *J Biol Chem*, 1966. **241**(17): p. 3970-87.
761. Laskovics, F.M. and C.D. Poulter, *Prenyltransferase; determination of the binding mechanism and individual kinetic constants for farnesylpyrophosphate synthetase by rapid quench and isotope partitioning experiments*. *Biochemistry*, 1981. **20**(7): p. 1893-901.
762. Poulter, C.D. and H.C. Rilling, *Prenyltransferase: the mechanism of the reaction*. *Biochemistry*, 1976. **15**(5): p. 1079-83.
763. Grunler, J., J. Ericsson, and G. Dallner, *Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1212**(3): p. 259-77.
764. Runquist, M., et al., *Isoprenoid biosynthesis in rat liver mitochondria. Studies on farnesyl pyrophosphate synthase and trans-prenyltransferase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(8): p. 5804-9.
765. Cunillera, N., et al., *Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(13): p. 7774-80.
766. Olivier, L.M. and S.K. Krisans, *Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1529**(1-3): p. 89-102.
767. Sanmiya, K., et al., *Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts*. *Plant Cell Physiol*, 1999. **40**(3): p. 348-54.
768. Eberhardt, N.L. and H.C. Rilling, *Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(3): p. 863-6.
769. Reed, B.C. and H.C. Rilling, *Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver*. *Biochemistry*, 1975. **14**(1): p. 50-4.
770. Yeh, L.S. and H.C. Rilling, *Purification and properties of pig liver prenyltransferase: interconvertible forms of the enzyme*. *Arch Biochem Biophys*, 1977. **183**(2): p. 718-25.
771. Barnard, G.F. and G. Popjak, *Human liver prenyltransferase and its characterization*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **661**(1): p. 87-99.
772. Nakane, H., et al., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Bacillus stearothermophilus* farnesyl diphosphate synthase expressed in *Escherichia coli**. *J Mol Biol*, 1993. **233**(4): p. 787-8.
773. Tarshis, L.C., et al., *Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution*. *Biochemistry*, 1994. **33**(36): p. 10871-7.
774. Koyama, T., Y. Gotoh, and T. Nishino, *Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants*. *Biochemistry*, 2000. **39**(2): p. 463-9.
775. Tarshis, L.C., et al., *Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate*

- synthases. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15018-23.
776. Ohnuma, S., et al., *A role of the amino acid residue located on the fifth position before the first aspartate-rich motif of farnesyl diphosphate synthase on determination of the final product.* J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30748-54.
777. Ohnuma, S., et al., *Conversion of product specificity of archaeobacterial geranylgeranyl-diphosphate synthase. Identification of essential amino acid residues for chain length determination of prenyltransferase reaction.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18831-7.
778. Ohnuma, S., et al., *Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis.* J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10087-95.
779. Ohnuma, S., M. Watanabe, and T. Nishino, *Identification and characterization of geranylgeraniol kinase and geranylgeranyl phosphate kinase from the Archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius.* J Biochem, 1996. **119**(3): p. 541-7.
780. Ericsson, J., et al., *Human geranylgeranyl diphosphate synthase: isolation of the cDNA, chromosomal mapping and tissue expression.* J Lipid Res, 1998. **39**(9): p. 1731-9.
781. Kuzuguchi, T., et al., *Human geranylgeranyl diphosphate synthase. cDNA cloning and expression.* J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5888-94.
782. Reiss, Y., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme.* J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6403-8.
783. Zhang, F.L., J.F. Moomaw, and P.J. Casey, *Properties and kinetic mechanism of recombinant mammalian protein geranylgeranyltransferase type I.* J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23465-70.
784. Moomaw, J.F. and P.J. Casey, *Mammalian protein geranylgeranyltransferase. Subunit composition and metal requirements.* J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17438-43.
785. Casey, P.J. and M.C. Seabra, *Protein prenyltransferases.* J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5289-92.
786. Huang, C.C., P.J. Casey, and C.A. Fierke, *Evidence for a catalytic role of zinc in protein farnesyltransferase. Spectroscopy of Co²⁺-farnesyltransferase indicates metal coordination of the substrate thiolate.* J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 20-3.
787. Long, S.B., et al., *The crystal structure of human protein farnesyltransferase reveals the basis for inhibition by CaaX tetrapeptides and their mimetics.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 12948-53.
788. Goodsell, D.S., *The molecular perspective: protein farnesyltransferase.* Stem Cells, 2004. **22**(1): p. 119-20.
789. Moores, S.L., et al., *Sequence dependence of protein isoprenylation.* J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14603-10.
790. Spence, R.A., et al., *Conversion of Tyr361 beta to Leu in mammalian protein farnesyltransferase impairs product release but not substrate recognition.* Biochemistry, 2000. **39**(45): p. 13651-9.
791. Zhang, H., M.C. Seabra, and J. Deisenhofer, *Crystal structure of Rab geranylgeranyltransferase at 2.0 Å resolution.* Structure, 2000. **8**(3): p. 241-51.
792. Anant, J.S., et al., *Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex.* Biochemistry, 1998. **37**(36): p. 12559-68.
793. Farnsworth, C.C., et al., *Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11963-7.
794. Desnoyers, L. and M.C. Seabra, *Single prenyl-binding site on protein prenyl transferases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12266-70.
795. Thoma, N.H., et al., *Allosteric regulation of substrate binding and product release in geranylgeranyltransferase type II.* Biochemistry, 2001. **40**(1): p. 268-74.
796. Shen, F. and M.C. Seabra, *Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein.* J Biol Chem, 1996. **271**(7): p. 3692-8.
797. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals.* Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 615-49.
798. Mochizuki, N., et al., *Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i).* Nature, 1999. **400**(6747): p. 891-4.
799. Jordan, B.A. and L.A. Devi, *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.* Nature, 1999. **399**(6737): p. 697-700.
800. Bottorff, D., J. Ebinu, and J.C. Stone, *RasGRP, a Ras activator: mouse and human cDNA sequences and chromosomal positions.* Mamm Genome, 1999. **10**(4): p. 358-61.
801. Kawasaki, H., et al., *A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13278-83.

802. Campbell, S.L., et al., *Increasing complexity of Ras signaling*. *Oncogene*, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
803. Macara, I.G., et al., *The Ras superfamily of GTPases*. *Faseb J*, 1996. **10**(5): p. 625-30.
804. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks*. *Genes Dev*, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
805. Tapon, N. and A. Hall, *Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(1): p. 86-92.
806. Aspenstrom, P., *The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton*. *Exp Cell Res*, 1999. **246**(1): p. 20-5.
807. Valencia, A., et al., *The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids*. *Biochemistry*, 1991. **30**(19): p. 4637-48.
808. Wittinghofer, A. and E.F. Pai, *The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch*. *Trends Biochem Sci*, 1991. **16**(10): p. 382-7.
809. Boguski, M.S. and F. McCormick, *Proteins regulating Ras and its relatives*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 643-54.
810. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
811. Mijimolle, N., et al., *Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 313-24.
812. Gibbs, J.B., A. Oliff, and N.E. Kohl, *Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic*. *Cell*, 1994. **77**(2): p. 175-8.
813. Sebti, S.M. and C.J. Der, *Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(12): p. 945-51.
814. Doll, R.J., P. Kirschmeier, and W.R. Bishop, *Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: critical crossroads*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004. **7**(4): p. 478-86.
815. Alakangas, A., et al., *Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts*. *Calcif Tissue Int*, 2002. **70**(1): p. 40-7.
816. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. *Lancet*, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
817. *Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)*. *Circulation*, 1998. **97**(15): p. 1440-5.
818. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. *Nature*, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
819. Laufs, U., et al., *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors*. *Circulation*, 1998. **97**(12): p. 1129-35.
820. Takemoto, M., et al., *Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **106**(1): p. 57-62.
821. Laufs, U., et al., *Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(1): p. 15-24.
822. Laufs, U., et al., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1)*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21926-31.
823. Singh, R., et al., *The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(11): p. 1561-70.
824. Mundy, G., et al., *Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins*. *Science*, 1999. **286**(5446): p. 1946-9.
825. Guijarro, C., et al., *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture*. *Circ Res*, 1998. **83**(5): p. 490-500.
826. Bustos, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**(7): p. 2057-64.
827. Fukumoto, Y., et al., *Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*. *Circulation*, 2001. **103**(7): p. 993-9.
828. Weber, C., W. Erl, and P.C. Weber, *Lovastatin induces differentiation of Mono Mac 6 cells*. *Cell Biochem Funct*, 1995. **13**(4): p. 273-7.
829. Weber, C., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **30**(5): p. 1212-7.
830. Bellosta, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(11): p. 1671-8.
831. Yoshida, M., et al., *Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(7): p. 1165-71.
832. Kanagarajan, N., et al., *Disease modifying effect of statins in dextran sulfate sodium model of mouse colitis*. *Inflamm Res*, 2008. **57**(1): p. 34-8.
833. Cho, S.J., et al., *Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in*

- tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. *Int J Cancer*, 2008. **123**(4): p. 951-7.
834. Kagami, S., et al., *Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2009. **21**(6): p. 679-89.
835. Yasui, Y., et al., *A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(10): p. 2331-9.
836. Suzuki, S., et al., *Preventive effect of fluvastatin on ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(6B): p. 4223-8.
837. Reiss, Y., et al., *Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAx tetrapeptides*. *Cell*, 1990. **62**(1): p. 81-8.
838. Brown, M.S., et al., *Tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase: amino-terminal substitution in phenylalanine-containing tetrapeptides restores farnesylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 8313-6.
839. Goldstein, J.L., et al., *Nonfarnesylated tetrapeptide inhibitors of protein farnesyltransferase*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(24): p. 15575-8.
840. Qian, Y., et al., *Design and structural requirements of potent peptidomimetic inhibitors of p21ras farnesyltransferase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(17): p. 12410-3.
841. Vogt, A., et al., *A non-peptide mimetic of Ras-CAAX: selective inhibition of farnesyltransferase and Ras processing*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(2): p. 660-4.
842. Nigam, M., et al., *Potent inhibition of human tumor p21ras farnesyltransferase by A1A2-lacking p21ras CA1A2X peptidomimetics*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(28): p. 20695-8.
843. Hara, M., et al., *Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(6): p. 2281-5.
844. Scholten, J.D., et al., *Synergy between anions and farnesyl diphosphate competitive inhibitors of farnesyl:protein transferase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(29): p. 18077-81.
845. Gibbs, J.B., et al., *Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks ras processing in vivo*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(11): p. 7617-20.
846. Bishop, W.R., et al., *Novel tricyclic inhibitors of farnesyl protein transferase. Biochemical characterization and inhibition of Ras modification in transfected Cos cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(51): p. 30611-8.
847. Njoroge, F.G., et al., *(+)-4-[2-[4-(8-Chloro-3,10-dibromo-6,11-dihydro-5H-benzo[5,6]cyclohepta[1,2-b]pyridin-11(R)-yl]-1-piperidinyl]-2-oxo-ethyl]-1-piperidinecarboxamide (SCH-66336): a very potent farnesyl protein transferase inhibitor as a novel antitumor agent*. *J Med Chem*, 1998. **41**(24): p. 4890-902.
848. End, D.W., et al., *Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 131-7.
849. Hunt, J.T., et al., *Discovery of (R)-7-cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepine (BMS-214662), a farnesyltransferase inhibitor with potent preclinical antitumor activity*. *J Med Chem*, 2000. **43**(20): p. 3587-95.
850. Buser, C.A., et al., *High-performance liquid chromatography/mass spectrometry characterization of Ki4B-Ras in PSN-1 cells treated with the prenyltransferase inhibitor L-778,123*. *Anal Biochem*, 2001. **290**(1): p. 126-37.
851. Brunner, T.B., et al., *Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5656-68.
852. Crul, M., et al., *Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey*. *Anticancer Drugs*, 2001. **12**(3): p. 163-84.
853. Kohl, N.E., et al., *Development of inhibitors of protein farnesylation as potential chemotherapeutic agents*. *J Cell Biochem Suppl*, 1995. **22**: p. 145-50.
854. Cox, A.D. and C.J. Der, *Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras?* *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1333**(1): p. F51-71.
855. Liu, M., et al., *Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice*. *Cancer Res*, 1998. **58**(21): p. 4947-56.
856. Ashar, H.R., et al., *The farnesyl transferase inhibitor SCH 66336 induces a G(2) --> M or G(1) pause in sensitive human tumor cell lines*. *Exp Cell Res*, 2001. **262**(1): p. 17-27.
857. Suzuki, N., K. Del Villar, and F. Tamanoi, *Farnesyltransferase inhibitors induce dramatic morphological changes of KNRK cells that are blocked by microtubule interfering agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10499-504.
858. Moasser, M.M., et al., *Farnesyl transferase inhibitors cause enhanced mitotic sensitivity to taxol and epothilones*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1369-74.
859. Adjei, A.A., et al., *Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(5): p. 1438-45.
860. Delmas, C., et al., *Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance*

- of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer*, 2002. **100**(1): p. 43-8.
861. Jabbour, E., H. Kantarjian, and J. Cortes, *Clinical activity of farnesyl transferase inhibitors in hematologic malignancies: possible mechanisms of action*. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(11): p. 2187-95.
862. Johnston, S.R., et al., *Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(13): p. 2492-9.
863. McGuire, T.F., et al., *Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(44): p. 27402-7.
864. Sun, J., et al., *Antitumor efficacy of a novel class of non-thiol-containing peptidomimetic inhibitors of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: combination therapy with the cytotoxic agents cisplatin, Taxol, and gemcitabine*. *Cancer Res*, 1999. **59**(19): p. 4919-26.
865. Vogt, A., et al., *Protein geranylgeranylation, not farnesylation, is required for the G1 to S phase transition in mouse fibroblasts*. *Oncogene*, 1996. **13**(9): p. 1991-9.
866. Vogt, A., et al., *The geranylgeranyltransferase-I inhibitor GGTI-298 arrests human tumor cells in G0/G1 and induces p21(WAF1/CIP1/SDI1) in a p53-independent manner*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(43): p. 27224-9.
867. Chiba, Y., S. Sato, and M. Misawa, *GGTI-2133, an inhibitor of geranylgeranyltransferase, inhibits infiltration of inflammatory cells into airways in mouse experimental asthma*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009. **22**(4): p. 929-35.
868. Waiczies, S., I. Bendix, and F. Zipp, *Geranylgeranylation but not GTP-loading of Rho GTPases determines T cell function*. *Sci Signal*, 2008. **1**(12): p. pt3.
869. Zhao, D. and C. Pothoulakis, *Rho GTPases as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases*. *Expert Opin Ther Targets*, 2003. **7**(5): p. 583-92.
870. Mandey, S.H., et al., *A role for geranylgeranylation in interleukin-1beta secretion*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(11): p. 3690-5.
871. Massonnet, B., et al., *Pharmacological inhibitors of the mevalonate pathway activate pro-IL-1 processing and IL-1 release by human monocytes*. *Eur Cytokine Netw*, 2009. **20**(3): p. 112-120.
872. Saha, B. and D. Nandi, *Farnesyltransferase inhibitors reduce Ras activation and ameliorate acetaminophen-induced liver injury in mice*. *Hepatology*, 2009. **50**(5): p. 1547-57.
873. DeGeorge, K.C., et al., *Inhibition of oncogene-induced inflammatory chemokines using a farnesyltransferase inhibitor*. *J Inflamm (Lond)*, 2008. **5**: p. 3.
874. Xue, X., et al., *Anti-inflammatory activity in vitro and in vivo of the protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **317**(1): p. 53-60.
875. Vervenne, W.L., et al., *Farnesyl protein transferase inhibition interferes with activation of MAP kinase family members in human peripheral blood monocytes*. *Mol Med*, 2002. **8**(12): p. 857-62.
876. Fleisch, H. and S. Bisaz, *Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor*. *Am J Physiol*, 1962. **203**: p. 671-5.
877. Fleisch, H., R.G. Russell, and F. Straumann, *Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis*. *Nature*, 1966. **212**(5065): p. 901-3.
878. Jung, A., S. Bisaz, and H. Fleisch, *The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals*. *Calcif Tissue Res*, 1973. **11**(4): p. 269-80.
879. Fleisch, H.A., et al., *The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo*. *Eur J Clin Invest*, 1970. **1**(1): p. 12-8.
880. Schenk, R., et al., *Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats*. *Calcif Tissue Res*, 1973. **11**(3): p. 196-214.
881. Fleisch, H., R.G. Russell, and M.D. Francis, *Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo*. *Science*, 1969. **165**(899): p. 1262-4.
882. Francis, M.D., R.G. Russell, and H. Fleisch, *Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo*. *Science*, 1969. **165**(899): p. 1264-6.
883. Fleisch, H., J. Maerki, and R.G. Russell, *Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1966. **122**(2): p. 317-20.
884. Trechsel, U., A. Stutzer, and H. Fleisch, *Hypercalcemia induced with an arotinoid in thyroparathyroidectomized rats. New model to study bone resorption in vivo*. *J Clin Invest*, 1987. **80**(6): p. 1679-86.
885. Stutzer, A., H. Fleisch, and U. Trechsel, *Short- and long-term effects of a single dose of bisphosphonates on retinoid-induced bone resorption in thyroparathyroidectomized*

- rats. *Calcif Tissue Int*, 1988. **43**(5): p. 294-9.
886. Schenk, R., et al., *Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat*. *Calcif Tissue Int*, 1986. **38**(6): p. 342-9.
887. Smith, R., R.G. Russell, and M. Bishop, *Diphosphonates and Page's disease of bone*. *Lancet*, 1971. **1**(7706): p. 945-7.
888. Bassett, C.A., et al., *Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans*. *Lancet*, 1969. **2**(7625): p. 845.
889. Liberman, U.A., et al., *Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(22): p. 1437-43.
890. Watts, N.B., et al., *Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis*. *N Engl J Med*, 1990. **323**(2): p. 73-9.
891. Reginster, J., et al., *Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group*. *Osteoporos Int*, 2000. **11**(1): p. 83-91.
892. Harris, S.T., et al., *Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group*. *Jama*, 1999. **282**(14): p. 1344-52.
893. Muhlbauer, R.C., et al., *BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption*. *J Bone Miner Res*, 1991. **6**(9): p. 1003-11.
894. Goa, K.L. and J.A. Balfour, *Risedronate*. *Drugs Aging*, 1998. **13**(1): p. 83-91; discussion 92.
895. Green, J.R., K. Muller, and K.A. Jaeggi, *Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound*. *J Bone Miner Res*, 1994. **9**(5): p. 745-51.
896. Van Beek, E., et al., *Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group*. *J Bone Miner Res*, 1996. **11**(10): p. 1492-7.
897. Nancollas, G.H., et al., *Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite*. *Bone*, 2006. **38**(5): p. 617-27.
898. Suda, T., et al., *Regulation of osteoclast function*. *J Bone Miner Res*, 1997. **12**(6): p. 869-79.
899. Breuil, V., et al., *Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(11): p. 1721-9.
900. Hughes, D.E., et al., *Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo*. *J Bone Miner Res*, 1995. **10**(10): p. 1478-87.
901. Selander, K.S., et al., *Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages*. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**(5): p. 1127-38.
902. Hughes, D.E., et al., *Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(6): p. 1930-5.
903. Boonekamp, P.M., et al., *Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix*. *Bone Miner*, 1986. **1**(1): p. 27-39.
904. Lowik, C.W., et al., *Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate*. *J Bone Miner Res*, 1988. **3**(2): p. 185-92.
905. Rogers, M.J., et al., *Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism*. *J Bone Miner Res*, 1996. **11**(10): p. 1482-91.
906. Coxon, F.P., et al., *Protein synthesis is required for caspase activation and induction of apoptosis by bisphosphonate drugs*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**(4): p. 631-8.
907. Shipman, C.M., et al., *Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity*. *Br J Haematol*, 1997. **98**(3): p. 665-72.
908. Shipman, C.M., et al., *The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway*. *Cancer Res*, 1998. **58**(23): p. 5294-7.
909. Nishikawa, M., et al., *Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures*. *Bone*, 1996. **18**(1): p. 9-14.
910. Yu, X., J. Scholler, and N.T. Foged, *Interaction between effects of parathyroid hormone and bisphosphonate on regulation of osteoclast activity by the osteoblast-like cell line UMR-106*. *Bone*, 1996. **19**(4): p. 339-45.
911. Sahni, M., et al., *Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2004-11.
912. Vitte, C., H. Fleisch, and H.L. Guenther, *Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption*. *Endocrinology*, 1996. **137**(6): p. 2324-33.
913. Sato, M., et al., *Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and*

- effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest*, 1991. **88**(6): p. 2095-105.
914. Thompson, K., et al., *Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis*. *Mol Pharmacol*, 2006. **69**(5): p. 1624-32.
915. Lehenkari, P.P., et al., *Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite*. *Mol Pharmacol*, 2002. **61**(5): p. 1255-62.
916. Benford, H.L., et al., *Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro*. *Bone*, 2001. **28**(5): p. 465-73.
917. Plotkin, L.I., et al., *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(10): p. 1363-74.
918. Plotkin, L.I., S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs*. *Bone*, 2006. **39**(3): p. 443-52.
919. Rogers, M.J., *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. *Curr Pharm Des*, 2003. **9**(32): p. 2643-58.
920. Baus, F. and R.G. Russell, *Ibandronate in osteoporosis: preclinical data and rationale for intermittent dosing*. *Osteoporos Int*, 2004. **15**(6): p. 423-33.
921. Papapoulos, S.E. and R.C. Schimmer, *Changes in bone remodelling and antifracture efficacy of intermittent bisphosphonate therapy: implications from clinical studies with ibandronate*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66**(7): p. 853-8.
922. Reitsma, P.H., et al., *Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) in rats*. *Calcif Tissue Int*, 1980. **32**(2): p. 145-57.
923. Lin, J.H., *Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties*. *Bone*, 1996. **18**(2): p. 75-85.
924. Price, P.A., et al., *Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(6): p. 3926-34.
925. Khan, S.A., et al., *Elimination and biochemical responses to intravenous alendronate in postmenopausal osteoporosis*. *J Bone Miner Res*, 1997. **12**(10): p. 1700-7.
926. Cremers, S., et al., *A pharmacokinetic and pharmacodynamic model for intravenous bisphosphonate (pamidronate) in osteoporosis*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2002. **57**(12): p. 883-90.
927. Fogelman, I., et al., *The use of whole-body retention of Tc-99m diphosphonate in the diagnosis of metabolic bone disease*. *J Nucl Med*, 1978. **19**(3): p. 270-5.
928. Daroszewska, A. and S.H. Ralston, *Genetics of Paget's disease of bone*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **109**(3): p. 257-63.
929. Mee, A.P., *Paramyxoviruses and Paget's disease: the affirmative view*. *Bone*, 1999. **24**(5 Suppl): p. 19S-21S.
930. Russell, R.G., et al., *Diphosphonates in Paget's disease*. *Lancet*, 1974. **1**(7863): p. 894-8.
931. Delmas, P.D. and P.J. Meunier, *The management of Paget's disease of bone*. *N Engl J Med*, 1997. **336**(8): p. 558-66.
932. Douglas, D.L., et al., *Effect of dichloromethylene diphosphonate in Paget's disease of bone and in hypercalcaemia due to primary hyperparathyroidism or malignant disease*. *Lancet*, 1980. **1**(8177): p. 1043-7.
933. Coukell, A.J. and A. Markham, *Pamidronate. A review of its use in the management of osteolytic bone metastases, tumour-induced hypercalcaemia and Paget's disease of bone*. *Drugs Aging*, 1998. **12**(2): p. 149-68.
934. Singer, F.R., et al., *Risedronate, a highly effective oral agent in the treatment of patients with severe Paget's disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(6): p. 1906-10.
935. Siris, E.S., et al., *Risedronate in the treatment of Paget's disease of bone: an open label, multicenter study*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(6): p. 1032-8.
936. Reid, I.R., et al., *Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(9): p. 898-908.
937. Martodam, R.R., et al., *The effects of dichloromethylene diphosphonate on hypercalcemia and other parameters of the humoral hypercalcemia of malignancy in the rat Leydig cell tumor*. *Calcif Tissue Int*, 1983. **35**(4-5): p. 512-9.
938. Mundy, G.R. and T. Yoneda, *Facilitation and suppression of bone metastasis*. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(312): p. 34-44.
939. Mundy, G.R. and T. Yoneda, *Bisphosphonates as anticancer drugs*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(6): p. 398-400.
940. Clezardin, P., F.H. Ebetino, and P.G. Fournier, *Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 4971-4.
941. Ross, J.R., et al., *A systematic review of the role of bisphosphonates in metastatic disease*. *Health Technol Assess*, 2004. **8**(4): p. 1-176.

942. Paterson, A.D., et al., *The use of dichloromethylene diphosphonate for the management of hypercalcaemia in multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 1983. **54**(1): p. 121-32.
943. Ralston, S.H., et al., *Comparison of three intravenous bisphosphonates in cancer-associated hypercalcaemia*. *Lancet*, 1989. **2**(8673): p. 1180-2.
944. Body, J.J., *Hypercalcemia of malignancy*. *Semin Nephrol*, 2004. **24**(1): p. 48-54.
945. Sirohi, B. and R. Powles, *Multiple myeloma*. *Lancet*, 2004. **363**(9412): p. 875-87.
946. Pavlakis, N., R. Schmidt, and M. Stockler, *Bisphosphonates for breast cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(3): p. CD003474.
947. Coleman, R.E., *Bisphosphonates in breast cancer*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(5): p. 687-95.
948. Parker, C.C., *The role of bisphosphonates in the treatment of prostate cancer*. *BJU Int*, 2005. **95**(7): p. 935-8.
949. Smith, M.R., *Zoledronic acid to prevent skeletal complications in cancer: corroborating the evidence*. *Cancer Treat Rev*, 2005. **31 Suppl 3**: p. 19-25.
950. Bell, R., *Efficacy of ibandronate in metastatic bone disease: review of clinical data*. *Oncologist*, 2005. **10 Suppl 1**: p. 8-13.
951. Body, J.J., et al., *Oral ibandronate reduces the risk of skeletal complications in breast cancer patients with metastatic bone disease: results from two randomised, placebo-controlled phase III studies*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(6): p. 1133-7.
952. McCloskey, E.V., et al., *A randomized trial of the effect of clodronate on skeletal morbidity in multiple myeloma*. *MRC Working Party on Leukaemia in Adults*. *Br J Haematol*, 1998. **100**(2): p. 317-25.
953. Berenson, J.R., et al., *Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma*. *Myeloma Aredia Study Group*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(8): p. 488-93.
954. Diel, I.J., et al., *Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(6): p. 357-63.
955. Storm, T., et al., *Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(18): p. 1265-71.
956. van Staa, T.P., L. Abenhaim, and C. Cooper, *Use of cyclical etidronate and prevention of non-vertebral fractures*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(1): p. 87-94.
957. Black, D.M., et al., *Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures*. *Fracture Intervention Trial Research Group*. *Lancet*, 1996. **348**(9041): p. 1535-41.
958. Bone, H.G., et al., *Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(12): p. 1189-99.
959. McClung, M.R., et al., *Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women*. *Hip Intervention Program Study Group*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(5): p. 333-40.
960. Boonen, S., et al., *Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies*. *Osteoporos Int*, 2005. **16**(10): p. 1291-8.
961. Chavassieux, P.M., et al., *Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(6): p. 1475-80.
962. Adachi, J.D., et al., *Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(6): p. 382-7.
963. Saag, K.G., et al., *Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis*. *Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(5): p. 292-9.
964. Glorieux, F.H., et al., *Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(14): p. 947-52.
965. Rauch, F. and F.H. Glorieux, *Osteogenesis imperfecta, current and future medical treatment*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2005. **139C**(1): p. 31-7.
966. Conte, P. and V. Guarneri, *Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens*. *Oncologist*, 2004. **9 Suppl 4**: p. 28-37.
967. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
968. Adami, S., et al., *The acute-phase response after bisphosphonate administration*. *Calcif Tissue Int*, 1987. **41**(6): p. 326-31.
969. Sassa, S., et al., *Ibandronate may prevent colorectal carcinogenesis in mice with ulcerative colitis*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(11): p. 4615-9.
970. Stucchi, A.F., et al., *NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000. **279**: p. G1298-G1306.
971. 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. 1344-1350.
972. 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.
973. Brazma, A., et al., Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 2001. **29**(4): p. 365-71.
974. Vilaseca, J., et al., Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut*, 1990. **31**(5): p. 539-44.
975. Lin, J.H., et al., Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos*, 1991. **19**(5): p. 926-32.
976. Daley-Yates, P.T. and R. Bennett, A comparison of the pharmacokinetics of ¹⁴C-labelled APD and ^{99m}Tc-labelled APD in the mouse. *Calcif Tissue Int*, 1988. **43**(2): p. 125-7.
977. Kawata, M., et al., A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, and characterization. *J Biol Chem*, 1988. **263**(35): p. 18965-71.
978. Bartram, S.A., et al., A randomized controlled trial of calcium with vitamin D, alone or in combination with intravenous pamidronate, for the treatment of low bone mineral density associated with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **18**(11-12): p. 1121-7.
979. von Tirpitz, C., et al., Therapy of osteoporosis in patients with Crohn's disease: a randomized study comparing sodium fluoride and ibandronate. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003. **17**(6): p. 807-16.
980. Lin, C.L., C. Moniz, and J.W. Chow, Treatment with fluoride or bisphosphonates prevents bone loss associated with colitis in the rat. *Calcif Tissue Int*, 2000. **67**(5): p. 373-7.
981. Haderslev, K.V., et al., Alendronate increases lumbar spine bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2000. **119**(3): p. 639-46.
982. Kitazaki, S., et al., Clinical trial: comparison of alendronate and alfacalcidol in glucocorticoid-associated osteoporosis in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009. **29**(4): p. 424-30.
983. Kriel, M.H., et al., Use of risedronate to prevent bone loss following a single course of glucocorticoids: findings from a proof-of-concept study in inflammatory bowel disease. *Osteoporos Int*. **21**(3): p. 507-13.
984. Grip, O. and S. Janciauskiene, Atorvastatin reduces plasma levels of chemokine (CXCL10) in patients with Crohn's disease. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5263.
985. Grip, O., S. Janciauskiene, and A. Bredberg, Use of atorvastatin as an anti-inflammatory treatment in Crohn's disease. *Br J Pharmacol*, 2008. **155**(7): p. 1085-92.
986. Kavanagh, K.L., et al., The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(20): p. 7829-34.
987. Dunford, J.E., et al., Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **296**(2): p. 235-42.
988. Boulenc, X., et al., Importance of the paracellular pathway for the transport of a new bisphosphonate using the human CACO-2 monolayers model. *Biochem Pharmacol*, 1993. **46**(9): p. 1591-600.
989. Twiss, I.M., et al., The effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human epithelial (Caco-2) cells, an in vitro model for intestinal epithelium. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(5): p. 784-91.
990. Lin, J.H., I.W. Chen, and F.A. deLuna, On the absorption of alendronate in rats. *J Pharm Sci*, 1994. **83**(12): p. 1741-6.
991. Lin, J.H. and A.Y. Lu, Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 1997. **49**(4): p. 403-49.
992. Wingen, F. and D. Schmahl, Pharmacokinetics of the osteotropic diphosphonate 3-amino-1-hydroxypropane-1,1-diphosphonic acid in mammals. *Arzneimittelforschung*, 1987. **37**(9): p. 1037-42.
993. Michael, W.R., W.R. King, and J.M. Wakim, Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1972. **21**(4): p. 503-15.
994. Gertz, B.J., et al., Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int*, 1993. **3 Suppl 3**: p. S13-6.
995. Daley-Yates, P.T., et al., The clearance and bioavailability of pamidronate in patients with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int*, 1991. **49**(6): p. 433-5.
996. Recker, R.R. and P.D. Saville, Intestinal absorption of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) using a deconvolution technique. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1973. **24**(4): p. 580-9.
997. Leyvraz, S., et al., Pharmacokinetics of pamidronate in patients with bone metastases. *J Natl Cancer Inst*, 1992. **84**(10): p. 788-92.
998. Kasting, G.B. and M.D. Francis, Retention of etidronate in human, dog, and rat. *J Bone Miner Res*, 1992. **7**(5): p. 513-22.

999. Monkkonen, J., J. Simila, and M.J. Rogers, *Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro*. *Life Sci*, 1998. **62**(8): p. PL95-102.
1000. Toyras, A., et al., *Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro*. *Eur J Pharm Sci*, 2003. **19**(4): p. 223-30.
1001. Richards, P.J., et al., *Pro-inflammatory effects of the aminobisphosphonate ibandronate in vitro and in vivo*. *Rheumatology (Oxford)*, 1999. **38**(10): p. 984-91.
1002. Gallacher, S.J., et al., *Side-effects of pamidronate*. *Lancet*, 1989. **2**(8653): p. 42-3.
1003. Russell, R.G., P.I. Croucher, and M.J. Rogers, *Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses*. *Osteoporos Int*, 1999. **9 Suppl 2**: p. S66-80.
1004. Tanvetyanon, T. and P.J. Stiff, *Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(6): p. 897-907.
1005. Schweitzer, D.H., et al., *Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate*. *J Bone Miner Res*, 1995. **10**(6): p. 956-62.
1006. Thiebaud, D., et al., *An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates*. *Calcif Tissue Int*, 1997. **61**(5): p. 386-92.
1007. Hewitt, R.E., et al., *The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **139**(1): p. 101-11.
1008. Sauty, A., et al., *Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy*. *Bone*, 1996. **18**(2): p. 133-9.
1009. Kim, J.M., et al., *CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF-kappaB-independent pathways*. *Int Immunol*, 2005. **17**(12): p. 1525-31.
1010. Balloy, V., et al., *Aspergillus fumigatus-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30513-21.
1011. Scaldaferri, F., et al., *The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(1): p. 290-300.
1012. Shao, L., O. Kamalu, and L. Mayer, *Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk*. *Immunol Rev*, 2005. **206**: p. 160-76.
1013. Framson, P.E., et al., *Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(5): p. 1054-62.
1014. Hara, J., et al., *Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in macrophages and granulomas of Crohn's disease: demonstration of cell-to-cell contact with T lymphocytes*. *Lab Invest*, 1997. **77**(2): p. 175-84.
1015. Nakazawa, A., et al., *The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(5): p. 1347-57.
1016. Nakazawa, A., et al., *Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(3): p. 536-45.
1017. Lin, X.P., N. Almqvist, and E. Telemo, *Human small intestinal epithelial cells constitutively express the key elements for antigen processing and the production of exosomes*. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. **35**(2): p. 122-8.
1018. Allez, M., et al., *Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1516-26.
1019. Mayer, L. and R. Shlien, *Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man*. *J Exp Med*, 1987. **166**(5): p. 1471-83.
1020. Toy, L.S., et al., *Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 2062-71.
1021. Yio, X.Y. and L. Mayer, *Characterization of a 180-kDa intestinal epithelial cell membrane glycoprotein, gp180. A candidate molecule mediating t cell-epithelial cell interactions*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(19): p. 12786-92.
1022. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
1023. Dotan, I., et al., *Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma*.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1630-40.
1024. Miyagawa, F., et al., *Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen.* J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5508-14.
1025. Lawetzky, A., et al., *Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors alpha/beta and gamma/delta.* Eur J Immunol, 1990. **20**(2): p. 343-9.
1026. Itohara, S., et al., *Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta: analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5094-8.
1027. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
1028. Carding, S.R. and P.J. Egan, *The importance of gamma delta T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses.* Immunol Rev, 2000. **173**: p. 98-108.
1029. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology.* Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 997-1003.
1030. Bluestone, J.A., et al., *TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 307-53.
1031. Sim, G.K., *Intraepithelial lymphocytes and the immune system.* Adv Immunol, 1995. **58**: p. 297-343.
1032. Selin, L.K., et al., *Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells.* J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6784-94.
1033. Eichelberger, M. and P.C. Doherty, *Gamma delta T cells from influenza-infected mice develop a natural killer cell phenotype following culture.* Cell Immunol, 1994. **159**(1): p. 94-102.
1034. Carding, S.R., et al., *Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells.* J Exp Med, 1990. **172**(4): p. 1225-31.
1035. Xu-Amano, J., et al., *Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues.* J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1309-20.
1036. Komano, H., et al., *Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 6147-51.
1037. Roberts, S.J., et al., *T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11774-9.
1038. Kaufmann, S.H., *gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2272-9.
1039. Allison, J.P. and W.L. Havran, *The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors.* Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 679-705.
1040. Ke, Y., et al., *Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance.* J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3610-8.
1041. Goodman, T. and L. Lefrancois, *Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes.* Nature, 1988. **333**(6176): p. 855-8.
1042. Ullrich, R., et al., *gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium.* Cell Immunol, 1990. **128**(2): p. 619-27.
1043. Helgeland, L., et al., *Regional phenotypic specialization of intraepithelial lymphocytes in the rat intestine does not depend on microbial colonization.* Scand J Immunol, 1997. **46**(4): p. 349-57.
1044. Wesch, D., A. Glatzel, and D. Kabelitz, *Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype.* Cell Immunol, 2001. **212**(2): p. 110-7.
1045. Ninomiya, T., et al., *Vgamma1+ gammadelta T cells play protective roles at an early phase of murine cytomegalovirus infection through production of interferon-gamma.* Immunology, 2000. **99**(2): p. 187-94.
1046. Matsuzaki, G., et al., *Mechanism of murine Vgamma1+ gamma delta T cell-mediated innate immune response against Listeria monocytogenes infection.* Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 928-35.
1047. Yin, Z., et al., *T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1566-71.
1048. Wang, L., et al., *Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo.* J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1349-57.
1049. Hoffmann, J.C., et al., *Role of T lymphocytes in rat 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced colitis: increased mortality after gammadelta T cell depletion and no effect of alphabeta T cell depletion.* Gut, 2001. **48**(4): p. 489-95.
1050. Szczepanik, M., et al., *Gamma delta T cells from tolerized alpha beta T cell receptor*

- (TCR)-deficient mice inhibit contact sensitivity-effector T cells in vivo, and their interferon-gamma production in vitro. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2129-39.
1051. Harrison, L.C., et al., Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2167-74.
1052. Fukushima, K., et al., Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor gamma/delta in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1991. **101**(3): p. 670-8.
1053. Lee, H.B., et al., Differences in immunophenotyping of mucosal lymphocytes between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Korean J Intern Med*, 1997. **12**(1): p. 7-15.
1054. McVay, L.D., et al., Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Mol Med*, 1997. **3**(3): p. 183-203.
1055. Fiorucci, S., et al., Importance of innate immunity and collagen binding integrin alpha1beta1 in TNBS-induced colitis. *Immunity*, 2002. **17**(6): p. 769-80.
1056. Dohi, T., et al., Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. *J Exp Med*, 1999. **189**(8): p. 1169-80.
1057. Yamamoto-Furusho, J.K. and J.R. Korzenik, Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(42): p. 6751-5.
1058. Huang, J.S., et al., Chronic granulomatous disease caused by a deficiency in p47(phox) mimicking Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(8): p. 690-5.
1059. Schinella, R.A., et al., Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Ann Intern Med*, 1980. **92**(1): p. 20-3.
1060. Bai, A., et al., All-Trans Retinoic Acid Ameliorates Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis by Shifting Th1 to Th2 Profile. *J Interferon Cytokine Res*.
1061. Bai, A., et al., All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(4): p. 959-69.
1062. Desreumaux, P., et al., Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med*, 2001. **193**(7): p. 827-38.
1063. Kang, S.G., et al., High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T-cell subsets and effectively control intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2009. **137**(4): p. 1391-402 e1-6.
1064. Bai, A., et al., All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol*, 2009.
1065. Wada, Y., et al., Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(10): p. 1548-56.
1066. Mucida, D., et al., Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
1067. Sakuraba, A., et al., Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2009. **137**(5): p. 1736-45.
1068. Osanai, M., et al., Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. *Mol Pharmacol*, 2007. **71**(1): p. 250-8.
1069. Korzenik, J.R., et al., Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med*, 2005. **352**(21): p. 2193-201.
1070. Shea-Donohue, T., et al., Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun*, 2008. **14**(2): p. 117-24.
1071. Qualls, J.E., et al., Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(2): p. 236-47.
1072. Qualls, J.E., et al., Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(4): p. 802-15.
1073. Marks, D.J., et al., Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*, 2006. **367**(9511): p. 668-78.

Abreviaturas.

5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AP	Fosfatasa alcalina (<i>alkaline phosphatase</i>).
APC	Célula presentadora de antígenos .
ARN	Ácido ribonucleico.
COX2	Ciclooxigenasa 2.
CRF	Corticotropina.
CU	Colitis Ulcerosa.
DAI	Índice de actividad de la enfermedad).
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DSS	Sulfato de dextrano sódico.
EC	Enfermedad de Chron.
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
EPC	Células progenitoras endoteliales.
ERK	Extracellular signal-regulated kinase.
Foxp3	Forkhead box P3
FPP	Farnesil difosfato.
FPPS	Farnesil difosfato sintasa.
FPPT	Farnesil difosfato transferasa.
FTI	Inhibidor de la farnesiltransferasa.
GDF	GDP dissolution factor.
GDI	Guanosine nucleotide dissociation inhibitor.
GEF	Guanine nucleotide exchange factor.
GGTI	Inhibidor de la geranilgeraniltransferasa.
GPCR	G protein coupled receptor.
HMGCoA	Hidroximetil glutaril coenzima A.
IDM	Índice de daño macroscópico.
IFN	Interferon.
IL	Interleukina.
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible.
IPP	Isopentenil difosfato.
JAK	Janus kinases.
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase.
LDH	Láctico deshidrogenasa.
LFA	Lymphocyte function associated antigen.
LPS	Lipopolisacárido.
MAPK	Mitogen-activated protein kinases.
MDP	Muramildipéptido.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MPO	Mieloperoxidasa.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida.
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells.
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGE₂	Prostaglandina E2.
Rap1A	Repressor activator protein.
REP	Rab escort protein.
Rpm	Revoluciones por minuto.

RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
RT	Retrotranscripción.
SAZ	Sulfasalazina.
SCOS	Suppressor of cytokine signaling.
SDS	Sodium dodecyl sulfate.
SEM	Error estándar de la media.
SER	Eventos relacionados con el esqueleto.
SER-1	3-phosphoserine aminotransferase.
SP	Sustancia P.
SQSTM	Secuestrosoma.
SRC-1	Coestimulador de receptores esteroides.
SSI	STAT-induced STAT inhibitor.
TBS-T	Tris buffered saline-Tween.
TCR	Receptor de células T.
TGF-β	Factor de crecimientos transformante.
TLR	Toll like receptor (receptores tipo Toll).
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico.
TNF	Factor de necrosis tumoral.

Índice de tablas.

- Tabla 1.** Principales genes relacionados con la EII (pág. 16).
Tabla 2. Aminosalicilatos en el tratamiento de la EII (pág. 33).
Tabla 3. Cálculo del índice de daño macroscópico (IDM) (pág. 64).
Tabla 4. Modificación en la expresión de marcadores de distintos tipos celulares provocado con Pamidronato en el análisis del transcriptoma colónico (pág. 89).
Tabla 5. Relación de las sustancias incluidas en los experimentos *in vitro* (pág. 95).

Índice de figuras.

- Figura 1.** Esquema de la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal (pág. 24).
Figura 2. Esquema de la activación de NFκB (pág. 27).
Figura 3. Esquema de la activación de MAPk (pág. 28).
Figura 4. Esquema de la activación de JAK/STAT (pág. 29).
Figura 5. Esquema del algoritmo de tratamiento en la EC (pág. 39).
Figura 6. Esquema del algoritmo de tratamiento en la CU (pág. 40).
Figura 7. Esquema del proceso de prenilación de proteínas (pág. 41).
Figura 8. Esquema de la ruta del mevalonato (pág. 42).
Figura 9. Estructura tridimensional de la enzima farnesiltransferasa (pág. 45).
Figura 10. Estructura química de bisfosfonatos (pág. 54).
Figura 11. Diseño experimental en el modelo de colitis por TNBS (pág. 61).
Figura 12. Diseño experimental en el modelo de colitis por DSS (pág. 62).
Figura 13. Efecto antiinflamatorio del alendronato en el modelo de colitis por TNBS (postratamiento) (pág. 73).
Figura 14. Evolución del estado de los animales en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 74).
Figura 15. Daño macroscópico colónico en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 75).
Figura 16. Cortes histológicos del tejido colónico en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 76).
Figura 17. Actividades enzimáticas en el tejido colónico en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 76).
Figura 18. Expresión de iNOS y COX2 en el tejido colónico, medida por Western Blot en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 77).
Figura 19. Expresión génica en el tejido colónico medido por PCR a tiempo real en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 77).
Figura 20. Producción de citoquinas por parte de esplenocitos y células procedentes de ganglios linfáticos mesentéricos estimuladas con

concanavalina A (5 µg/ml) en el tratamiento con pamidronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 78).

- Figura 21.** Evolución del estado de los animales en el tratamiento con pamidronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 79).
- Figura 22.** Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el tratamiento con pamidronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 79).
- Figura 23.** Tinción de hematoxilina-eosina realizada en cortes histológicos de colon en el tratamiento con pamidronato intraperitoneal en la colitis por TNBS (pág. 79).
- Figura 24.** Evolución de los animales en el tratamiento con pamidronato en el modelo de colitis por DSS (pág. 80).
- Figura 25.** Análisis bioquímico y macroscópico del tejido colónico en el tratamiento con Pamidronato en el modelo de colitis por DSS (pág. 81).
- Figura 26.** Tinción de hematoxilina-eosina realizada en cortes histológicos de colon en el tratamiento con pamidronato intraperitoneal en la colitis por DSS (pág. 81).
- Figura 27.** Análisis de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos en el tratamiento con Pamidronato en el modelo de colitis por DSS (pág. 81).
- Figura 28.** Evolución de los animales en el tratamiento con alendronato en el modelo de colitis por TNBS (pág. 82).
- Figura 29.** Daño macroscópico del tejido colónico en el tratamiento con alendronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 83).
- Figura 30.** Bioquímica en el tejido colónico: MPO, AP y sensibilidad de AP al inhibidor levamisol en el tratamiento con alendronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 83).
- Figura 31.** Evolución de los animales en el tratamiento con alendronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 83).
- Figura 32.** Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el tratamiento con alendronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 84).
- Figura 33.** Evolución de los animales en el tratamiento con ibandronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 84).
- Figura 34.** Daño macroscópico del colon en el tratamiento con ibandronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 85).
- Figura 35.** Bioquímica en el tejido colónico: MPO y AP en el tratamiento con ibandronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 85).
- Figura 36.** Concentración de citoquinas en plasma en el tratamiento con ibandronato por vía oral en el modelo de colitis por TNBS (pág. 85).

- Figura 37.** Evolución de los animales en el tratamiento con ibandronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 86).
- Figura 38.** Análisis macroscópico y bioquímico del tejido colónico en el tratamiento con ibandronato por vía intraperitoneal en el modelo de colitis por TNBS (pág. 86).
- Figura 39.** Efecto de la SAZ sobre el transcriptoma colónico en el modelo de TNBS (pág. 87).
- Figura 40.** Efecto del pamidronato sobre el transcriptoma colónico en el modelo de TNBS (pág. 88).
- Figura 41.** Modificación en la expresión de genes implicados en la respuesta a ácido retinoico por Pamidronato en el modelo de colitis por TNBS (pág. 90).
- Figura 42.** Evolución del peso corporal durante el tratamiento con pamidronato en ratas sanas (pág. 91).
- Figura 43.** Recuento de células mononucleares en bazo y ganglios linfáticos mesentéricos en los el tratamiento con pamidronato en ratas sanas (pág. 91).
- Figura 44.** Producción de citoquinas en células mononucleares procedentes de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de ratas sanas tratadas con pamidronato tras el estímulo con concanavalina A (pág. 92).
- Figura 45.** Concentración de IFN- γ en plasma en el tratamiento con pamidronato en ratas sanas (pág. 92).
- Figura 46.** Expresión de Foxp3 en células de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos el tratamiento con pamidronato en ratas sanas (pág. 93).
- Figura 47.** Western Blot frente a la forma no prenilada de Rap1a en colon y duodeno en el tratamiento con pamidronato en ratas sanas durante 8 días (pág. 93).
- Figura 48.** Western Blot frente a la forma no prenilada de Rap1a en colon y duodeno en el tratamiento con pamidronato durante 8 días en ratas sanas (pág. 94).
- Figura 49.** Prenilación en el bazo el tratamiento con pamidronato en ratas sanas (pág. 94).
- Figura 50.** Toxicidad celular: adhesión por cristal violeta y actividad LDH en el medio de cultivo en células Caco-2 tratadas con bisfosfonatos (pág. 96).
- Figura 51.** Proliferación celular, expresión de PCNA, en células Caco-2 tratadas con bisfosfonatos (pág. 97).
- Figura 52.** Producción de IL-8 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β a corto plazo (24 horas) (pág. 97).
- Figura 53.** Secreción de IL-8 estimulada con IL-1 β en células Caco-2 en el tratamiento de una semana (pág. 98).
- Figura 54.** Estudio temporal de la secreción de IL-8 en el tratamiento con alendronato y GGTI-298 en condiciones basales y con IL-1 β en células Caco-2 (pág. 99).

- Figura 55.** Secreción de IL-8 tras cinco días de tratamiento con bisfosfonatos y estímulo con IL-1 β en células Caco-2 (pág. 99).
- Figura 56.** Inhibición de la prenilación de la proteína Rap1A en células Caco-2 (pág. 100).
- Figura 57.** Activación de NF κ B inducida por IL-1 β (30 minutos) en células Caco-2. Tratamiento a largo plazo, 5 días de incubación con bisfosfonatos (pág. 101).
- Figura 58.** Fosforilación de MAP-quinasas inducida por la IL-1 β (30 minutos) en el tratamiento de 5 días con bisfosfonatos e inhibidores específicos en células Caco-2 (pág. 102).
- Figura 59.** Toxicidad celular: adhesión por cristal violeta y LDH en el medio de cultivo en células HT29 (pág. 103).
- Figura 60.** Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular en células HT29 (pág. 103).
- Figura 61.** Síntesis de IL-8 en condiciones basales, o con estimulación con LPS o TNF- α en el protocolo a corto plazo (24 horas) en células HT29 (pág. 104).
- Figura 62.** Síntesis de IL-8 en condiciones basales, o con estimulación con LPS o TNF- α en el protocolo a largo plazo (1 semana) en células HT29 (pág. 105).
- Figura 63.** Síntesis de IL-8 en condiciones basales, o con estimulación con LPS en el protocolo de 5 días de tratamiento en células HT29 (pág. 106).
- Figura 64.** Western Blot para detectar la forma no prenilada de Rap1A en células HT29 (pág. 107).
- Figura 65.** LDH liberada en el tratamiento a corto y largo plazo en células IEC18 (pág. 107).
- Figura 66.** Cristal violeta en el tratamiento a corto y a largo plazo en células IEC18 (pág. 108).
- Figura 67.** Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular en células IEC18 (pág. 109).
- Figura 68.** Prenilación, detección de la forma no prenilada de la proteína Rap1A mediante la técnica de Western Blot en células IEC18 (pág. 110).
- Figura 69.** Expresión de COX2 inducida por LPS en células IEC18 tratadas con bisfosfonatos durante 24 horas (pág. 110).
- Figura 70.** Estudio de la modulación en la expresión de COX2 inducida por LPS en el tratamiento a corto plazo con otros bisfosfonatos (pág. 111).
- Figura 71.** Fosforilación de la proteína inhibidora I κ B α inducida por LPS (30 minutos de estímulo) en el tratamiento de 24 horas en células IEC18 (pág. 111).
- Figura 72.** Fosforilación de MAP-quinasas (ERK, SAPK/JNK y p38) debida a LPS y modulada por el tratamiento a corto plazo (24 horas) con bisfosfonatos e inhibidores específicos en células IEC18 (pág. 112).

- Figura 73.** Estudio de la modulación en la expresión de COX2 inducida por LPS en el tratamiento a largo plazo con bisfosfonatos (5 días) en células IEC18 (pág. 112).
- Figura 74.** Activación de NFκB (fosforilación de IκBα) en células IEC18 estimuladas con LPS (30 minutos) y tratadas con bisfosfonatos durante 5 días (pág. 113).
- Figura 75.** Estudio de la activación de MAPK por LPS y su modulación por el tratamiento con bisfosfonatos a largo plazo en células IEC18 (pág. 113).
- Figura 76.** Inhibición de la prenilación de proteínas, detección mediante Western Blot de la forma no prenilada de Rap1A en células IEC18 (pág. 114).
- Figura 77.** Medida de la proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada, en condiciones basales o tras el estímulo con concanavalina A en células mononucleares procedentes del bazo (pág. 115).
- Figura 78.** Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular mediante Western Blot en células mononucleares procedentes del bazo (pág. 116).
- Figura 79.** Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con concanavalina A en el tratamiento a corto plazo (48 horas) en células mononucleares procedentes del bazo (pág. 117).
- Figura 80.** Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con concanavalina A en el tratamiento a largo plazo (5 días) en células mononucleares procedentes del bazo (pág. 117).
- Figura 81.** Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con LPS en el tratamiento a corto plazo (24 horas) (pág. 118).
- Figura 82.** Secreción de citoquinas en células mononucleares estimuladas con LPS en el tratamiento a largo plazo (5 días) (pág. 119).
- Figura 83.** Estudio de la expresión de Foxp3 en células mononucleares y su modulación por bisfosfonatos (pág. 119).
- Figura 84.** Estudio de la expresión génica de Foxp3 y citoquinas en esplenocitos estimulados o no con concanavalina A durante 48 horas (pág. 120).
- Figura 85.** Pureza de la población enriquecida en linfocitos T obtenida mediante separación celular magnética a partir de esplenocitos (pág. 121).
- Figura 86.** Síntesis de citoquinas en linfocitos T estimulados con Con A en el tratamiento a corto y a largo plazo (pág. 121).
- Figura 87.** Expresión de PCNA en linfocitos T (pág. 122).
- Figura 88.** Fosforilación de STAT4 en linfocitos T (pág. 122).
- Figura 89.** Análisis de la diferenciación de linfocitos hacia el subtipo Th1 mediante la polarización con IL-12 (pág. 123).

- Figura 90.** Estudio de la expresión génica de Foxp3 y de citoquinas en linfocitos estimulados o no con concanavalina A durante 48 horas (pág. 123).
- Figura 91.** Secreción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS en el tratamiento a corto plazo (24 horas) (pág. 124).
- Figura 92.** Secreción de citoquinas en macrófagos purificados a partir de células de bazo estimulados con LPS en el tratamiento a largo plazo (5 días) (pág. 125).
- Figura 93.** Secreción de citoquinas en cocultivo (Transwell™) de enterocito-Linfocito T (pág. 126).
- Figura 94.** Expresión de PCNA en linfocitos T procedentes del compartimiento inferior en cocultivos de enterocitos y linfocitos T (Transwell™) (pág. 127).
- Figura 95.** Fosforilación de STAT4 en linfocitos T procedentes del compartimiento inferior en cocultivos de enterocitos y linfocitos T (Transwell™) (pág. 127).



RESEARCH PAPER

The bisphosphonate alendronate improves the damage associated with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats

I Ballester¹, A Daddaoua², R López-Posadas¹, A Nieto³, MD Suárez², A Zarzuelo¹,
 O Martínez-Augustin² and F Sánchez de Medina¹

¹Department of Pharmacology, CIBEREHD, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology II, CIBEREHD, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain and ³Banco de Líneas Celulares de Andalucía, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Background and purpose: The nitrogen-containing bisphosphonates are drugs used successfully in the treatment of osteoporosis. They act inhibiting farnesyl diphosphate synthase. This mechanism may also produce anti-inflammatory effects. The therapeutic activity of alendronate was tested *in vivo* using a model of inflammatory bowel disease.

Experimental approach: The trinitrobenzenesulfonic acid model of colitis in the rat was used. Rats were treated orally with alendronate and its efficacy compared with that of oral sulphasalazine or vehicle, starting 2 h after colitis induction. The status of the animals was assessed 5 days later.

Key results: Alendronate treatment (25 or 75 mg kg⁻¹ day⁻¹) resulted in a decrease in the colonic damage score and loss of body weight (at 25 mg kg⁻¹ day⁻¹ only). This was associated to a dramatic reduction in the mRNA levels of interleukin 1 β (IL-1 β), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra). The magnitude of the beneficial effect was comparable to that of sulphasalazine (at a 6–20 fold higher dose). Thus sulphasalazine post-treatment reduced the mRNA levels of IL-1 β /IL-1ra and MCP-1 to the same extent as alendronate and additionally lowered colonic alkaline phosphatase activity, but failed to affect body weight loss or colonic damage score. Alendronate failed to exert beneficial effects when administered intraperitoneally.

Conclusions and Implications: Oral but not intraperitoneal alendronate significantly protected the colon in experimental rat colitis. Inflammatory bowel disease patients might benefit from exposure to oral alendronate.

British Journal of Pharmacology (2007) 151, 206–215. doi:10.1038/sj.bjp.0707227; published online 20 March 2007

Keywords: alendronate; trinitrobenzenesulfonic acid; experimental colitis; bisphosphonates; inflammatory bowel disease; interleukin 1

Abbreviations: COX2, cyclooxygenase 2; IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-1ra, interleukin 1 receptor antagonist; IBD, inflammatory bowel disease; iNOS, inducible nitric oxide synthase; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid; TGF- β , transforming growth factor- β ; TFF3, trefoil factor 3

Introduction

The phrase inflammatory bowel disease (IBD) refers to two different but closely related conditions, ulcerative colitis and Crohn's disease. Both are chronic relapsing diseases of the intestine that cause a significant deterioration of the quality of life of patients and which have a substantial (and increasing) prevalence (Sands, 2000). Despite an intense investigative effort, the aetiology of IBD remains unknown,

but recent studies strongly suggest that IBD represents an uncontrolled and exacerbated response to luminal antigens that are innocuous for the normal population. There are significant differences in the pathology of both IBD variants. Thus Crohn's disease appears to be a well-defined Th1-driven condition characterized by the increased production of interferon γ , IL-12/IL-23, IL-18, IL-21 and osteopontin, whereas ulcerative colitis exhibits a Th2 profile, with augmented IL-5, IL-4 and IL-13 (Monteleone *et al.*, 2006). Furthermore, Crohn's disease has been linked to gene variants such as those affecting CARD15/NOD2, SLC22A4 and SLC22A5, although the mechanisms involved are not well established (Siminovitch, 2006). However, despite these differences in both conditions there is a marked increase in

Correspondence: Dr F Sánchez de Medina, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada. Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.

E-mail: fsanchez@ugr.es

Received 30 October 2006; revised 22 December 2006; accepted 7 February 2007; published online 20 March 2007

the biosynthesis of nonspecific inflammatory markers, including eicosanoids, adhesion molecules, metalloproteinases, oxidants/free radicals, chemokines, etc (Monteleone *et al.*, 2006). Hence it is not surprising that nearly all drug treatments for IBD downregulate intestinal inflammation in a non-specific fashion. These drugs, including corticoids, aminosalicilates or azathioprine, among others, can often manage IBD successfully, but have a plethora of serious adverse effects which limit their application. Therefore, the search for new treatments with a low profile of adverse effects is much warranted (Sands, 2000; Van Assche *et al.*, 2005).

One of the possible strategies that can be applied to limit the inflammatory response is to target protein prenylation, which is essential for the bioactivity of a number of small GTPases such as Rho and Rho-like enzymes, which in turn are involved in the activation of the p38 and JNK MAP kinases and NF- κ B, among other pro-inflammatory pathways. One important drug family, the statins, exert anti-inflammatory effects that are accounted for, at least in part, by this mechanism (Abeles and Pillinger, 2006). These include intestinal anti-inflammatory activity in a preclinical model of IBD, acting by a mechanism independent of cholesterol lowering (Sasaki *et al.*, 2003).

The inhibitory effect on protein prenylation is characteristic of another drug class, which is otherwise unrelated, namely the bisphosphonates, a group of drugs used primarily in the treatment and prevention of osteoporosis. The oldest members of the bisphosphonate family, such as clodronate and etidronate, inhibit bone resorption through induction of osteoclast apoptosis. However, the members of the so called second generation of bisphosphonates (nitrogen-containing) appear to act by an entirely different mechanism, that is interference with signal transduction mechanisms by inhibition of farnesyl diphosphate synthase in the cholesterol biosynthetic pathway (Coxon *et al.*, 2006). This results in inhibition of osteoclastic bone resorption and even stimulation of bone matrix new synthesis. The clinical efficacy of bisphosphonates in this context, including risedronate, alendronate and pamidronate, among others, is well established by clinical trials (Mathoo *et al.*, 2004). Of note, bisphosphonates are often associated with corticoids in the treatment of IBD in an attempt to reduce the impact of the latter on the bone. However, the therapeutic potential of bisphosphonates in intestinal inflammation has not been explored to date. Therefore, we set out to verify whether one such drug, alendronate, had beneficial effects in the trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model of rat colitis, using sulphasalazine a standard treatment for IBD, for comparison.

Methods

Animals

Female Wistar rats (150–200 g) obtained from the Laboratory Animal Service of the University of Granada were housed in makrolon cages, maintained in a 12 h light-dark cycle, fed standard rodent chow (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain) and water *ad libitum* throughout the experiment. This study was carried out in accordance with the Guide for the Care

and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health and was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Granada.

Induction of colitis and treatment protocol

After a 7-day acclimatization period, rats were weighed and randomly distributed in the different experimental groups of seven rats each. Colitis was induced by the administration of an enema containing 0.25 ml of a solution of TNBS (10 mg) in EtOH (50% v/v). Animals were killed after 5 days. Three different experiments were performed. In the first one the animals that received the TNBS enema were treated daily starting 2 h after colitis induction with either alendronate (25 mg kg⁻¹ day⁻¹, alendronate group), sulphasalazine (500 mg kg⁻¹ day⁻¹, sulphasalazine group) or vehicle (1% methylcellulose, TNBS group) in parallel experiments until the day they were killed. A control group, which received saline instead of TNBS, was included for comparison.

The second experiment was similar but a suspension of Fosamax tablets (Merck Sharp and Dohme) was used as alendronate treatment. This approach was followed to increase the dose to 75 mg kg⁻¹ day⁻¹, which resulted in enhanced anti-inflammatory activity. In a third experiment, alendronate was administered by the i.p. route (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) and compared with the control groups.

Assessment of colonic damage

Animal body weight and food consumption were recorded daily. Animals were scored for diarrhoeal status (0–3), killed by cervical dislocation and the colon was removed and placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery and blotted on filter paper. Each specimen was weighed and its length measured under a constant load (2 g). The intestinal segments were subsequently divided longitudinally in 3–4 pieces and immediately frozen in liquid nitrogen for biochemical determinations. Macroscopically visible damage was scored on a 0–24 scale by an observer unaware of treatment according to the criterion shown in Table 1.

Alkaline phosphatase activity was measured spectrophotometrically using disodium *p*-nitrophenylphosphate as substrate (Sanchez de Medina *et al.*, 2004) and the results expressed as mU mg protein⁻¹. The sensitivity to the inhibitor levamisole (1 mM), which is modulated by inflammation, was also determined and expressed as % inhibition (Sanchez de Medina *et al.*, 2004). Myeloperoxidase activity was determined as an index of neutrophil accumulation. The enzyme activity was measured spectrophotometrically, according to the technique described by Krawisz *et al.* (1984) with minor modifications. The results are expressed as myeloperoxidase units (μ mol min⁻¹) per gram of wet tissue.

Western blot

Colonic levels of nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX-2) were determined by immunoblotting. Colonic samples were homogenized in cold lysis buffer containing 1% Igepal CA-630, 20 mM HEPES-Na pH 7.5, 10 mM ethylene glycol bis (β -amino ethylether)-*N,N,N',N'*-

Table 1 Scoring criteria applied to the visible lesions in the rat colon^a

Adhesions	0 No adhesions 1 Difficult dissection 2 Visible adhesions 3 'Wrapped' intestine
Obstruction	0 No obstruction 1 Need for gentle manual cleaning 2 Fecal impaction
Thickening	0 Similar to uninflamed intestine 1 Thicker than normal (~1–2 mm) 2 Much thicker than normal (>2 mm)
Hyperemia	0 Similar to uninflamed intestine 1 Mild and generalized or intense but localized hyperemia 2 Intense and localized hyperemia 3 Frank hemorrhage
Shortening	0 Normal colonic length (>15 cm) 1 Colonic length <15 cm 2 Colonic length <14 cm 3 Colonic length <13.5 cm
Necrosis	0 No signs of necrosis 1 Small areas of necrosis 2 Patchy necrosis (cobblestone appearance) 3 Focal necrosis, $\varnothing < 0.8$ cm 4 Focal necrosis, $\varnothing > 0.8$ cm 5 Extended necrotic lesion
Other signs	+2 proximal dilation +2 deformity +1 fragility (tendency to break) +1 scarring

^aAll scores were assigned by one investigator unaware of the treatment.

tetraacetic acid (EGTA), 40 mM β -glycerophosphate, 25 mM $MgCl_2$, 2 mM sodium orthovanadate and freshly added protease inhibitors (phenyl-methylsulphonyl fluoride, aprotinin, leupeptin, 1,10-phenanthroline). The protein content was measured by the bicinchoninic acid assay (Vilaseca *et al.*, 1990b), using bovine serum albumin (BSA) as standard. Samples were boiled for 4 min in Laemmli buffer, then 75 μ g were separated by 7% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The nitrocellulose membranes were blocked for at least 1 h at room temperature in Tris-buffered saline-0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 5% (w/v) nonfat dry milk and then incubated with TBS-T containing BSA 5% and the primary antibody at 4°C overnight. The dilutions of antibodies used were: 1:3000 for iNOS (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Madrid, Spain) and COX-2 (Cayman Chemical Company). A primary antibody against α -actin was used as loading control. After three washes of 5 min with TBS-T, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG was used as secondary antibody. Then, enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, USA) detection was performed.

Immunohistochemical analysis

The samples for the histological study were taken from the edge of the necrotic area, coded, fixed in formaldehyde and processed for routine analysis using haematoxylin/eosin staining. The sections were scored for microscopic damage (including tissue oedema) by an investigator (AN) unaware of the sample identity as described previously (Stucchi *et al.*, 2000). Immunohistochemistry was performed with COX-2

and iNOS polyclonal antibodies (Oxford Biomedical Research and Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany respectively) at a 1:400 and 1:100 dilution for 30 min at room temperature. The developing system was Dako ChemMate™ Universal Kits (LSBA), following manufacturer's instructions. Immunoreactivity was visualized with 3–30 diaminobenzidine tetrachloride (Sigma) and hydrogen peroxide (0.01%) and slides were counterstained for 2 min with Gill's haematoxylin. Dilutions and washing were made in TBS (Castells *et al.*, 2006). Negative control slides were made by substituting the primary antibody with TBS or with normal pig serum.

Analysis of gene expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Colonic fragments were frozen immediately post mortem in liquid nitrogen. Total RNA was isolated by single-step, guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction with the TRIzol Reagent (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. RNA (5 μ g sample⁻¹) was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using reverse transcriptase (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) and following the instructions as indicated. The expression of the 18 S ribosomal unit was routinely examined as a loading standard. The following primer sequences (5'→3') were used: for Muc-2, forward: 5'-GCTCAATCTCAGAAGGCGACAC-3' and reverse: 5'-CCAGATAACAATGATGCCAGAGC-3'; for Muc-3, forward: 5'-CACAAAGGCAAGAGTCCAGA-3' and 5'-ACTGTCCTTGGTGCTGAATG-3'; for trefoil factor 3 (TFF-3), forward: 5'-ATG GAGACCAGAGCCTTCTG-3' and reverse 5'-ACAGCCTTGTG CTGACTGTA-3'; for interleukin-1 β (IL-1 β), forward: 5'-AAT GACCTGTTCTTTGAGGCTGAC-3' and reverse 5'-CGAGATG CTGCTGTGAGATTGAAG-3'; for interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra), forward: 5'-GAGTCAGCTGGCCACCTG-3' and reverse 5'-CAGACTTGACACAAGACAGGCAC-3'; for transforming growth factor- β (TGF- β), forward: 5'-GCTAAT GGTGGACCGCAACAAC-3' and reverse 5'-CACTGCTTCCC GAATGTCTGAC-3'; for macrophage chemoattractant protein 1 (MCP1), forward 5'-CACTATGCAGGTCTCTGTCACG-3' and reverse 5'-CTGGTCACTTCTACAGAAGTGC-3'; and for 18S, forward: 5'-CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3' and reverse 5'-CGCCGGTCCAAGAATTCACC-3'. The polymerase chain reaction was performed in a 25 μ l volume containing 1 μ l of RT product (cDNA) and 23 μ l PCR master mix: 10 \times buffer, 1U Taq DNA polymerase (Amersham Biosciences), 5 mM of each dNTPs (Roche, Mannheim, Germany) and 2 pM concentration of each primer. For each primer pair, control experiments were performed to determine the range of cycles, in which a given amount of cDNA would be amplified in a linear fashion. The cycle numbers and hybridization temperatures for each PCR reaction were as follows: MUC2, 27 cycles and 59°C, MUC3, 25 cycles and 56°C, TFF-3, 27 cycles and 59°C, IL-1 β , 30 cycles and 57°C, IL-1ra, 34 cycles and 59°C, TGF- β , 33 cycles and 57°C, MCP1, 40 cycles and 56°C and 18 S, 15 cycles and 60°C. Semiquantitative analyses of photographs of ethidium bromide-stained DNA gels (2% agarose) were performed with Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

The data were normalized to transcript levels for the constitutively expressed 18 S gene.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm s.e.m. Differences among means were tested for statistical significance using one way analysis of variance and *a posteriori* least significance tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$. All analyses were carried out with SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Materials

Except where indicated, all chemicals and primers were obtained from Sigma (Madrid, Spain).

Results

TNBS colitis

Administration of 10 mg of TNBS intrarectally induced a severe colonic inflammatory reaction characterized by mucosal necrosis (Figure 1), submucosal fibrosis and oedema, bowel wall thickening and shortening of colonic length (Table 2), as described previously (Morris *et al.*, 1989; Sanchez de Medina *et al.*, 1996). These features were associated with marked anorexia and loss of body weight (Table 2), which were strongly correlated.

Colon inflammation was also measured biochemically. The results reveal that trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis was associated with a significant increase in myeloperoxidase activity, a marker of neutrophil infiltration (not shown), as well as of alkaline phosphatase (AP) activity, recently proposed as an inflammatory marker (Table 2) (Sanchez de Medina *et al.*, 2004). In addition, the expression of COX-2 and iNOS, as assessed by Western blot, was significantly upregulated compared to the uninfamed group (Figure 2).

Further examination of the inflammatory status revealed that the mRNA levels of IL-1 β and IL-1ra were upregulated by the TNBS challenge (Figure 3). IL-1 β is a potent proinflammatory cytokine, whereas IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) is a naturally occurring antagonist; both are expressed in the mucosa of patients with IBD (Hannum *et al.*, 1990; Stokkers *et al.*, 1998). The TGF- β transcript levels were higher in the TNBS than in the uninfamed group, but the difference did not reach statistical significance. On the other hand, MUC2 levels did not change significantly after colitic induction,

whereas MUC3 levels were decreased. Finally, the colonic expression of TFF3, a peptide produced by goblet cells with important cytoprotective functions in the gut, was also measured, but no significant changes were detected (Figure 3).

Effect of sulphasalazine on TNBS colitis

Sulphasalazine was included as a standard established drug in the treatment of IBD for comparison purposes. This drug has been previously shown to be efficacious in TNBS colitis (Daddaoua *et al.*, 2005; Woodruff *et al.*, 2005). Our data show that sulphasalazine had a beneficial impact administered as a posttreatment in TNBS colitis. Sulphasalazine treated rats exhibited a significant decrease in the colonic AP activity compared to non-treated rats (Table 2), while IL-1 β mRNA levels were normalized (Figure 3). On the other hand, there was no significant change in colonic weight to length ratio, damage score, body weight, myeloperoxidase, COX2, MUC2 or TGF- β levels (Table 2, Figures 2 and 3, and data not shown). The effect on iNOS was significant but of low magnitude. IL-1ra levels were strongly reduced (but less than those of IL-1 β), and MUC3 was downregulated compared

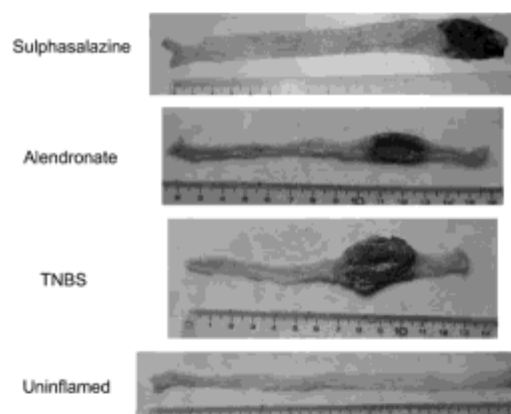


Figure 1 Macroscopic appearance of rat TNBS colitis in the different experimental groups. Photographs are representative of the macroscopic features of the large intestine in each group. Uninflamed: noncolitic group; TNBS: colitic animals treated with vehicle; alendronate: colitic animals treated with alendronate (25 mg kg⁻¹ day⁻¹); sulphasalazine: colitic animals treated with sulphasalazine (500 mg kg⁻¹ day⁻¹). Darkened areas correspond to epithelial necrosis.

Table 2 Effect of alendronate on macroscopic parameters and AP activity in rat TNBS colitis

	Colonic weight/length ratio (mg/cm)	Extension of necrosis (cm)	Damage score	Body weight gain after 5 days	AP activity (mU/mg protein)
Uninflamed	53.8 \pm 1.8	0	0	+2.3 \pm 1.6	71.1 \pm 4.8
TNBS	201.0 \pm 11.9 ⁺	3.2 \pm 0.5 ⁺	11.0 \pm 0.5 ⁺	10.8 \pm 2.3 ⁺	169.6 \pm 36.7 ⁺
Alendronate	180.0 \pm 22.9 ⁺	3.1 \pm 0.6 ⁺	7.4 \pm 1.1 ⁺⁺	5.3 \pm 3.9 ⁺⁺	171.1 \pm 43.0 ⁺
Sulphasalazine	143.7 \pm 41.5 ⁺	2.2 \pm 0.9 ⁺	8.1 \pm 6.5 ⁺	12.8 \pm 2.0 ⁺	110.24 \pm 35.8 ⁺⁺

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid

The doses of alendronate and sulphasalazine were 25 and 500 mg kg⁻¹ day⁻¹, respectively. Values are means \pm s.e.m., n = 7. ⁺Different from Control group, $P < 0.05$, ⁺⁺Different from TNBS group, $P < 0.05$. Body weight gain is expressed as percentage change from the start of the experiment.

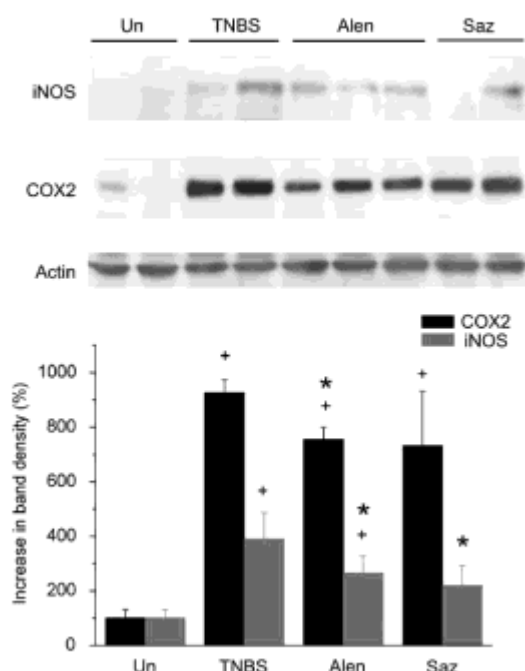


Figure 2 Colonic protein expression of COX-2 (70 kilodaltons) in the different experimental groups. Uninflamed: noncolitic group; TNBS: colitic animals treated with vehicle; alendronate: colitic animals treated with alendronate (25 mg kg⁻¹ day⁻¹); sulphasalazine: colitic animals treated with sulphasalazine (500 mg kg⁻¹ day⁻¹). Expression was assessed by Western blot and densitometry was performed with the Scion Image software. A representative gel is shown. *P < 0.05 vs uninflamed group; *P < 0.05 vs TNBS group.

with non-treated animals (Figure 3). TFF-3 expression was slightly higher in sulphasalazine-treated rats, but without reaching the statistical threshold for significance.

Effect of alendronate on TNBS colitis

Oral treatment of rats with alendronate (25 mg kg⁻¹ day⁻¹) reduced body weight loss when compared with untreated colitic rats (Table 2). Postmortem evaluation of the colon showed a significant improvement, which resulted in a reduction of tissue damage score by approximately 33% in comparison with non-treated colitic animals (Table 2). The photographs in Figure 1 show the features of TNBS inflammation, including wall thickness and colon length shortening. Amelioration of these parameters was observed after alendronate treatment, which resulted in decreased colonic damage score (Table 2).

The intestinal protective effect exerted by alendronate was associated with a significant, though slight, inhibition of COX-2 and iNOS protein expression in the colon (Figure 2) when compared to the TNBS group. In addition, alendronate was associated with a dramatic decrease in colonic IL-1β and IL-1ra expression (Figure 3). The extent of the inhibitory effect was comparable to that of sulphasalazine treated rats. Colonic TFF3 mRNA was higher in the alendronate group than in the TNBS group but this difference did not reach statistical difference. On the other hand, no significant differences were detected in the expression levels of TGF-β, MUC2 or MUC3 compared to the TNBS group (Figure 3).

Effect of higher dose of alendronate (Fosamax) on TNBS colitis

The aim of this second set of experiments was twofold. First, to obtain new samples for further determinations, including

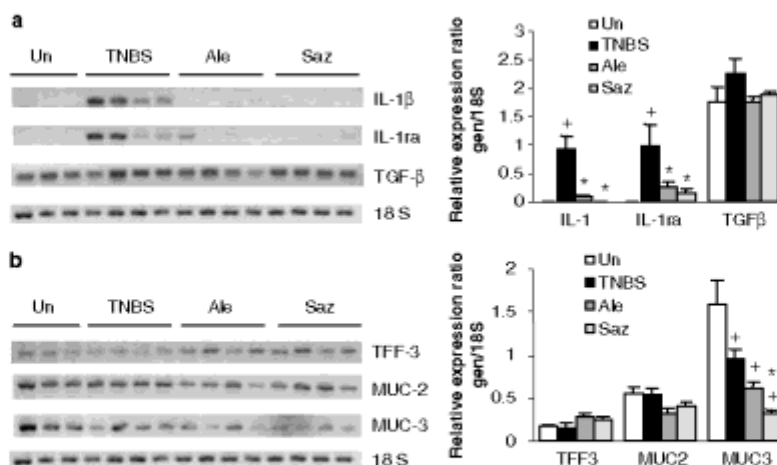


Figure 3 Effect of alendronate on IL-1β, IL-1ra and TGF-β (a), MUC2, MUC3 and TFF-3 (b) mRNA levels in colon specimens. Representative gels (of at least triplicate experiments) and densitometric analysis are shown. Uninflamed: noncolitic group; TNBS: colitic animals treated with vehicle; alendronate: colitic animals treated with alendronate (25 mg kg⁻¹ day⁻¹); sulphasalazine: colitic animals treated with sulphasalazine (500 mg kg⁻¹ day⁻¹). Expression was assessed by semiquantitative RT-PCR and densitometry was performed with the Scion Image software. Bars represent mean ± s.e.m.; *P < 0.05 vs uninflamed group, *P < 0.05 vs TNBS group.

immunohistochemical analysis. Second, to assess the effect of a higher dose of alendronate. Because of the short supply of alendronate available from chemical vendors we decided to use a commercial form, Fosamax, administered as a suspension of the powdered tablets in methylcellulose. This treatment resulted in an increased therapeutic effect on extension of necrosis and damage score (Table 3), while the impact on IL-1 β was similar (Figure 4). There was also a striking reduction in monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Again, the effect of alendronate was similar or even higher than that of sulphasalazine, which failed to ameliorate colonic weight to length ratio or AP sensitivity, parameters that were significantly reduced with Fosamax. COX2 and iNOS protein levels were slightly reduced by both sulphasalazine and Fosamax, as in the first set of experiments (not shown). It should be noted that although the Fosamax excipients could not be added to the reference groups, they are unlikely to be involved in the pharmacological effect, because alendronate was active by itself in the first experiment.

The histological analysis (Figure 5) showed that the majority of the TNBS control animals presented more than 50% of epithelial surface ulceration at the edge of the affected region, generally associated with marked transmural infiltration by inflammatory cells. The infiltrate was composed of neutrophils in the lamina propria, whereas the submucosa and muscle layers presented also eosinophils, lymphocytes and plasma cells. Submucosal and specially muscularis oedema contributed slightly to bowel wall thickening (scored as 1.6 ± 0.3). The histological score was 16.3 ± 3.9 . In the sulphasalazine group there was only focal ulceration or even complete absence thereof, except in two rats, which were comparable to the TNBS group. However, the histological score was not decreased significantly (10.4 ± 3.1). This may be related to the high value assigned to mucosal hyperplasia and goblet cell depletion, which usually precede mucosal healing and thus might be interpreted as signs of tissue recovery. This uneven effect of therapy was also observed in the alendronate group, in which three of six rats exhibited focal or no ulceration and low scores, while the other three rats were similar to those of the TNBS group. As a result the histological score, although lower than the TNBS group (13.7 ± 3.3), was not altered significantly. Both sulphasalazine and alendronate reduced muscularis oedema significantly (0.7 ± 0.3 and 0.7 ± 0.2 respectively, $P < 0.05$ vs. TNBS).

Immunohistochemical analysis revealed that COX2 immunoreactivity was restricted to lymphoplasmacytic cells in all cases, although markedly enhanced by TNBS colitis. Treatment with either alendronate or sulphasalazine resulted in lower COX2 levels. On the other hand, iNOS, which appeared localized mainly to the epithelium and secondarily to the muscle layer, was also increased in TNBS colitic animals, but largely unaffected by both drug treatments.

Effects of intraperitoneally administered alendronate

The aim of this set of experiments was to test the influence of the route of administration in the effect of alendronate. The dose selected was relatively high, considering the low oral bioavailability of this drug (Lin *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 1999). Interestingly, this approach blunted the therapeutic impact of alendronate and actually resulted in a worse clinical outcome, as reflected by the increased body weight loss and extension of necrosis (Table 4). The other parameters examined were not changed.

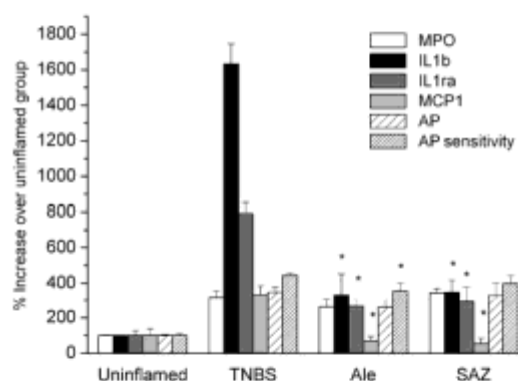


Figure 4 Effect of alendronate (Fosamax) on TNBS colitis. Control values were: $2.6 \pm 0.1 \text{ U g}^{-1}$ tissue (myeloperoxidase; MPO), $83.4 \pm 4.5 \text{ mU mg}^{-1}$ protein (AP), $16.5 \pm 1.9\%$ (AP sensitivity). TNBS: vehicle-treated colitic rats; SAZ: colitic rats treated with sulphasalazine (500 mg kg^{-1}); Ale: colitic rats treated with alendronate (75 mg kg^{-1}). *Different from TNBS group, $P < 0.05$. All means in the TNBS group are significantly different from the control (not shown).

Table 3 Effect of Fosamax (containing alendronate) on macroscopic parameters in rat TNBS colitis

	Colonic weight/length ratio (mg cm^{-1})	Diarrhea score	Extension of necrosis (cm)	Damage score	Body weight gain after 5 days
Uninfamed	65.4 ± 2.2	0	0	0	4.9 ± 0.5
TNBS	$155.0 \pm 14.2^*$	$2.0 \pm 0.4^*$	$3.5 \pm 0.4^*$	$9.4 \pm 0.7^*$	$7.2 \pm 1.5^*$
Alendronate	$125.4 \pm 15.6^{**}$	$1.4 \pm 0.3^*$	$2.1 \pm 0.7^{**}$	$5.5 \pm 1.2^{**}$	$12.0 \pm 1.9^{**}$
Sulphasalazine	$141.5 \pm 5.7^*$	$1.7 \pm 0.2^*$	$3.5 \pm 0.5^*$	$8.8 \pm 0.4^*$	$11.6 \pm 0.8^{**}$

Abbreviations: TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid.

The doses of Fosamax (containing alendronate) and sulphasalazine were 75 and $500 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, respectively. Values are means \pm s.e.m., $n = 7$.

*Different from Control group, $P < 0.05$.

**Different from TNBS group, $P < 0.05$.

Body weight gain is expressed as percentage change from the start of the experiment.

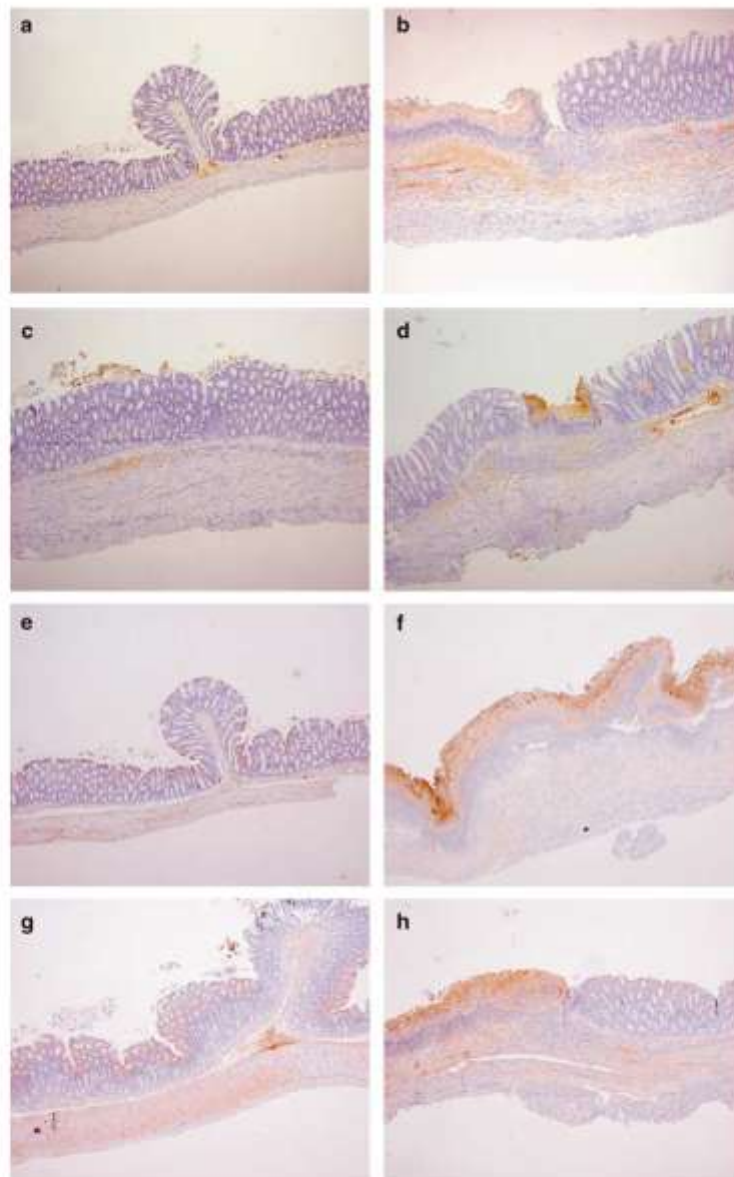


Figure 5 Immunohistochemical analysis of the effect of alendronate (Fosamax) on rat TNBS colitis. A piece of the distal colon was fixed in formaldehyde and stained with antibodies specific for either COX2 (a-d) or iNOS (e-h). The images are representative of the groups of control rats (a, e) and TNBS colitic rats treated with vehicle (b, f), sulphasalazine 500 mg kg⁻¹ (c, g) or alendronate 75 mg kg⁻¹ (d, h). Original magnification: $\times 5$.

Discussion

IBD, comprising Crohn's disease and ulcerative colitis, poses a clear challenge to the biomedical community in terms of both basic and applied research. Thus despite the intense investigative effort dedicated to IBD in the

past few years, a causative factor is yet to be identified. Thus the pharmacological strategies are necessarily empirical and are common to a number of inflammatory disorders. Although these treatments are generally effective, they have significant adverse effects and refractoriness is not infrequent.

Table 4 Effect of intraperitoneally administered alendronate on macroscopic and biochemical parameters in rat TNBS colitis

	Weight to length ratio (mg cm ⁻¹)	Extension of necrosis (cm)	Damage score	Body weight gain after 5 days	MPO (U g ⁻¹)	AP (mU mg protein ⁻¹)
Uninflamed	67.5 ± 2.6	0	0	3.0 ± 0.6	2.6 ± 0.2	53.0 ± 2.7
TNBS	158.8 ± 27.8 ⁺	3.6 ± 0.7 ⁺	7.0 ± 1.6 ⁺	-4.3 ± 3.3 ⁺	40.2 ± 6.7 ⁺	104.6 ± 11.1 ⁺
Alendronate	124.7 ± 6.6 ⁺	4.1 ± 0.3 ⁺⁺	7.0 ± 0.6 ⁺	-16.3 ± 1.4 ⁺⁺	46.8 ± 6.4 ⁺	98.6 ± 7.4 ⁺

Abbreviations: TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid.

The dose of alendronate was 10 mg kg⁻¹ day⁻¹. Values are means ± s.e.m., n = 7.⁺ Different from control group, P < 0.05.⁺⁺ Different from TNBS group, P < 0.05. Body weight gain is expressed as percentage change from the start of the experiment.

On the other hand, IBD is a predisposing factor to osteoporosis, and high rates of reduced bone mineral density are reported in patients with IBD (Bernstein and Leslie, 2005). The risk is increased in the elderly and in underweight patients, as well as in those treated with corticoids, although it should be noted that the overall increase in fractures is relatively low. The approach to fracture prevention in IBD patients should be applied to the patients showing the highest risk and comprises removal of systemic corticoids, supplementation with vitamin D and calcium, weight-bearing exercise and treatment with bisphosphonates (Bernstein and Leslie, 2005). The second-generation (nitrogen containing) bisphosphonates, including alendronate and risedronate, are widely used for the prevention and treatment of osteoporosis and related disorders (Licata, 2005). Alendronate (Haderslev *et al.*, 2000), ibandronate (von Tirpitz *et al.*, 2003) and pamidronate (Bartram *et al.*, 2003) have been employed successfully to increase bone mineral density in IBD.

Although incompletely characterized, the mechanism of action of nitrogen containing bisphosphonates is related to direct inhibition of farnesyl diphosphate synthase in the cholesterol biosynthetic pathway. This results in diminished protein geranylgeranylation, which is essential for the basic cellular processes required for osteoclastic bone resorption (Reszka and Rodan, 2003; Green, 2004; Rogers, 2004; Licata, 2005). In addition, nitrogen containing bisphosphonates may induce osteoclast apoptosis, but this action is not necessary for their inhibition of bone resorption. This mechanism is similar to that of the hypocholesterolemic agents (statins), which inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase but ultimately also reduce protein prenylation (Stancu and Sima, 2001). In fact, this property of statins accounts for the wide spectrum of pharmacological actions ascribed to this drug group, which includes both anti-inflammatory (Shovman *et al.*, 2002) and anti-osteoporotic effects (Yaturu, 2003), although clinical evidence of the latter is still controversial (Koida *et al.*, 2004; Gonyeau, 2005). Pravastatin has been specifically shown to be effective in rat experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (Sasaki *et al.*, 2003). Therefore, bisphosphonates may have beneficial effects in the gut. We selected alendronate for testing in one of the most widely used models of IBD, namely TNBS colitis (Neurath *et al.*, 2000).

Our data demonstrate that alendronate is effective in reducing the severity of the colonic inflammatory reaction, when administered after induction of colitis, as assessed by reduced body weight loss, colonic damage score, IL-1 β , MCP-

1, COX2 and iNOS expression. IL-1 β is one of the predominant cytokines in rat TNBS colitis and it is expressed at higher levels than tumor necrosis factor or interferon- γ , whereas MCP-1 is an important monocyte chemoattractant and activator. Both are increased in IBD (Banks *et al.*, 2003; Ludwiczek *et al.*, 2004). The effects on COX2 and iNOS are comparatively minor and are probably of lesser importance. The biological activity of IL-1 β is in part regulated by the endogenous inhibitor IL-1ra, which specifically inhibits IL-1 activities by binding to IL-1 receptors, but does not display agonist activity (Hawthorne *et al.*, 1992). In the intestinal mucosa, epithelial cells and lamina propria mononuclear cells are the major sources of IL-1ra. An imbalance between the production of IL-1 β and IL-1ra has been described in freshly isolated intestinal mucosal cells and in colonic mucosal biopsies obtained from inflamed intestinal tissue of IBD patients (Vilaseca *et al.*, 1990a). Although upregulation of IL-1ra seems to be an appropriate response to control IL-1-mediated inflammation, this response is not sufficient. A large excess of IL-1ra is required to block the binding of IL-1 to the IL-1 type I receptor (Rask-Madsen *et al.*, 1992).

It should be noted that these effects were attained with a presumably rather low effective dose, because oral bioavailability of alendronate, as with other bisphosphonates, is around 1% only (Lin *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 1999). Thus the amount of alendronate that reaches systemic circulation may be as low as 0.25–0.75 mg kg⁻¹. Previous pharmacokinetic studies indicate that alendronate is preferentially distributed to the bone or cleared by the kidney (Lin *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 1999). It should be noted nonetheless that the dose is relatively high compared with the standard 10 mg used in humans. In an attempt to increase bioavailability, we performed an additional experiment in which alendronate was administered as a post-treatment by the i.p. route with a reduced dose (10 mg kg⁻¹ day⁻¹). This approach did not result in significant anti-inflammatory activity, but instead produced a marked loss of body weight, suggesting toxicity. This clearly suggests that the therapeutic effect of oral alendronate may be owing to a direct effect on the mucosal tissue by the drug as it reaches the colon. This may explain the lack of anti-inflammatory effect observed previously with subcutaneously administered pamidronate in TNBS colitis although still exerting significant effects on the bone (Lin *et al.*, 2000). Thus it appears that low intestinal absorption favors the anti-inflammatory effect of alendronate in the distal region of the intestine, although it is plausible that a higher local uptake would result in an increased therapeutic benefit.

The protective effect of alendronate was comparable to that of sulphasalazine, a standard drug used in IBD treatment (Sands, 2000). Alendronate was better in terms of body weight gain, colonic damage score and COX2 expression, whereas sulphasalazine was the only one that reduced colonic alkaline phosphatase activity, a marker of intestinal inflammation related to both leukocyte infiltration and epithelial phenotypic changes (Sanchez de Medina et al., 2004). Interestingly, both drug treatments tended to increase TFF3 and decrease MUC2 despite the lack of changes brought about by inflammation. The increase in TFF3 might represent a mechanism of anti-inflammatory action, as this peptide has mucosal protective and regenerative properties, which ultimately result in intestinal anti-inflammatory effects (Vandenbroucke et al., 2004; Poulsen et al., 2005). The relatively modest effect of sulphasalazine must be interpreted in terms of the dosing protocol applied, that is post-treatment rather than pre-treatment. It is well known that drug treatments, including sulphasalazine, are generally less effective when given after colitis has been induced than when administered as a preventive measure (Daddaoua et al., 2005). This in turn highlights the positive results obtained with alendronate. As sulphasalazine is considered to act by mechanisms unrelated to farnesyl diphosphate synthase inhibition (Nikolaus et al., 2000), it is conceivable that it may have synergistic effects with alendronate.

In conclusion, we have demonstrated that alendronate is effective in the TNBS model of rat colitis, a widely employed preclinical model of IBD, with an activity comparable to that of sulphasalazine. Our results suggest that IBD patients under risk of osteoporotic fractures could additionally benefit from bisphosphonate therapy. Additional experiments are warranted to establish the mechanistic basis of alendronate effect. On the other hand, pharmacokinetic manipulation might provide more pronounced therapeutic effects of alendronate by increasing access of the colonic mucosa to the drug.

Acknowledgements

We thank the technical assistance of Dr Mercedes González. This study was supported by grants of the Instituto de Investigación Carlos III (PI051651 and PI051625). Olga Martínez Augustin was funded by the Ramón y Cajal program and the I3 program of the Ministry of Education and Science. Isabel Ballester and Rocío López-Posadas are the recipients of fellowships by the Fundación Ramón Areces and the Spanish Ministry of Education and Science, respectively.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

Abeles AM, Pillinger MH (2006). Statins as anti-inflammatory and immunomodulatory agents: a future in rheumatologic therapy? *Arthritis Rheum* 54: 393–407.

- Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N (2003). Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 199: 28–35.
- Bartram SA, Peaston RT, Rawlings DJ, Francis RM, Thompson NP (2003). A randomized controlled trial of calcium with vitamin D, alone or in combination with intravenous pamidronate, for the treatment of low bone mineral density associated with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 1121–1127.
- Bernstein CN, Leslie WD (2005). Therapy insight: Osteoporosis in inflammatory bowel disease – advances and retreats. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2: 232–239.
- Castells A, Paya A, Alenda C, Rodriguez-Moranta F, Agrelo R, Andreu M et al. (2006). Cyclooxygenase 2 expression in colorectal cancer with DNA mismatch repair deficiency. *Clin Cancer Res* 12: 1686–1692.
- Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ (2006). Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol* 6: 307–312.
- Daddaoua A, Puerta V, Zarzuelo A, Suarez MD, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O (2005). Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 135: 1164–1170.
- Gonyeau MJ (2005). Statins and osteoporosis: a clinical review. *Pharmacotherapy* 25: 228–243.
- Green JR (2004). Bisphosphonates: preclinical review. *The Oncologist* 9 (Suppl 4): 3–13.
- Haderslev KV, Tjellesen L, Sorensen HA, Staun M (2000). Alendronate increases lumbar spine bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 119: 639–646.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL et al. (1990). Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343: 336–340.
- Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK et al. (1992). Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* 33: 922–928.
- Koida M, Fukuyama R, Nakamura H (2004). Osteoporosis requires bone-specific statins. *Curr Pharm Des* 10: 2605–2613.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87: 1344–1350.
- Licata AA (2005). Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates. *Ann Pharmacother* 39: 668–677.
- Lin CL, Moniz C, Chow JW (2000). Treatment with fluoride or bisphosphonates prevents bone loss associated with colitis in the rat. *Calcif Tissue Int* 67: 373–377.
- Lin JH, Chen IW, Deluna FA (1994). On the absorption of alendronate in rats. *J Pharm Sci* 83: 1741–1746.
- Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA et al. (2004). Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 138: 323–329.
- Mathoo JM, Cranney A, Papaioannou A, Adachi JD (2004). Rational use of oral bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2: 17–23.
- Monteleone G, Fina D, Caruso R, Pallone F (2006). New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 22: 361–364.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96: 795–803.
- Neurath M, Fuss I, Strober W (2000). TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 19: 51–62.
- Nikolaus S, Folsch U, Schreiber S (2000). Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 47: 71–82.
- Porrás AG, Holland SD, Gertz BJ (1999). Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet* 36: 315–328.
- Poulsen SS, Kissow H, Hare K, Hartmann B, Thim L (2005). Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul Pept* 126: 163–171.

- Rask-Madsen J, Bukhave K, Laursen LS, Lauritsen K (1992). 5-Lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. *Agents Actions* 36 (Suppl 1): C37–C46.
- Reszka AA, Rodan GA (2003). Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporosis Rep* 1: 45–52.
- Rogers MJ (2004). From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 75: 451–461.
- Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A (1996). Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 771–779.
- Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Ballester I, Nieto A, Galvez J *et al.* (2004). Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol* 68: 2317–2326.
- Sands BE (2000). Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118: S68–S82.
- Sasaki M, Bharwani S, Jordan P, Joh T, Manas K, Warren A *et al.* (2003). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor pravastatin reduces disease activity and inflammation in dextran-sulfate induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 78–85.
- Shovman O, Levy Y, Gilburd B, Shoenfeld Y (2002). Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. *Immunol Res* 25: 271–285.
- Siminovich KA (2006). Advances in the molecular dissection of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 18: 244–253.
- Stancu C, Sima A (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5: 378–387.
- Stokkers PC, Van Aken BE, Basoski N, Reitma PH, Tytgat GN, Van Deventer SJ (1998). Five genetic markers in the interleukin 1 family in relation to inflammatory bowel disease. *Gut* 43: 33–39.
- Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J *et al.* (2000). NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1298–G1306.
- Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P (2005). Medical treatment of inflammatory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 443–447.
- Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryneck S, Demetter P, Remaut E *et al.* (2004). Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127: 502–513.
- Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelada JR (1990a). Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 98: 269–277.
- Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR (1990b). Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 31: 539–544.
- Von Tirpitz C, Klaus J, Steinkamp M, Hofbauer LC, Kratzer W, Mason R *et al.* (2003). Therapy of osteoporosis in patients with Crohn's disease: a randomized study comparing sodium fluoride and ibandronate. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 807–816.
- Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Newman ML, Ross PA, Reid RC *et al.* (2005). A potent and selective inhibitor of group IIa secretory phospholipase A2 protects rats from TNBS-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 5: 883–892.
- Yaturu S (2003). Skeletal effects of statins. *Endocr Pract* 9: 315–320.

Genomic analysis of sulfasalazine effect in experimental colitis is consistent primarily with the modulation of NF- κ B but not PPAR- γ signaling

Olga Martínez-Augustín^a, Rocío López-Posadas^b, Raquel González^b,
María Dolores Suárez^a, Antonio Zarzuelo^b and Fermín Sánchez de Medina^b

Objective Sulfasalazine (SAZ) is a widely used drug in inflammatory bowel disease patients but its mechanism of action is incompletely understood. The objective of our study was to further characterize SAZ mechanism by studying its effect on the colonic transcriptome in a suitable preclinical model of inflammatory bowel disease.

Methods The trinitrobenzenesulfonic acid model of colitis in rats was used. The effect of SAZ on mRNA expression was assessed with Affymetrix Rat Expression 230 2.0 arrays used in triplicate (sextuplicate for controls), validated in separate samples with quantitative reverse-time PCR analysis. Some nongenomic experiments were also carried out.

Results SAZ (500 mg/kg) had a marked anti-inflammatory effect as expected, which was correlated with a dramatic impact on colonic gene expression. In addition to immune/inflammatory genes, SAZ responsive genes were involved in distinct metabolic and signaling pathways. The effect of sulfasalazine was generally of normalization of colitis-modulated genes to control levels, with very few exceptions. Postgenomic validation showed an excellent correlation with microarray data and seemed to be slightly more sensitive. SAZ generally modulated the expression of nuclear factor- κ B-driven genes. SAZ was also shown to

inhibit I κ B- α phosphorylation in rat primary splenocytes and in HT29 and IEC18 cells. In contrast, SAZ had only a modest effect on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ -regulated genes and it was confirmed to induce PPAR- γ in enterocytes but not splenocytes.

Conclusion Mechanistically, our data are consistent primarily with nuclear factor- κ B inhibition, and there is little evidence of a prominent role of activation of PPAR- γ receptors or antioxidative actions. *Pharmacogenetics and Genomics* 19:363–372 © 2009 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2009, 19:363–372

Keywords: genomic, inflammatory bowel disease, microarray, nuclear factor- κ B, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, rat, trinitrobenzenesulfonic acid

Departments of ^aBiochemistry and Molecular Biology II and ^bPharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERED), Granada, Spain

Correspondence to Dr Fermín Sánchez de Medina, PhD, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Campus de Cartuja s/n, Granada 18071, Spain
Tel: +34 958 243889; fax: +34 958 248964; e-mail: fsanchez@ugr.es

Received 10 July 2008 Accepted 23 January 2009

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a clinical entity, which comprises two different but related conditions, ulcerative colitis and Crohn's disease. Both feature, chronic and relapsing inflammation of the intestine which is associated with diarrhea, malaise, malnutrition, and overall deterioration of the patient's quality of life. However, there are important differences regarding regional distribution, type of inflammatory response, and histological involvement. The pharmacological treatment is largely empirical, that is, directed unspecifically at the inflammatory response, as the causative factors have not yet been identified and seem to be multifactorial. One of the established drug types in the treatment of IBD are aminosalicylates, which comprise mesalamine (5-aminosalicylic acid or 5-ASA) and its derivatives, including sulfasalazine (SAZ). As mesalamine

is normally absorbed in the small intestine, its therapeutic application in the large intestine requires the use of techniques that prevent absorption and thus grant access to the colonic mucosa. These include special galenic drugs and mesalamine prodrugs such as SAZ. This is composed of mesalamine and the carrier molecule sulfapyridine, bound covalently through an azo bond, which is in turn cleaved by bacterial enzymes in the colonic lumen.

A number of mechanisms have been proposed for SAZ. These include inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, radical scavenging properties, and inhibition of the nuclear factor (NF)- κ B pathway [1–3]. Recently, an additional mechanism, namely activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), has been advocated [4]. However, the precise mechanism whereby

SAZ exerts its therapeutic effect is incompletely understood. Therefore, we have examined the effects of SAZ treatment in the genomic profile of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) rat colitis, a widely used preclinical model of IBD. To this end, we have applied a higher than standard number of microarrays (one microarray per sample, triplicates per group) and validation determinations (95 genes). Some additional nongenomic experiments have been carried out for confirmatory purposes.

Methods

All reagents were obtained from Sigma (Barcelona, Spain) except where indicated. The NF- κ B p65 and p60 and PPAR- γ antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Germany); the phospho-I κ B- α (Ser32) antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Boston, Massachusetts, USA); the JLA20 antibody against actin developed by Dr Lin [5] was obtained from the Development Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences (Iowa City, Iowa, USA).

Animals

Female Wistar rats (175–225 g) were housed in makrolon cages and maintained in air-conditioned animal quarters with a 12-h light–dark cycle. Animals had free access to tap water and were fed with a standard chow diet (Panlab A04, Panlab, Barcelona, Spain). This study was carried out in accordance with the Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes of the European Union (86/609/EEC) and was approved by the Ethics Committee of the University of Granada.

Induction of colitis

Colitis was induced as described earlier [6]. Briefly, rats were fasted overnight and anesthetized with halothane. Under these conditions, rats were given 10 mg of TNBS dissolved in 0.25 ml of 50% ethanol (v/v) by means of a Teflon cannula inserted 8 cm through the anus. Rats were kept in a head-down position for an additional 30 s and returned to their cages.

Experimental design

Rats were randomly assigned to one of three different groups, namely control ($n = 6$), TNBS ($n = 3$), and SAZ ($n = 3$). The TNBS and SAZ groups received the TNBS challenge, whereas the control was administered a saline enema. In addition, rats from the SAZ group were administered 500 mg/kg/day of SAZ in 1% methylcellulose by means of a gastroesophageal catheter, starting 2 days before colitis induction, whereas control and TNBS rats received the vehicle. As SAZ has no substantial effect on the uninflamed intestine and considering the high cost of

genomic analysis, we opted not to add a group of non-colitic rats receiving SAZ. For the purpose of postgenomic validation, this experiment was repeated in order to perform real-time PCR (ReT-PCR) analysis on fresh samples ($n = 3$ –5 per group). These samples were also used for western blot (see below). The magnitude and evolution of the inflammatory response were similar in both cases (not shown). Food and water intake and body weight were determined daily. All animals were killed by cervical dislocation 7 days after colitis induction.

Assessment of colonic damage

Animals were killed by cervical dislocation and the entire colon was removed and placed on an ice-cold plate, cleaned of fat and mesentery, and blotted on filter paper. Each specimen was weighed and its length was measured under a constant load (2 g). The large intestine was longitudinally opened and scored for visible damage on a 0–25 scale as described earlier [7]. A sample for genomic analysis was obtained from the distal colon, taking care to avoid any areas of necrosis. It should be noted that the epithelial layer was not grossly affected by inflammation in this sample, as shown in previous experiments [8]. This is also supported by the fact that the genes specific to enterocytes were not generally altered (Vil, Si, Alpi, Tff3, Lct). The colon was subsequently divided longitudinally into several pieces for biochemical determinations. The fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. Myeloperoxidase activity was measured by a spectrophotometric assay [9].

RNA extraction, microarray hybridization, and data analysis

RNA was extracted from homogenized full-thickness colonic tissues in Trizol reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain) and purified with RNeasy affinity columns (Qiagen, Madrid, Spain). Quantity and integrity of RNA were assessed by spectrophotometry and 0.8% agarose gel electrophoresis, respectively. Sample labeling, hybridization, staining and scanning procedures were carried out using Affymetrix standard protocols (www.affymetrix.com). The microarray analysis was performed by Progenika Biopharma (Bilbao, Spain) on 18 GeneChip Rat Expression Array 230 2.0 microchips (Affymetrix). Normalization and statistical analyses were carried out using GeneSpring v7.1 (Agilent Technologies, Las Rozas, Spain) and the functional analysis and information about biochemical pathways of the well-annotated sequences were achieved using the Ingenuity Pathway Analysis and the GEDI software (<http://www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm>). The data were analyzed by analysis of variance followed by Tukey post-hoc tests and Benjamini and Hochberg correction, a procedure envisaged to reduce false positives. MIAME recommendations [10] were followed to ensure that all information needed to understand, interpret, reproduce, and compare our results was given in detail. The results are generally expressed as

fold change versus controls. In addition, the fold change of gene expression in the SAZ group versus the TNBS group is given in some cases. The data are accessible at the European Bioinformatics Institute Arrayexpress database (<http://www.ebi.ac.uk>, reference E-MEXP-873).

Postgenomic validation was carried out by measuring some of the genes (95) in fresh samples ($n = 3$ per group) using ReT-PCR with TaqMan Low-Density Arrays (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The cycle threshold values were normalized to that of the reference transcript, 18S RNA, and a fold change compared to the control group was calculated.

Western blot

For the detection of phosphorylated I κ B- α , samples (cultured cells or colonic tissue from the in-vivo experiments) were homogenized in lysis buffer (0.1% w/v SDS, 0.1% w/v sodium deoxycholate, 1% v/v Triton X-100 in PBS) with a protease inhibitor cocktail 1:100 (v/v). Then homogenates were sonicated and centrifuged at 7000g for 5 min at 4°C. Protein concentrations in cell homogenates were determined by the bicinchoninic acid assay [11].

Samples were boiled for 5 min in Laemmli buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, electroblotted to PVDF membranes (Millipore, Madrid, Spain), and probed with the corresponding antibodies. The bands were detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). The composition of the Laemmli buffer (5X) was: 312 nmol/l SDS, 50% v/v glycerol, 1% v/v 2-mercaptoethanol, 22.5 mmol/l EDTA trisodium salt, 220 mmol/l Tris, and traces of bromophenol blue (pH = 6.8).

Cell culture and reporter assays

Primary splenocytes were obtained from rats killed by cervical dislocation. Using sterile technique, the spleen was extracted, immersed in culture medium and gently dissected with forceps. The resulting cell suspension was cleared of erythrocytes by density separation in Percoll (GE Healthcare, Madrid, Spain). The cells were washed once and cultured at a cellular density of 10^6 cells/ml with or without concanavalin A (5 μ g/ml). The culture medium was RPMI supplemented with 10% v/v heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain), 100 mg/l streptomycin, 100 000 U/l penicillin, and 2.5 mg/l amphotericin B (plus 0.05 mmol/l 2-mercaptoethanol). IEC18 (ECACC 88011801), HT29 (ECACC 91072201) and CHO (ECACC 85050302) cells were obtained from the Cell Culture Service of the University of Granada and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented as above (except 2-mercaptoethanol). The cells were maintained at 37°C in standard culture conditions. CHO cells were stably transfected by

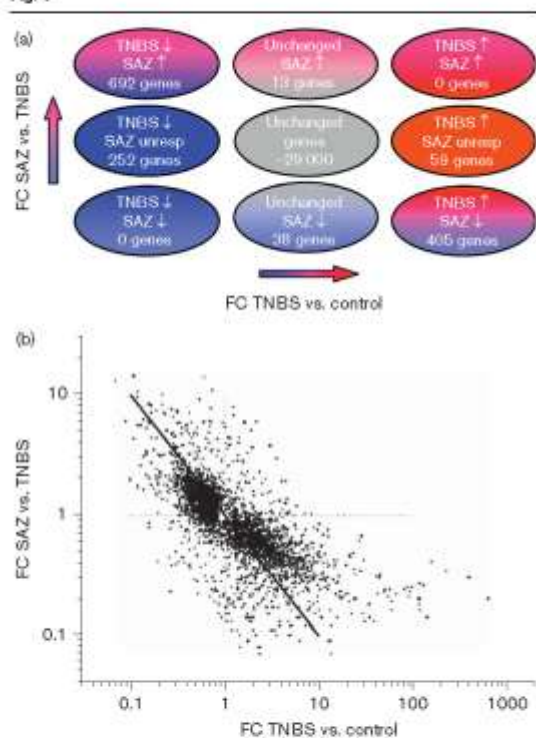
the lipofectamine method with a plasmid encoding secretory alkaline phosphatase (SEAP; reporter) under the control of either an AP-1 or a TATA-like promoter (pTAL; control; Clontech, Palo Alto, California, USA). Transfected cells were selected by G418 (Invitrogen) resistance, which was cotransfected in a separate plasmid. CHO/AP-1-SEAP (and CHO/pTAL-SEAP) cells were cultured in FBS-free medium for 72h and stimulated with 10% FBS and the effect of 5-ASA, SAZ, Bay11-7082 (an inhibitor of I κ B- α phosphorylation), and ciglitazone (a positive control for PPAR- γ activation) was measured. The signal obtained in the control cells was subtracted from that of CHO/AP-1-SEAP cells. IEC18 and in some cases HT29 cells were probed similarly under quiescent or lipopolysaccharide stimulation (1 μ g/ml) conditions and I κ B- α phosphorylation or PPAR- γ expression were measured as an index of NF- κ B and PPAR- γ activation, respectively.

Results

The features of rat TNBS colitis have been reported elsewhere [6,12,13]. Briefly, rats experienced anorexia, diarrhea, and body weight loss, along with bowel wall thickening and ulceration. This was associated with significant leukocyte infiltration, as evidenced by increased myeloperoxidase activity. SAZ treatment was effective in reducing all parameters of inflammation (Supplementary Fig. 1), consistent with its known intestinal anti-inflammatory activity [6,7]. Thus, we proceeded with the genomic analysis. To compare the three different groups, we performed a one-way analysis of variance followed by post-hoc Tukey tests and Benjamini and Hochberg correction. This approach corrects the error associated with multiple comparisons among groups, that is, it is a conservative analysis. The analysis of variance indicated a significant change in 2018 transcripts between the TNBS group and the control (which are referred to as 'inflammation genes'), whereas only 675 genes were significantly different from the control in the SAZ group, consistent with its anti-inflammatory effect. One thousand one hundred and twenty-five genes were differentially expressed in the TNBS and SAZ groups and therefore they were considered as 'SAZ responsive' genes (see below). As we were interested in exploring the mechanistic aspects of the SAZ effect, we also set out to identify 'SAZ unresponsive' genes. We adopted restrictive criteria to classify a gene as unresponsive, which included: (i) being not significantly different from the TNBS group; (ii) being significantly different from the control group (i.e. not normalized); and (iii) having a change in expression lower than 50% of the TNBS group. This yielded 311 genes (see below). Most transcripts could therefore be classified in specific categories according to TNBS or SAZ effect (Fig. 1a).

It is immediately evident in the diagram that there were no genes that were upregulated by TNBS colitis and

Fig. 1



Effect of sulfasalazine (SAZ) on the colonic transcriptome. (a) Two-axis diagram showing the different categories of gene change in relation to the effects of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis and SAZ. (b) Correlation of fold change in gene expression caused by TNBS colitis (x-axis) and fold change (FC) caused by SAZ treatment versus TNBS (y-axis). The diagonal depicts perfect normalization, unresp, unresponders.

further increased by SAZ or vice versa. Most inflammatory genes, and a few noninflammatory (i.e. unchanged by TNBS) transcripts, were affected by SAZ treatment. By far, the general effect of SAZ was a normalization of expression to control levels, either total or partial, that is, the drug reduced the expression of TNBS upregulated genes and vice versa (Fig. 1b). In general terms, the magnitude of the effect of SAZ on gene expression was proportional to the effect of TNBS colitis, and therefore was highly variable, ranging from 8.2-fold (*Aqp8*) to 0.1-fold (*Lilrb3_predicted*). In a few cases, the effect of SAZ seemingly exceeded normalization, but without reaching statistical significance. However, to avoid overlooking subtle but potentially important mechanisms of SAZ, we have included them in Supplementary Table 1 (a cut-off value of $\pm 50\%$ in the fold change was applied). Tables 1 and 2 show a selection of SAZ responsive and unresponsive inflammatory genes, respectively. Some of the genes affected by SAZ treatment were not 'inflammatory' as they

were not affected by TNBS colitis; a selection is shown in Supplementary Table 2.

Next, we carried out an Ingenuity Analysis on the different categories. As we were interested in elucidating mechanistic aspects, we focused on canonical pathways that were significantly modulated by SAZ treatment. The most important were related to metabolism (citrate cycle, glutathione, glyoxylate and dicarboxylate, pyruvate, butanoate and purine metabolism, oxidative phosphorylation), NRF2 oxidative response, PXR/RXR activation, ERK/MAPK, G-protein receptor and apoptosis signaling, and mitochondrial dysfunction (Table 3). Conversely, SAZ unresponsive genes pertain to antigen presentation, interferon signaling, thyroid receptor/RXR and PXR/RXR activation, protein ubiquitination and pyruvate metabolism. As aminosalicilates have been shown to activate PPAR- γ receptors [14], we examined the effects of SAZ treatment on PPAR- γ -regulated genes. Eight of the 10 genes belonging to the citrate cycle pathway, which were modulated by SAZ (as shown in Table 3), are known targets of PPAR- γ . The impact was also high in the pyruvate metabolism pathway (4 out of 6), but relatively weak in most other metabolic routes and virtually all the signaling pathways. Further, of 47 genes listed as primarily PPAR- γ driven in the Ingenuity database (12 of which were affected by inflammation) only five were significantly modified by SAZ. *Pparg* itself was unchanged.

In addition, SAZ changed the expression level of a number of genes that act as markers of inflammatory cells. T cell (*Thy1*, *Terb*, *Terg*, *Zap70*, *Lck*), B cell (*Ptprc* - *B220* -, *Ms4a1* - *Cd20* -, *Cd22*, *Cd79b*), and NK cell (*Baat*, *Ncam1* - *Cd56* -, *B3gat1* - *Cd57* -) markers were not altered by either TNBS colitis or SAZ as a rule. Conversely, several neutrophil/macrophage markers such as *S100a8*, *Itgb2* (*Cd18*), *Cd68_predicted*, *Csf1r*, *Cybb*, *Csf2rb1*, and *Lcn2* were increased by inflammation and normalized totally or partially by SAZ.

An additional set of three to five rats per experimental group was subjected to confirmatory analysis of 95 genes by ReT-PCR. This procedure of independent validation of the results obtained in microarray analysis has become standard in genomic studies, although our use of triplicate measurements is above the standard and perhaps made this step unnecessary. Indeed, there was an excellent correlation between microarray and ReT-PCR data (0.93 regression coefficient, $n=333$, Fig. 2). Amplification was not possible with two genes, namely *Defb1* and *Htr6*. All of the genes that were SAZ responsive in the microarray analysis were confirmed to be so by ReT-PCR. However, about 40% of the transcripts that were initially classified as SAZ unresponsive turned out to be changed by drug treatment in postgenomic analysis (for examples, see Fig. 2). Thus, the number of SAZ

Table 1 Selection of SAZ responsive inflammatory genes in rat TNBS colitis

Gene symbol	Gene name	TNBS	SAZ
Inflammation/immunity genes			
Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	403.40 ± 82.00	119.09 ± 11.47
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	233.18 ± 65.30	79.00 ± 22.56
Sipi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	30.30 ± 3.71	12.58 ± 1.48
Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	26.52 ± 3.80	4.98 ± 0.64
Ch3l1	Chitinase 3 like 1	24.29 ± 5.77	8.38 ± 0.22
Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	12.76 ± 4.30	3.80 ± 0.62
Gm1960	Gene model 1960 [NCBI]	93.20 ± 32.38	19.35 ± 3.89
Ccr1	Macrophage inflammatory protein-1 α-receptor gene	10.61 ± 1.69	3.04 ± 0.29
Il1a	Interleukin 1 α	22.96 ± 9.66	3.52 ± 0.92
Il1b	Interleukin 1 β	88.62 ± 17.58	22.02 ± 4.66
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	2.04 ± 0.28	1.14 ± 0.12
Tlr2	Toll-like receptor 2	17.72 ± 3.48	4.04 ± 0.48
Fcgr1_predicted	Fc receptor, IgG, high affinity I	12.99 ± 2.75	3.43 ± 0.33
Cd68	Cd68	9.11 ± 0.91	2.67 ± 0.34
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIB	2.71 ± 1.16	3.41 ± 0.50
Cybb	Cytochrome b-245, β-polypeptide (Gp91-phox)	7.60 ± 0.74	2.67 ± 0.12
Mnda_predicted	Myeloid cell nuclear differentiation antigen (predicted)	5.53 ± 0.68	2.40 ± 0.59
Lbp	Lipopolysaccharide binding protein	4.84 ± 2.11	1.29 ± 0.64
Nrkbia	Nuclear factor of κ-light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, α	6.34 ± 2.20	1.72 ± 0.03
Alx5ap	Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	2.88 ± 0.62	1.51 ± 0.10
Fcnb	Ficolin B	42.72 ± 11.73	9.60 ± 0.86
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	6.22 ± 1.66	1.94 ± 0.31
Gas	Glutathione synthetase	0.61 ± 0.03	1.03 ± 0.19
Gstm2	Glutathione S-transferase, μ-2	0.54 ± 0.05	0.84 ± 0.03
Gsr	Glutathione reductase	0.55 ± 0.18	0.99 ± 0.12
Gpx3	Glutathione peroxidase 3	1.70 ± 0.29	0.90 ± 0.03
Xdh	Xanthine dehydrogenase	3.41 ± 0.21	1.49 ± 0.12
Sod2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	4.06 ± 0.72	1.67 ± 0.05
Metabolism			
Dld	Dihydropyridine dehydrogenase	0.64 ± 0.04	0.83 ± 0.02
Aco2	Aconitase 2, mitochondrial	0.59 ± 0.06	0.93 ± 0.06
Succla2	Succinate Coenzyme A ligase, ADP-forming, β-subunit (predicted)	0.65 ± 0.05	0.91 ± 0.04
Pc	Pyruvate carboxylase	0.51 ± 0.09	0.87 ± 0.13
Cs	Citrate synthase	0.57 ± 0.03	0.91 ± 0.07
Hmgcr	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0.62 ± 0.01	0.92 ± 0.12
Acy	ATP citrate lyase	0.69 ± 0.03	1.05 ± 0.13
Apoa	Apolipoprotein E	7.22 ± 1.45	2.78 ± 0.62
Arg1	Arginase 1	18.43 ± 10.17	3.85 ± 1.61
Hmox1	Heme oxygenase (decycling) 1	10.41 ± 3.04	5.09 ± 0.98
Signaling			
P2ry6	Pyrimidergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	3.50 ± 0.21	1.70 ± 0.12
Prlr	Prolactin receptor	0.38 ± 0.06	0.81 ± 0.18
Prkar2a	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, α	0.61 ± 0.06	0.93 ± 0.03
Prkag1	Protein kinase, AMP-activated, γ-1 noncatalytic subunit	0.71 ± 0.04	0.97 ± 0.10
Prkcd	Protein kinase C, δ	0.72 ± 0.06	0.93 ± 0.04
Plek	Pleckstrin (predicted)	99.13 ± 42.05	25.13 ± 4.12
Transport			
Slc26a3	Solute carrier family 26, member 3	0.32 ± 0.09	0.69 ± 0.05
Atp1a1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, α-1 polypeptide	0.58 ± 0.06	0.87 ± 0.05
Scn1a	Sodium channel, nonvoltage-gated, type I, α-polypeptide	0.35 ± 0.01	0.68 ± 0.06
Abca1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1	4.24 ± 0.40	1.59 ± 0.92
Aqp3	Aquaporin 3	0.28 ± 0.07	0.79 ± 0.12
Aqp8	Aquaporin 8	0.17 ± 0.04	1.36 ± 0.48
Tissue repair/wound healing			
Cspg2	Chondroitin sulfate proteoglycan 2	11.86 ± 0.51	2.93 ± 0.64
Col1a1	Collagen, type I, α-1	5.87 ± 1.02	1.86 ± 0.36
Col5a3	Collagen, type V, α-3	5.03 ± 0.58	1.86 ± 0.50
Col12a1	Procollagen, type XII, α-1	4.89 ± 1.35	2.13 ± 0.60
Igf1	Insulin-like growth factor 1	3.95 ± 1.18	1.15 ± 0.18
Col6a3	Procollagen, type VI, α-3 (predicted)	1.90 ± 0.07	1.18 ± 0.09
Col5a2	Collagen, type V, α-2	2.51 ± 0.10	1.32 ± 0.14
Col5a1	Collagen, type V, α-1	2.71 ± 0.08	1.27 ± 0.12
Col15a1	Procollagen, type XV (predicted)	3.88 ± 1.26	1.79 ± 0.32
Col4a1	Procollagen, type IV, α-1 (predicted)	4.23 ± 0.79	1.89 ± 0.12
Lox	Lysyl oxidase	8.90 ± 2.34	4.01 ± 1.44
Procol3	Procollagen C-proteinase enhancer protein	4.24 ± 0.50	1.64 ± 0.20
P4ha1	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), α-1 polypeptide	3.50 ± 0.73	1.38 ± 0.11
Tgm1	Transglutaminase 1	145.12 ± 33.7	19.69 ± 4.15
Tgm2	Transglutaminase 2, C polypeptide	2.06 ± 0.38	0.97 ± 0.06
Fn1	Fibronectin 1	2.57 ± 0.35	1.20 ± 0.25
Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	3.28 ± 0.26	1.56 ± 0.05
Mmp14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	3.39 ± 0.43	1.97 ± 0.02

Fold changes versus control are shown. All differences are significant.
SAZ, sulfasalazine; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Table 2 Selection of SAZ unresponsive inflammatory genes in rat TNBS colitis

Gene symbol	Gene name	TNBS	SAZ
Hla-dmb	Major histocompatibility complex, class II, DM β	2.64 ± 0.28	2.13 ± 0.23
RT1-Db1	RT1 class II, locus Db1	2.51 ± 0.51	2.57 ± 0.26
Lrk	Linker of T-cell receptor pathways	2.41 ± 0.30	1.98 ± 0.22
Cd74	Cd74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	2.64 ± 0.40	2.31 ± 0.32
Cd14	Cd14 antigen	2.19 ± 0.59	2.11 ± 0.63
Mir	Macrophage migration inhibitory factor	1.60 ± 0.09	1.39 ± 0.13
Pln	Phospholamban	0.42 ± 0.04	0.50 ± 0.04
Smta_predicted	Smoothelin	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.12
Slc2a4	Glut4	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.08
Tacr2	Tachykinin receptor 2	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.05
Calb2	Calbindin 2	0.32 ± 0.06	0.37 ± 0.21
Tnxa	Tenascin XA	0.32 ± 0.09	0.37 ± 0.03

Fold change versus control are shown. All values are significantly different from the control group. SAZ, sulfasalazine; TNBS, trinitrobenzenesulfonic acid.

Table 3 Canonical pathways modulated significantly by both experimental inflammation and sulfasalazine treatment

Canonical pathways	Gene symbol
Citrate cycle	Acy, Aco2, Cs, Dld, Idh3a, Idh3b, Mdh1, Pc, Stha, Sdhc
Pyruvate metabolism	Acat1, Akr7a3, Dld, Hagh, Mdh1, Pc
Glutathione metabolism	Gsr, Gss, Gstm1, Gstm2, Gsto1, Idh3a
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	Aco2, Cs, Mdh1
Butanoate metabolism	Acat1, Bdh1, Ech1, Stha, Sdhc
Oxidative phosphorylation	Atp6d, Atp6i, Atp6j, Cox7b, Ndufa5, Ndufs6, Sdha, Sdhc
Purine metabolism	Adar, Atp6d, Atp6i, Atp6j, Cam1, Pde4c, Pde7a, Pp1s1, Pp1sap2, Tjp2
Apoptosis signaling	Capn5, Casp2, Casp7, Kras2, Rps6ka1
Mitochondrial dysfunction	Cox7b, Gpd2, Gsr, Ndufa5, Nduf6, Sdha, Sdhc
G-protein receptor signaling	Kras2, P2ry1, Pde4c, Pde7a, Pkag1, Prkar2a, Rasgrp1, Rps6ka1
ERK/MAPK signaling	Ara1, Eif1, Kras2, Flag10, Pkag1, Prkar2a, Prkcd, Rps6ka1
PXR/RXR activation	Abcc3, Gstm1, Gstm2, Pkag1, Prkar2a
Nf2-mediated oxidative stress response	Akr7a3, Dnajc2, Gsr, Gstm1, Gstm2, Gsto1, Kras2, Prkcd

Pathways with high significance values are shown.

unresponsive genes was probably overestimated by the microarray analysis.

As SAZ has been shown to operate on the NF-κB and PPAR-γ pathways, we sought to obtain further non-genomic data on their modulation by SAZ, and the possible effect on another important transcription factor involved in inflammatory responses, AP-1. Figure 3a shows NF-κB p65 and p50 expression levels in the colon of normal and colitic rats with and without SAZ treatment. SAZ reverted the expression changes brought about by experimental colitis. Similarly, SAZ blocked IκB-α phosphorylation in splenocytes, HT29, and IEC18 cells stimulated with concanavalin A and lipopolysaccharide, respectively (Fig. 3b). 5-ASA displayed similar inhibitory effects only in splenocytes. Interestingly, ciglitazone also blocked IκB-α phosphorylation (Fig. 3b). Conversely, none of the treatments had any effect in the CHO/AP-1 reporter experiments (Fig. 3c). In this regard, we also looked at genes identified as AP-1 targets that were affected by TNBS colitis, and found that many of them, such as Spp1, Timp1, Cox2, Rab11a, Cd44, Junb, F3, Egr1, or Fn1, were SAZ sensitive.

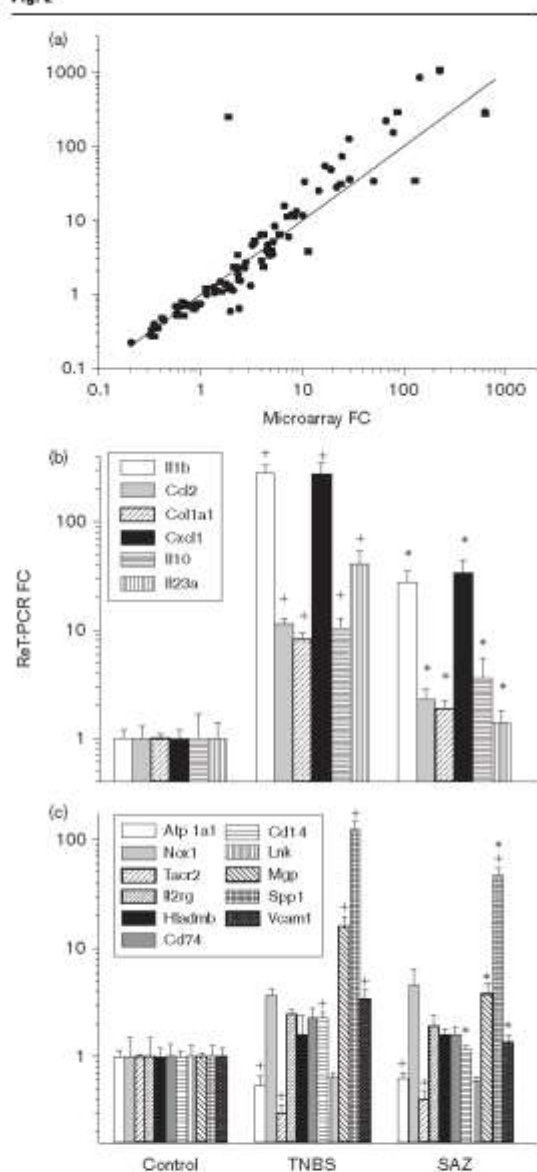
In contrast, ReT-PCR analysis confirmed the lack of significant changes in PPAR-γ expression in TNBS colitis independently of SAZ treatment (Fig. 3d). Finally,

western blot analysis showed that PPAR-γ was clearly induced by both ciglitazone and 5-ASA/SAZ in IEC18 cells, but only by the former in splenocytes.

Discussion

SAZ is used in the treatment of ulcerative colitis attacks and in maintaining remissions, as well as in mild-to-moderate exacerbations of Crohn's disease, although the latter is controversial [15]. Some authors have argued that aminosalicylates (specifically 5-ASA) may be helpful in postsurgical Crohn's disease, but the clinical usefulness of this effect is debatable [16]. In addition, both SAZ and 5-ASA might protect against colorectal cancer in patients with ulcerative colitis, based on observational studies. It is unclear whether this is a specific effect or simply the result of the control of inflammation [15,16], although certain apoptotic actions of mesalamine have been advocated [17,18]. There are no such data for Crohn's disease. Despite the long experience with this agent (around 60 years), the mechanisms responsible for its intestinal anti-inflammatory activity are incompletely understood [19,20]. There are evidences showing its capacity to inhibit cyclooxygenase and lipoxygenase, the NF-κB pathway and cytokine release [interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-12, and tumor necrosis factor-α], IgM and IgG production, activation of PPAR-γ, and its antioxidative activity, although some of these properties might not be

Fig. 2



Postgenomic validation of microarray data. (a) Correlation of data means obtained by microarray (x-axis) and real-time PCR, ReTPCR (y-axis) analysis. The diagonal line depicts perfect correlation. (b) ReTPCR analysis of selection of genes classified as sulfasalazine (SAZ) responsive by microarray data. (c) ReTPCR analysis of a selection of genes classified as SAZ unresponsive by microarray data. * $P < 0.05$ vs. control; * $P < 0.05$ vs. trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). FC, fold change.

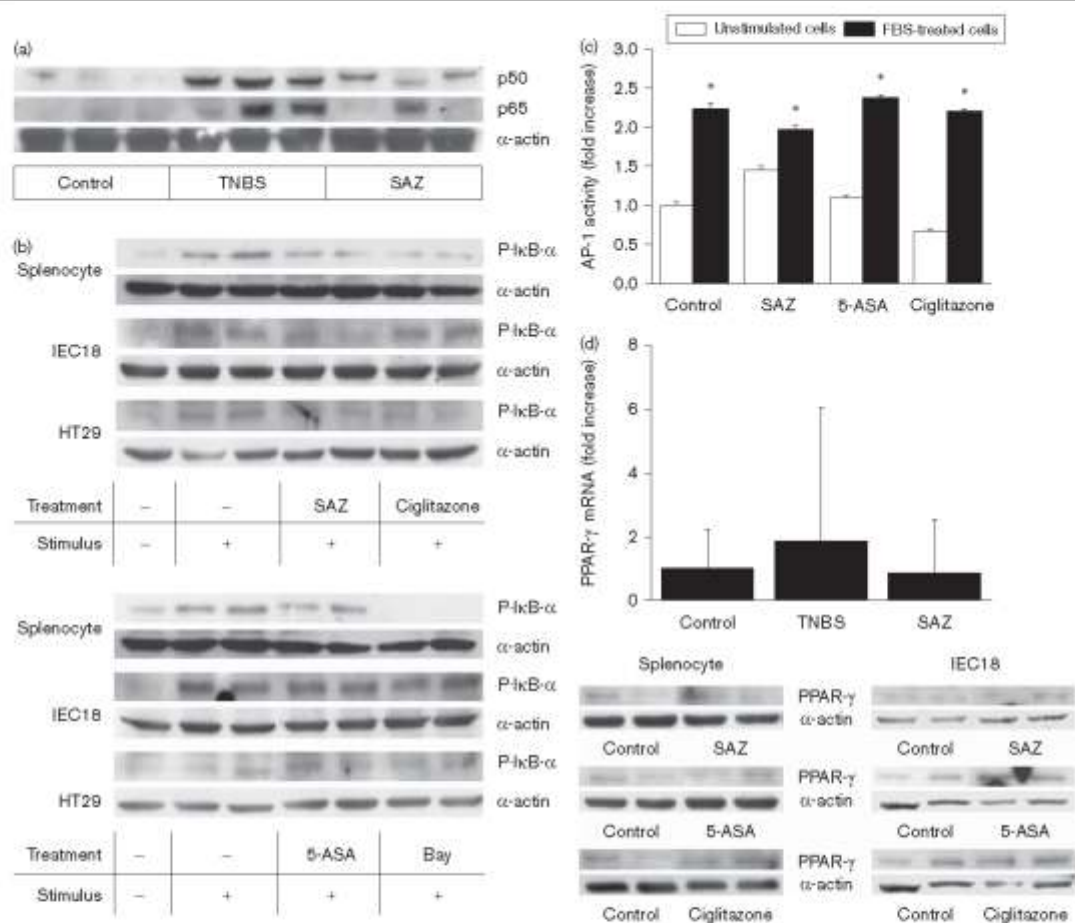
relevant *in vivo* [1,2]. Thus, we further explored the mechanism of SAZ by applying microarray technology to examine its effects in the colonic transcriptome in

a widely used preclinical model of IBD, namely TNBS rat colitis. This model involves the generation of new antigens *in situ*. The immunogenic nature of this model has been unequivocally established by several authors [21,22]. TNBS rat colitis mimics a number of features of IBD, for example, abnormal ion transport, diarrhea, fibrosis, and abnormal intestinal motility. The induced inflammation is transmural, as it is seen in Crohn's disease patients.

TNBS rat colitis is amenable to treatment with a number of drugs used to treat IBD, including SAZ. In our study, this drug had a substantial anti-inflammatory effect at the dose used, thus establishing the basis for the mechanistic analysis. It should be noted that 500 mg/kg is roughly equivalent to 5 g/day in humans based on body surface, which is in the high dose range. The intestinal anti-inflammatory activity of SAZ was comparable with previous observations from our group [6,7,9,23,24]. The therapeutic effect of SAZ translated into a substantial impact on the transcriptome, so that the number of genes altered in expression level by TNBS inflammation was reduced by 65%. Those transcripts that were significantly affected by SAZ tended almost invariably to be normalized, that is, their expression changed in the direction opposite to that caused by inflammation. These not only include various inflammatory genes (including those previously reported to be modulated by SAZ), such as Il1a, Il1b, Cxcl2, Gm1960, Cxcl12, and Tlr2, but also genes involved in other functions, notably metabolism and signaling, according to the Ingenuity Pathway Analysis. SAZ had a striking effect on tissue remodeling and repair genes, a group of genes that is prominently modulated in this model [14] and that is likely related with the fibrotic presentation of rat TNBS colitis. This in turn has a clinical correlate in Crohn's disease. Thus, it is possible that SAZ may have a hitherto unrecognized effect on the fibrotic features of Crohn's disease.

The spectrum of changes observed in the transcriptome after SAZ treatment is not a universal occurrence. For instance, the genomic effect of the experimental intestinal anti-inflammatory agent glycomacropptide is quite different from that of SAZ (manuscript in preparation). The logical question to ask therefore is whether these effects are consistent or not with the mechanisms of action proposed for SAZ, such as NF- κ B inhibition. This transcription factor is pivotal to intestinal inflammation and drives the expression of a large number of proinflammatory genes. Our data indicate that SAZ had a significant effect in many of these, including Il1a, Il1b, Tnf, Il23a, Nfkb1a, Cxcl2, Tlr2, Icam1, Mmp9, or Ccl2, but there were also some NF- κ B target genes that were not apparently affected at the significance level selected ($P < 0.05$), such as Ptgs2, Vcam1, Cxcl1, or A2 m. However, it should be noted that these genes display large differences in expression level between the TNBS and

Fig. 3



Effects of sulfasalazine (SAZ), 5-aminosalicylic acid (5-ASA), and cigtizone on nuclear factor (NF)- κ B, AP-1, and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ). (a) Effect of SAZ treatment on the expression of the NF- κ B p50 and p65 subunits in trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colitis. (b) Effect on I κ B- α phosphorylation (P-I κ B- α) in rat splenocytes and in HT29 and IEC18 cells. (c) Effect on AP-1 driven gene expression in a CHO reporter system. (d) Effect of SAZ treatment on PPAR- γ expression (real-time PCR) in TNBS colitis and of SAZ, 5-ASA, and cigtizone on PPAR- γ expression in rat splenocytes and in IEC18 cells. All results shown correspond to western blot experiments except where indicated. SAZ and 5-ASA were studied at 5 mmol/l and cigtizone at 10 μ mol/l.

SAZ groups, suggesting that discarding them would constitute a type II error or false-negative assumption. For instance, ReT-PCR revealed that Vcam1 and Ptg2 were indeed affected by SAZ. To obtain more direct evidence, we performed additional experiments, which confirmed that SAZ inhibits I κ B- α phosphorylation in splenocytes and in HT29 and IEC18 cells. 5-ASA was not as effective, as it had no effect on enterocytes. The reason for this discrepancy is unknown, but it might be related to effects of the sulfapyridine moiety of SAZ. NF- κ B signaling was also downregulated in TNBS colitis after SAZ treatment. Thus, our data are globally consistent with this proposed mechanism of action.

AP-1 is another important transcription factor involved in inflammatory responses. We therefore examined the effects of aminosaliculates on AP-1 signaling using a surrogate reporter system. Our results do not show a significant effect at this level of either 5-ASA or SAZ under the same conditions associated with activity on the NF- κ B pathway. However, a search of AP-1 target genes in our microarray data did show that a number of transcripts regulated by this transcription factor and affected by inflammation were in fact sensitive to SAZ *in vivo*. Of course, NF- κ B inhibition may account for some of these findings (Cox2, for instance); but on the basis of the present data an action on AP-1 cannot be excluded.

Recently, 5-ASA has been identified as a PPAR- γ ligand, and this has been claimed to account for the intestinal anti-inflammatory effects of aminosalicylates, including SAZ [14]. A systematic review of genes identified as regulated by PPAR- γ showed mixed results, with a pivotal role being played in genes involved in citrate cycle and pyruvate metabolism but a much more modest impact in other pathways. Certainly we could confirm that 5-ASA and SAZ are capable of PPAR- γ induction in IEC18 cells, along with ciglitazone, based on western blot data. However, only the thiazolidindione elicited a similar response in splenocytes. The reason for this difference is unknown, but it may account for the seemingly weak actions of SAZ at this level *in vivo*. Another interesting point to consider is that Pparg expression was itself unchanged *in vivo*, although it is upregulated by PPAR- γ agonists *in vitro* [14]. This suggests that the role of this signaling pathway in the effect of SAZ is insignificant. An alternative explanation is that tumor necrosis factor, which is upregulated in experimental colitis and IBD, dampens the PPAR- γ -activating effects of SAZ by decreasing Pparg expression [25], so that the influences of SAZ and tumor necrosis factor may balance each other. At any rate, it is important to consider that much of the anti-inflammatory effect of PPAR- γ occurs by direct NF- κ B inhibition, as indeed has been observed by other authors [26] and by ourselves (although not at the transcriptional level in our case). Taken together, our data suggest that PPAR- γ activation plays a minor role, if any, in the effect of SAZ *in vivo*.

Another proposed mechanism involves the capacity of SAZ to act as an antioxidant/radical scavenger. Inasmuch as this mechanism is operative, it should have a corresponding impact on colonic gene expression, which in turn must have a correlation with the effects of oxidative stress on the transcriptome. Surprisingly, this area has been poorly explored and we only have been able to find one study describing the effects of selenium deprivation on the mouse jejunum [27]. The genes affected in this study are for the most part different from those altered by either TNBS colitis or SAZ treatment. For instance, oxidative stress downregulated *Fabp1*, *Cyp3a1*, *Rhpn1*, *Ppp1ca*, and *Apoc3* and upregulated *Stat1*, *Adm*, *Pparg*, *Myl1*, and *Cdkn1c*, to name a few, none of which was altered by TNBS colitis. Furthermore, although some of the genes are altered similarly by TNBS colitis and jejunal oxidative stress, the effects of SAZ were not consistent with an antioxidative action. Thus, the expression of *Igf2r* and *Prlr* is changed in both TNBS colitis and jejunal oxidative stress, but only *Prlr* was normalized by SAZ. Thus, our data are not in principle consistent with a major role of SAZ as an antioxidant.

It is also worth noting the qualitative effects of SAZ on the intestinal immune response. SAZ-normalized key inflammatory genes such as *Il1b*, *Tnf*, *Il6*, *Tgfb1*, *Ifng* and

Il23a, while *Il4*, *Il12a*, and *Il12b* were unchanged by either inflammation or SAZ. Taken together, these data not only suggest that the aminosalicylate may down-regulate Th1 cells, which are thought to be involved in TNBS response at least in mice, but they also indicate that Th17 cells might be involved in this colitis model and in the response to SAZ. Although the microarray used does not include *Il17* and the latter was not measured in this study, we have observed that SAZ does normalize TNBS-induced *Il-17* expression in this model (unpublished data), suggesting an action on Th17 cells. In addition, our data also indicate that the ultimate effect of SAZ was a reduction of neutrophil/macrophage infiltration rather than on lymphocyte numbers.

In conclusion, our results are consistent with a mechanism of action of SAZ, which is mainly consistent with inhibition of the NF- κ B pathway. It should be remembered that this is an observational and not an interventional study, and thus it has the limitations typical of its kind, which must be considered when interpreting the data. However, because p65 knockout mice are not viable [28], and p65 is one of the main NF- κ B subunits present in the colon, interventional experiments are difficult to perform *in vivo*. Finally, as our data represent the analysis of the colonic transcriptome 7 days after colitis induction, a single time point, it is possible that earlier effects/mechanisms of SAZ are missed by this approach.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The Pharmacogenetics and Genomics Journal Online* (www.pharmacogeneticsandgenomics.com).

Acknowledgements

This study was supported by the Instituto de Investigación Carlos III (PI051651 and PI051625) and by Fundación Genoma España. The CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III. R.L.P. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministry of Science and Technology, Spain. R.G. is a postdoctoral fellow of CIBEREHD. The group is a member of the Network for Cooperative Research on Membrane Transport Proteins (REIT), cofunded by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and the European Regional Development Fund (Grant BFU2005-24983-E/BFI).

References

- 1 Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2005; **65**:1825–1849.
- 2 Hansaar SB. Review article: aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **20** (Suppl 4):60–65.
- 3 Qureshi AI, Cohen RD. Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? *Adv Drug Deliv Rev* 2005; **57**:281–302.
- 4 Rousseaux C, Lefebvre B, Dubutucq L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005; **201**:1205–1215.
- 5 Lin JJ. Monoclonal antibodies against myofibrillar components of rat skeletal muscle decorate the intermediate filaments of cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**:2335–2339.

- 6 Gonzalez R, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O, Nieto A, Galvez J, Resco S, et al. Anti-inflammatory effect of diosmetin in hapten-induced colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 2004; **141**:951-960.
- 7 Daddaous A, Puerta V, Zarzuelo A, Suarez MD, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O. Bovine glycomacropptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2005; **135**:1164-1170.
- 8 Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzalez R, Lorente MD, Galvez J, et al. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: role of the enteric nervous system and cAMP. *PLoS Arch* 2002; **444**:378-388.
- 9 Ballester I, Daddaous A, Lopez-Posadas R, Nieto A, Suarez MD, Zarzuelo A, et al. The bisphosphonate alendronate improves the damage associated with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Br J Pharmacol* 2007; **151**:206-216.
- 10 Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; **29**:365-371.
- 11 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallis AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; **150**:76-85.
- 12 Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercetin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **278**:771-779.
- 13 Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; **268**:G622-G630.
- 14 Martinez-Augustin O, Merlos M, Zarzuelo A, Suarez MD, Sanchez de Medina F. Disturbances in metabolic, transport and structural genes in experimental colitis inflammation in the rat: a longitudinal genomic analysis. *BMC Genomics* 2008; **9**:490.
- 15 Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; **369**:1641-1657.
- 16 Nielsen OH, Munk LK. Drug insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; **4**:160-170.
- 17 Schwab M, Royndars V, Loitsch S, Shastri YM, Steinhilber D, Schroder O, et al. PPAR gamma is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; **29**:1407-1414.
- 18 Acis GC, Pazienza P, Rosina F. Mesalazine for inflammatory bowel disease: recent reappraisals. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; **7**:1-5.
- 19 Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid-new evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24** (Suppl 1):2-9.
- 20 Watkinson G. Sulphasalazine: a review of 40 years' experience. *Drugs* 1986; **32** (Suppl 1):1-11.
- 21 Palmen MJ, Dieleman LA, van der Ende MB, Uytendaele A, Pena AS, Meuwissen SG, et al. Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 1995; **99**:226-232.
- 22 Beck PL, Morris GP, Wade AW, Sczwarczak M, Wallace JL. Immunological manipulation of disease progression in a rat model of chronic inflammatory disease of the colon. In: MacDermott RP, editor. *Inflammatory bowel disease: current status and future approach*. Amsterdam: Elsevier Science; 1988. pp. 201-206.
- 23 Daddaous A, Puerta V, Requena P, Martinez-Ferez A, Guadix E, de Medina FS, et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2006; **136**:672-676.
- 24 Daddaous A, Martinez-Plata E, Lopez-Posadas R, Vieites JM, Gonzalez M, Requena P, et al. Active hexose correlated compound acts as a probiotic and is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2007; **137**:1222-1228.
- 25 Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H. Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **286**:G722-G729.
- 26 Wahi W. A gut feeling of the PXR, PPAR and NF-kappaB connection. *J Intern Med* 2006; **263**:613-619.
- 27 Rao L, Puschner B, Prolla TA. Gene expression profiling of low selenium status in the mouse intestine: transcriptional activation of genes linked to DNA damage, cell cycle control and oxidative stress. *J Nutr* 2001; **131**:3175-3181.
- 28 Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995; **376**:167-170.