

**IMPACTO PATOGENICO DEL ESTRÉS
OXIDATIVO Y REGULACIÓN
ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS
MONONUCLEARES INMUNES EN LA
ENFERMEDAD DE CROHN**

DEPARTAMENT DE FISIOLÒGIA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Tesis de Marisa Iborra Colomino
2013

Dirigida por:

Dra. Belén Beltrán Niclós

Dra. Pilar Nos Mateu

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departament de Fisiologia



**IMPACTO PATOGENICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y REGULACIÓN
ANTIOXIDANTE DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES INMUNES EN LA
ENFERMEDAD DE CROHN**

Esta Tesis Doctoral fue presentada por Marisa Iborra Colomino en Valencia en 2013 delante de un tribunal formado por:

Federico Pallardó (Presidente)

Maria Esteve

Fernando Gomollón

Directoras de tesis:

D^a Belén Beltrán Niclós

D^a Pilar Nos Mateu

Agradecimientos

La realización de esta tesis ha requerido mucho esfuerzo por parte de la autora y las directoras de la misma, pero además ha habido muchas personas que me han ayudado y que sin ellas no la habría podido realizar. Todas las personas a las que le estoy muy agradecida son las que a continuación voy a citar:

Con todo mi cariño, gracias a:

D^a Belén Beltrán Niclós, por introducirme en el mundo de la investigación básica y haber compartido conmigo sus grandes conocimientos, y por haber sido mi hermana mayor, siempre aconsejándome, guiándome y animándome. A ella debo mi interés por la investigación básica.

D^a Pilar Nos Mateu, por todo lo que me ha aportado y me ha enseñado profesional y personalmente y por los buenos momentos que he pasado con ella en la consulta mientras estaba haciendo esta tesis. A ella debo mi interés y vocación por el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal.

D^a Inés Moret Tatay y D^o Francisco Rausell Palamós por toda la paciencia que han tenido conmigo para enseñarme muchas de las cosas que sé y por su ayuda para llevar a cabo este trabajo, sin ellos no lo hubiese podido conseguir. También le quiero agradecer a Luís Tortosa todo el interés que ha mostrado, su buen carácter con los pacientes y su capacidad para controlarles.

A todos mis compañeros médicos que siempre me han apoyado y ayudado, entre ellos y en especial a Juan Ortuño (mi Dr Juan) por estar siempre a mi lado y enseñarme a dar importancia a lo verdaderamente importante. También a todos mis compañeros de endoscopias por el interés que han puesto en la recogida de muestras y seguimiento de los pacientes.

A D^o Federico Pallardó Calatayud porque me abrió las puertas en su laboratorio donde aprendí mucho, por su cordialidad y por sus útiles consejos.

A D^o José Luís García por la paciencia que siempre ha tenido, por su amabilidad y su apoyo incondicional, y a todos los de su grupo especialmente a Ana, Amparo, Isa, Fabián y Gema, por haberme recibido con tanto cariño, por ayudarme siempre y haber compartido conmigo tan buenos y especiales momentos.

A todos mis pacientes afectos de enfermedad de Crohn y voluntarios sanos que confiaron incondicionalmente en mí y decidieron participar en este proyecto. Sin ellos no hubiese sido posible. Muchas gracias.

Y finalmente a mi familia por estar siempre conmigo animándome y cuidándome y, en especial a Quique a quien conocí gracias al mundo de la investigación, que me ha ayudado y enseñado muchísimo profesional y personalmente. Quique, gracias por la paciencia que has tenido conmigo, por acompañarme y animarme siempre durante todo este largo periodo.

Abreviaturas utilizadas:

| | |
|--|----------------|
| 2´7´-diclorofluoresceína _____ | DCFH |
| 4,5-diaminofluoresceína diacetato _____ | DAF-2/DA |
| 8-hidroxi-2´-desoxiguanosina _____ | 8-oxo-dG |
| Ácido desoxirribonucleico _____ | ADN |
| Ácido ribonucleico _____ | ARN |
| Ácido ribonucleico mensajero _____ | ARNm |
| Ácido tiobarbitúrico _____ | TBA |
| Antiinflamatorios no esteroideos _____ | AINE |
| Apoptosis signal-regulating kinase 1 _____ | ASK |
| ATP-binding cassette sub-family B1 _____ | ABCB1 |
| Catalasa _____ | CAT |
| Células mononucleares de sangre periférica _____ | CMSP |
| Colitis ulcerosa _____ | CU |
| Complejo mayor de histocompatibilidad _____ | HLA |
| Cromatografía líquida de alta resolución _____ | HPLC |
| Enfermedad de Crohn _____ | EC |
| Enfermedad inflamatoria intestinal _____ | EII |
| Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas _____ | ELISA |
| Enzimas antioxidantes _____ | EAO |
| Especies reactivas de oxígeno _____ | ERO |
| Especies reactivas de nitrógeno _____ | ERN |
| Factor de Necrosis Tumoral alfa _____ | TNF- α |
| Factor de Transcripción Nuclear Kappa B _____ | NF- κ B |
| Fas-receptor _____ | FASR |
| Fas-ligando _____ | FASLG |
| Ficoeritrina-Texas rojo _____ | ECD |
| Ficoeritrina unida a cianina-5 fluorescente _____ | PE/CY5 |
| <i>Genome-wide association studies</i> _____ | GWAS |
| Glutación Peroxidasa _____ | GPx |
| Hidroetidio _____ | HE |
| <i>Immunity-related guanosine triphosphatase M</i> _____ | IRGM |
| Interleucinas/Interleuquinas _____ | IL |

| | |
|--|-------------------------------|
| Interleucina-23 receptor | IL-23R |
| Interferón gamma | IFN- γ |
| Isotiocianato de fluoresceína | FITC |
| <i>Leucine-rich repeat kinase 2</i> | LRRK2 |
| Malondialdehido | MDA |
| Microlitro | μ l |
| <i>Mycobacterium avium</i> subespecie paratuberculosis | MAP |
| Mililitro | ml |
| <i>Mycobacterium avium</i> subespecie paratuberculosis | MAP |
| Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato | NADPH |
| N-(2-hidroexietil) pipoeracina-N'-(2-ácido etanosulfónico) | HEPES |
| Nitric oxide synthase 2A | NOS2A |
| Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells | NFKB1 |
| Óxido Nítrico | NO |
| Peptidylprolyl isomerase D | PPID |
| Peróxido de Hidrógeno | H ₂ O ₂ |
| Peroxinitrito | ONOO ⁻ |
| Polimorfismo de un solo nucleótido | SNP |
| Potencial de membrana mitocondrial | $\Delta\psi$ m |
| Plumbagina | Pb |
| Protein kinasa C gamma | PKC γ |
| Protein kinasa C zeta | PKC ζ |
| Proteína C reactiva | PCR |
| Radicales libres de oxígeno | RLO |
| Radical Hidroxilo | HO [•] |
| Revoluciones por minuto | rpm |
| Serine/threonine-protein kinase H1 | PSKH1 |
| Signal Transducer and Activator of Transcription 1 | STAT1 |
| Superóxido | O ₂ ⁻ |
| Superóxido Dismutasa Cobre/Zinc | SOD-Cu/Zn |
| Superóxido Dismutasa Manganese | SOD-Mn |
| Superóxido Dismutasa Extracelular | SOD-EC |
| Telomerasa reversa transcriptasa | TERT |

T-butir-hidroperóxido _____ TBH
Tetrametilrodamina metil éster _____ TMRM
Toll-like receptors _____ TLR
Xantina Deshidrogenasa _____ XDH
Xantina Oxidasa _____ XO

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal

2.1.1 Conceptos generales

2.1.2 Factores etiopatogénicos

2.1.2.1 Factores genéticos

2.1.2.2 Factor inmunológico: respuesta inmune, TNF- α y apoptosis

2.1.2.3 Permeabilidad intestinal y ambiente

2.2 Radicales libres

2.2.1 Concepto

2.2.2 Clases de Especies Reactivas de Oxígeno

2.2.2.1.2 Radical hidroxilo

2.2.2.1.3 Óxido nítrico

2.2.2.2 Especies Reactivas del Oxígeno no radicales

2.2.2.2.1 Peróxido de hidrógeno

2.2.3 Origen de las Especies Reactivas de Oxígeno

2.2.3.1 Fuentes endógenas

2.2.3.1.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial

2.2.3.1.2 Las células fagocitarias

2.2.3.1.3 Sistema xantina oxidasa

2.2.3.1.4 Sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico

2.2.3.1.5 Peroxisomas

2.2.3.1.6 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

2.2.3.1.7 Otras enzimas y moléculas

2.2.3.2 Fuentes exógenas

2.3 Defensas antioxidantes

2.3.1 Sistema antioxidante no enzimático

2.3.2 Sistema antioxidante enzimático

2.3.2.1 Superóxido dismutasa

2.3.2.2 Catalasa

2.3.2.3 Glutación peroxidasa

2.4 Estrés oxidativo

2.4.1 Concepto

2.4.2 Índices de estrés oxidativo

2.4.2.1 Daño oxidativo a lípidos

2.4.2.2 Daño oxidativo a proteínas

2.4.2.3 Daño oxidativo al ADN

2.5 Estrés oxidativo y enfermedad inflamatoria intestinal

2.5.1 Evidencia de estrés oxidativo en la EII

2.5.2 Especies reactivas de oxígeno

2.5.3 Situación de las defensas antioxidantes

2.5.4 Fuentes de especies reactivas de oxígeno

2.6 Apoptosis y enfermedad inflamatoria intestinal

3. OBJETIVOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Selección de pacientes y voluntarios sanos

4.1.1 Criterios de inclusión

4.1.2 Criterios de exclusión

4.1.3 Grupos experimentales

4.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

4.3 Cuantificación de los niveles de superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico y medida del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo

- 4.3.1 Contaje y marcaje de células para el citómetro
- 4.3.2 Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno en monocitos y linfocitos
 - 4.3.2.1 Producción basal y estimulada de superóxido
 - 4.3.2.2 Producción basal y estimulada de peróxido de hidrógeno
 - 4.3.2.3 Producción de óxido nítrico
- 4.3.3 Niveles del potencial de membrana mitocondrial

4.4 Medida del daño oxidativo por HPLC

- 4.4.1 Determinación de los niveles de malondialdehido
 - 4.4.1.1 Fundamento de la técnica
 - 4.4.1.2 Protocolo
- 4.4.2 Determinación de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
 - 4.4.2.1 Fundamento de la técnica
 - 4.4.2.2 Protocolo

4.5 Niveles de ARNm de TNF- α

- 4.5.1 Aislamiento de ARN/ADN
- 4.5.2 Cuantificación de los niveles de ARNm

4.6 Cuantificación de la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes

- 4.6.1 Estudio de la actividad superóxido dismutasa
 - 4.6.1.1 Fundamento
 - 4.6.1.2 Actividad SOD global
 - 4.6.1.2.1 Principios del procedimiento
 - 4.6.1.2.2 Reactivos
 - 4.6.1.2.3 Protocolo
 - 4.6.1.2.4 Cálculos
 - 4.6.1.3 Actividad SOD-Cu/Zn y SOD-Mn
 - 4.6.1.3.1 Principios del procedimiento

4.6.1.3.2 Preparación de muestras

4.6.1.3.3 Preparación de reactivos

4.6.1.3.4 Protocolo

4.6.1.3.5 Cálculos

4.6.2 Estudio de la actividad catalasa

4.6.2.1 Fundamento

4.6.2.2 Principio de la reacción

4.6.2.3 Procedimiento

4.6.2.4 Cálculos

4.6.3 Estudio de la actividad glutatión peroxidasa

4.6.3.1 Fundamento

4.6.3.2 Principios del procedimiento

4.6.3.3 Procedimiento

4.6.3.4 Cálculos

4.7 Estudio de la concentración de proteínas por Método Lowry

4.8 Estudio de la expresión de las enzimas antioxidantes por western blotting

4.8.1 Preparación de muestras

4.8.1.1 Lisis de eritrocitos

4.8.1.2 Lisis de serie blanca

4.8.2 Técnica de Western Blot

4.8.2.1 Fundamento de la técnica

4.8.2.2 Metodología

4.8.2.2.1 Preparación del gel de poliacrilamida y separación de las proteínas por electroforesis

4.8.2.2.2 Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

4.8.2.2.3 Bloqueo o incubación con el/los anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés

4.8.2.2.4 Bloqueo o incubación con anticuerpos secundarios que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores

4.8.2.2.5 Revelado de la membrana

4.8.2.2.6 Densitometrado

4.8.2.2.7 Preparación de tampones

4.9 Análisis estadístico

4.10 Extracción ARN de leucocitos en fresco

4.11 Cuantificación de ARNm por Espectrometría de Masas Sequenom

4.11.1 Fundamento

4.11.2 Transcripción Reversa (RT-PCR)

4.11.3 PCR en tiempo real y preparación de los productos obtenidos

4.11.4 Obtención del espectro de masas y normalización estadística de las medidas

4.11.5 Diseño de las sondas Mass ARRAY

4.11.6 Análisis estadístico

4.12 Mapeado fino (SNPs)

4.12.1 SNPs escogidos

4.12.2 Extracción del ADN de linfocitos

4.12.3 Genotipado

4.12.4 Análisis estadístico

4.13 Manipulación farmacológica de la enzima catalasa y medida de la apoptosis

4.13.1 Purificación y activación de linfocitos

4.13.2 Inducción de la apoptosis en linfocitos

4.13.3 Inhibición farmacológica de la catalasa

5. RESULTADOS

5.1 Características de los pacientes y voluntarios sanos

5.2 Producción del superóxido

5.3 Producción del peróxido de hidrógeno

5.4 Producción de óxido nítrico

- 5.5 Potencial de membrana mitocondrial
- 5.6 Concentración de malondialdehído
- 5.7 Concentración de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
- 5.8 Determinación del TNF- α
- 5.9 Análisis del enzima superóxido dismutasa
 - 5.9.1 Actividad
 - 5.9.2 Expresión génica
 - 5.9.3 Cuantificación
 - 5.9.4 SNPs SOD
- 5.10 Análisis del enzima catalasa
 - 5.10.1 Actividad
 - 5.10.2 Expresión génica
 - 5.10.3 Cuantificación
 - 5.10.4 SNPs CAT
- 5.11 Análisis del enzima glutatión peroxidasa
 - 5.11.1 Actividad
 - 5.11.2 Cuantificación
- 5.12 Expresión génica de otras moléculas relacionadas con el estrés oxidativo, apoptosis, moléculas de señalización intracelular y telomerasa
 - 5.12.1 Genes relacionados con el estrés oxidativo: NOS2A, PKCgamma, PKCzeta
 - 5.12.2 Genes relacionados con la apoptosis: FASR, FASLG, STAT1, NFKB1, ASK
 - 5.12.3 Genes de moléculas de señalización intracelular: PSKH1, PPID, ABCB1, IL-2, IL23R
 - 5.12.4 Genes de telomerasa: TERT
- 5.13 Impacto de la manipulación farmacológica de la catalasa sobre la apoptosis

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

9. DOCUMENTOS ADJUNTOS

1. INTRODUCCIÓN

El término de **enfermedad inflamatoria intestinal** (EII) se utiliza para denominar a un grupo de enfermedades crónicas del tracto digestivo que tienen en común cursar como un proceso inflamatorio crónico. La inflamación se desarrolla en forma de brotes con períodos de actividad (durante los cuales el grado de inflamación aumenta y se agudiza) y de remisión, siendo imprevisible el número, la periodicidad y la gravedad de éstos. Además, asocian manifestaciones extradigestivas muy diversas y frecuentes complicaciones (abscesos, fístulas, estenosis...). Actualmente, se engloban dos entidades dentro de este grupo: la **colitis ulcerosa** (CU) y la **enfermedad de Crohn** (EC). Algunos autores incluyen una tercera entidad denominada **colitis indeterminada**, debido a que, en algunos casos es muy difícil hacer el diagnóstico diferencial entre las anteriores.

Aunque la EC y la CU presentan manifestaciones clínicas similares, existen claras diferencias en cuanto a la distribución de las lesiones, forma de presentación, tratamiento e incluso en la prevalencia, de forma que se han podido definir una serie de características que permiten considerarlas como entidades independientes. Así, la CU afecta sólo a la mucosa del colon, la lesión se inicia en el recto (sólo excepcionalmente queda exento) y puede alcanzar una extensión variable de forma proximal y continua hasta el ciego. Por el contrario, la EC es una inflamación crónica transmural que puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, con determinados patrones clínicos que cursan con una distribución segmentaria a lo largo del intestino. Su carácter transmural y cicatricial explica el desarrollo frecuente de fístulas y estenosis.

En la actualidad tenemos un conocimiento limitado acerca de la etiopatogenia de la EII. Existen varias teorías que tratan de explicarlo, pero ninguna de ellas ha llegado a ser demostrada plenamente. Además se considera probable la implicación de factores desencadenantes ambientales de naturaleza aún no determinada (tabaco, infecciones, componentes de la dieta, etc.). La hipótesis más aceptada es que en la mucosa intestinal de pacientes genéticamente predispuestos, se inicia y se perpetúa una compleja respuesta inmunitaria frente a antígenos lumenales, exagerada e incontrolada, que involucra tanto a la inmunidad innata como a la adquirida. Esta respuesta se mantiene

fundamentalmente por linfocitos T y se refleja más allá de la mucosa intestinal, lo cual explica la naturaleza sistémica de la enfermedad.

Según los diferentes estudios existen 3 pilares fundamentales que actúan en la etiología de la EII: (i) la genética, (ii) el factor ambiente/barrera local y (iii) el factor inmune. Sin embargo, la fisiopatología primaria de la enfermedad sigue bajo estudio y el papel de cada elemento de la cascada inflamatoria en la génesis o la perpetuación de la inflamación intestinal está por dilucidar.

La evidencia de la influencia genética en la patogenia de la EII deriva de estudios en gemelos. El primer gen de susceptibilidad relacionado con la EC fue NOD2/CARD15 que está situado en el cromosoma 16. Esta mutación se observa hasta en un 15-20% de pacientes con EC pero también en un pequeño porcentaje de la población general, lo cual nos indica que la mutación no es suficiente para el desarrollo de la EC, por tanto mutaciones de este gen confieren una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad. Las proteínas NOD2/CARD15, que se expresan en monocitos, macrófagos, células de Paneth y células epiteliales, intervienen en el reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos (quizás mediante la regulación del factor de transcripción nuclear NFκB), en la activación de la respuesta inmunitaria innata y en el control de la apoptosis celular. Así pues, cambios en la estructura de la proteína NOD2/CARD15 podrían conllevar una activación anómala del sistema inmune que dirige una respuesta inflamatoria alterada mantenida a nivel del tubo digestivo la cual sería la responsable final de las lesiones que provocan la sintomatología.

Recientemente, la microflora intestinal se ha identificado como un importante factor ambiental que influye en el desarrollo de la EC. Dos hipótesis intentan explicarlo. La primera se basa en que la EII está causada por una anormal respuesta inmunológica frente a la microflora intestinal normal producida por alteraciones en el sistema inmune innato de la mucosa. La segunda hipótesis se centra en cambios anómalos en la composición de la microflora intestinal. Por ambas vías se produce una respuesta inmune excesiva que desemboca en una inflamación de la mucosa intestinal.

Diferentes líneas de investigación indican que alteraciones de la barrera epitelial pueden perpetuar la inflamación crónica intestinal. En este sentido, en la EC se han documentado alteraciones de las *tight junctions* o uniones intercelulares que condicionan un aumento de la permeabilidad intestinal lo cual facilita el contacto con antígenos luminales y bacterias. Este hecho predispone a una excesiva respuesta frente a antígenos, con una continua estimulación inmunológica y finalmente a la inflamación crónica de la mucosa. Además se ha observado este aumento de la permeabilidad intestinal en los familiares de primer grado de pacientes con EC y previo a la aparición de un brote, lo que sugiere que se trate de un fenómeno inicial en el proceso patogénico.

En la lámina propia de la mucosa intestinal de los pacientes con EII existe una respuesta inmune alterada. Clásicamente los estudios se han centrado en la población linfocitaria predominante, los linfocitos T CD4+ con un fenotipo Th1 en la EC cuyas citoquinas implicadas son fundamentalmente la Interleuquina (IL)-2, IL-12, Interferón- γ (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), considerada una citoquina fundamental. Existe consenso de que estos linfocitos de la lámina propia de los pacientes con EC presentan una resistencia a la apoptosis perpetuando así la respuesta inflamatoria a nivel intestinal.

Respecto al TNF- α diversos estudios indican que su concentración está aumentada en el suero y en las heces de los enfermos con EC y que, además, la mucosa intestinal de estos pacientes contiene muchas células que liberan o expresan TNF- α . Asimismo es indiscutible que el uso y disponibilidad de un agente anti-TNF (infiximab) ha ofrecido un importante avance en el tratamiento de la EII, incluso no estando del todo aclarado el mecanismo de acción del fármaco. Se ha demostrado que el tratamiento con infliximab en estos pacientes induce un incremento de la apoptosis de linfocitos T de la lámina propia lo cual, se refleja también en sangre periférica, donde las células inmunitarias aumentan su índice apoptótico.

Existen ya múltiples estudios al respecto que evidencian una posible implicación del estrés oxidativo en la patogenia de la EII. Todos estos estudios

apuntan a que parece existir un daño por estrés oxidativo y una disminución de las defensas antioxidantes en la mucosa intestinal y en sangre periférica de los pacientes con EII. Sin embargo, no está bien caracterizado el origen de las especies reactivas de oxígeno (ERO), los radicales responsable del daño oxidativo, el estado concreto del conjunto de las defensas antioxidantes y tampoco se ha analizado si el estrés oxidativo aparecía o se exacerbaba con el brote clínico de la enfermedad o por el contrario estaba presente de forma continua en los pacientes con EII.

El presente trabajo se basa en la caracterización de la inmunidad adquirida, de la función mitocondrial y del origen y elementos generadores y reguladores del estrés oxidativo en las células mononucleares de sangre periférica, así como su implicación en la regulación de la capacidad apoptótica de los linfocitos T CD4+ implicados clásicamente en la etiopatogenia de la EC.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1) ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.1.1 Conceptos generales.

La denominación de enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EII) engloba un conjunto de trastornos inflamatorios del intestino, unos de etiología conocida (infecciosa, química, física o por sensibilidad inmunológica específica) y otros en los que no se ha logrado evidenciar un factor causal. En este último grupo, denominado de etiología no filiada, inespecífico o idiopático se incluyen una serie de entidades clínicas siendo las principales la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC).

La EII es una enfermedad muy prevalente, cuya incidencia anual va en aumento en las últimas décadas. Si bien la etiología de la EC, al igual que la de la CU, permanece desconocida. Hoy se considera que ambas se producen en personas genéticamente predispuestas que, al exponerse a determinados agentes o antígenos ambientales, o ante cambios en la propia flora intestinal comensal, desarrollan una respuesta inmune anómala, exagerada y prolongada en el tiempo, que es la responsable última de la inflamación del tubo digestivo (Podolsky, 2002).

Ambas enfermedades se caracterizan por la cronicidad y por la heterogeneidad en su forma de presentación, curso clínico, pronóstico y desarrollo de complicaciones. Durante su evolución, se alternan períodos de actividad (recidiva o brotes), de variable intensidad o gravedad, con períodos de quiescencia o inactividad (remisión). La fundamental diferencia entre la CU y la EC es que en la primera se afecta sólo el colon y la capa mucosa. Sin embargo, la EC es un trastorno inflamatorio crónico que puede afectar cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, de forma focal, segmentaria, asimétrica y discontinua. El proceso inflamatorio es transmural y puede afectar todas las capas del intestino, con la consiguiente aparición de fisuras, fístulas o abscesos.

La primera referencia de la EC se sitúa en el siglo XVII por el investigador Giovanni Battista Morgagni, aunque el nombre le fue otorgado en 1932 por

Burrill Bernard Crohn, un gastroenterólogo de Nueva York responsable de describir la enfermedad (Crohn *et al.*, 1984).

En los últimos años se ha experimentado un cambio en determinados aspectos epidemiológicos de la EII, con un aumento de la incidencia en todos los países desarrollados, especialmente notable para la EC. Este aumento en la incidencia a lo largo de los años se ha atribuido a diversos factores, aunque obviamente, en gran parte ha sido debido a la mejora de las técnicas diagnósticas y metodología de los estudios. Sin embargo, parece que existe un aumento real de la incidencia relacionado con la mejora socio-cultural de las poblaciones, los cambios en el nivel de vida y en los hábitos dietéticos, la industrialización, la mejora del tratamiento de las aguas y la higiene, en lo que se ha denominado “teoría de la higiene” (Moum *et al.*, 2002).

La incidencia actual de EC se estima de entre 10-15 casos por 100000 habitantes y año (Binder, 2004; Molodecky *et al.*, 2012). Los datos de Europa indican que existe un gradiente norte-sur, tanto de incidencia como de prevalencia, con unas mayores tasas de EII en el norte de Europa y más bajas en el sur, sugiriendo que la enfermedad se distribuye de forma paralela al nivel socio-económico de los países.

Afecta principalmente a individuos de raza blanca, sobre todo la etnia judía y los originarios de Europa central y del este, con una menor prevalencia entre afroamericanos e hispanos y mínima en asiáticos (Mayberry *et al.*, 1984). Los distintos estudios realizados en España determinan una incidencia para la EC de entre 2 y 7.5 casos por 100.000 habitantes y año (Pajares *et al.*, 2001; Saro Gismera *et al.*, 2003). Existe un descenso progresivo de la incidencia con la edad, con un pico máximo entre los 15-34 años y un segundo pico más pequeño entre los 45-64 años, sin grandes diferencias entre ambos sexos (Brullet *et al.*, 1998).

2.1.2 Factores etiopatogénicos

Aunque la EII es muy prevalente e incidente, su etiología y patogenia siguen siendo desconocidas. La hipótesis más aceptada es que la enfermedad acontece en sujetos genéticamente predispuestos como resultado de la

interacción entre estímulos antigénicos externos y el propio sistema inmune. Puesto que la enfermedad se acompaña de una considerable infiltración de células inflamatorias en la mucosa intestinal, principalmente macrófagos, neutrófilos y linfocitos, se ha sugerido que el proceso inflamatorio es el resultado de una activación inadecuada y perpetuada del sistema inmune de la mucosa intestinal desencadenada por un factor intraluminal, posiblemente un componente de la propia flora intestinal (Naser *et al.*, 2012; Packey *et al.*, 2008; Podolsky, 2002; Xavier *et al.*, 2007). Sin embargo, el mecanismo concreto que conduce al daño de la mucosa sigue sin conocerse completamente.

2.1.2.1 Factores genéticos

Aunque la mayoría de los casos de EC son esporádicos, la existencia de una notable agregación familiar ya sugiere claramente la existencia de una predisposición genética. Hasta hace poco tiempo, estos condicionantes genéticos de la EII en general, demostrados con más fuerza en la EC que en la CU, derivaban de datos indirectos provenientes de estudios de epidemiología genética (estudios llevados a cabo en gemelos homo y dicigóticos y estudios de vinculación genética). Actualmente, existen numerosas líneas de investigación e identificación de los determinantes genéticos que puedan estar involucrados en el inicio y desarrollo de la EII.

Estudios de población han demostrado que el factor genético contribuye en la patogenia de la EII. Estos estudios han comprobado que la genética aumenta el riesgo de padecer EC o CU de 8 a 10 veces (Orholm *et al.*, 1991), que judíos Ashenazi tienen más riesgo (Lowe *et al.*, 2009) y que existe una concordancia importante entre gemelos (Brant, 2011). En general, para la EC los gemelos monocigotos tienen una mayor concordancia de enfermedad (>30.3 %) que los gemelos dicigotos (3.6-7 %). Mientras que en la CU el grado de concordancia es menor, tanto en gemelos mono como dicigotos (10-15.4 % y >3%, respectivamente), lo que sugiere una menor influencia de los factores genéticos para el desarrollo de esta enfermedad (Brant, 2011; Thompson *et al.*, 1996). El mayor grado de concordancia para los gemelos monocigotos tanto para la EC como para la CU, indica la fuerte contribución de los factores genéticos. Sin

embargo, es evidente que se requieren otros factores ambientales para que se manifieste la EII.

Los estudios familiares también han mostrado una asociación familiar importante; del 5.5-22.5 % de los pacientes con EII tienen algún otro familiar también afectado por la enfermedad (Hanauer, 2006). El mayor riesgo ocurre en los familiares de primer grado de un paciente con EC, éstos tienen un riesgo 3 a 20 veces mayor de padecer la enfermedad que la población general. Así, aproximadamente un 5-10 % de estos familiares van a desarrollar la enfermedad; el riesgo es mayor en los hijos (1.3-8.8 %) y hermanos (1.5-8.9 %) de los pacientes que en los padres (0.2-3.5 %) (Colombel *et al.*, 1996; Heyman *et al.*, 2005). Este riesgo se multiplica por 60 en las denominadas “familias de alto riesgo”, aquellas que presentan más de un familiar afecto y en las que hasta un 30% de los familiares de los pacientes pueden desarrollarla. La incidencia de EC también está aumentada, aunque menos, en familiares de segundo e incluso tercer grado (<1 %) (Heyman *et al.*, 2005; Lashner *et al.*, 1986)

Los estudios epidemiológicos en familias con múltiples miembros afectados de EII muestran una elevada concordancia con el tipo de enfermedad (EC o CU), con la localización (86%) e incluso con el patrón de comportamiento (82%) (Annese *et al.*, 2001; Dorn *et al.*, 2004; Peeters *et al.*, 1996). Sin embargo, existen estudios que hacen referencia a la anticipación genética o aparición del primer brote de enfermedad en los hijos a una edad más temprana, lo cual podría ser debido al incremento en éstos de la sospecha diagnóstica (Picco *et al.*, 2001).

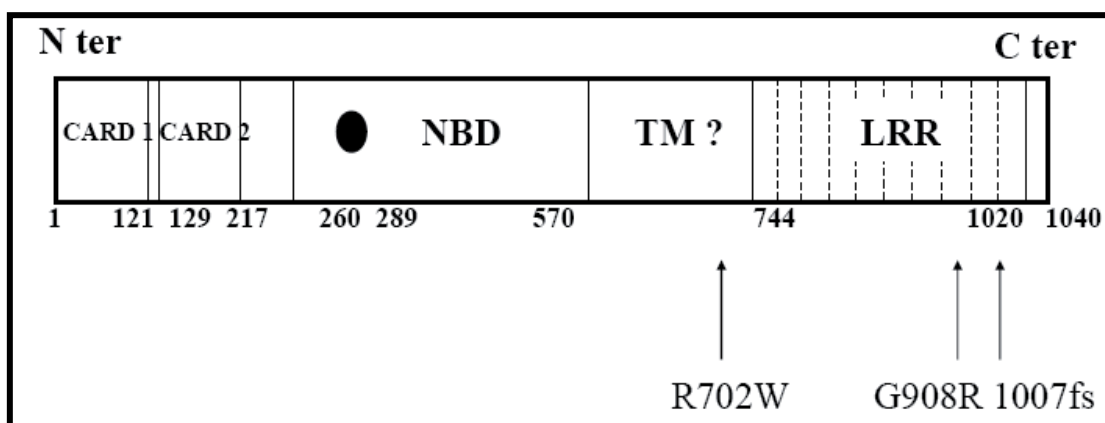
Diversos estudios de correlación genética han identificado un importante número de regiones (o locus) generadoras de susceptibilidad para la EII localizadas en los cromosomas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 y X. Sólo siete locus de susceptibilidad (denominados IBD1-IBD7) cumplen criterios de reproducibilidad en estudios independientes (Barmada *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 1998; Duerr *et al.*, 2000; Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001; Satsangi *et al.*, 1996; Vermeire *et al.*, 2004). Ningún locus ha sido detectado de forma constante en todos los estudios, lo cual sugiere la existencia de una heterogeneidad genética. La presencia de estos genes mutados no garantiza

que se vaya a desarrollar una EII, sino que se hereda la predisposición a tenerla, con un mayor riesgo de padecer las formas más agresivas de EC (estenosantes o fistulizantes); de esta forma, tener un familiar afecto de EC sólo es un factor de riesgo más.

Entre los factores genéticos relacionados con la EC se sabe que, al menos en un subgrupo de pacientes, existe una importante relación con el gen NOD2/CARD15 (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a). Este gen de susceptibilidad para la EC, conocido inicialmente como NOD2, se denomina actualmente CARD15 (Caspase-Recruitment-Domain-15) y está localizado en la región pericentromérica del cromosoma 16 (16q12); se ha identificado como el gen IBD1. Justifica solamente un 20% de la predisposición genética a padecer EC y no se asocia con un incremento de susceptibilidad para la CU (Ogura *et al.*, 2001a).

La estructura básica de la proteína sintetizada por este gen se divide en tres regiones (Figura 2.1) (Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001):

Figura 2.1. Esquema de la proteína sintetizada por NOD2/CARD15.



- **CARD** o dominio de activación y reclutamiento de caspasas: región amino terminal con dos dominios N-terminales, implicados en la activación de caspasas. Este dominio ha dado nombre al gen y a su proteína.
- **NBD** o dominio de unión a nucleótidos: región central.
- **LRR**: región C-terminal con diez secuencias repetidas ricas en leucina, implicadas en el reconocimiento de patógenos extracelulares, de forma similar a los dominios extracelulares de los receptores de membrana celular toll-like.

El gen NOD2/CARD15 se expresa en las células presentadoras de antígenos, macrófagos y linfocitos, así como en las células epiteliales, fibroblastos y células de Paneth. Es un gen implicado en la respuesta inmune innata frente al lipopolisacárido de las bacterias. Codifica una proteína implicada en el reconocimiento del dipéptido derivado de la mureína del peptidoglicano de bacterias gram negativas y positivas.

Existen estudios donde se ha observado que otras proteínas reguladoras de apoptosis, que son miembros de la familia de proteínas CARD, funcionan activando la vía de señalización del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), lo cual sugiere una posible relación entre el factor genético en la EC y la regulación de la apoptosis (Ogura *et al.*, 2001b). Asimismo, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), citoquina fundamental en la enfermedad tiene un efecto directo sobre el gen CARD15 induciendo su expresión (Hisamatsu *et al.*, 2003).

En el gen NOD2/CARD15 se han identificado aproximadamente 60 variantes genéticas, siendo sólo 3 de ellas las más frecuentemente asociadas con la susceptibilidad a padecer EC (Ahmad *et al.*, 2002; Cuthbert *et al.*, 2002; Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001a). Estas tres mutaciones consisten en polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), es decir, una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base, adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G), de una secuencia del genoma.

- Arg702Trp (también denominada R702W o SNP8 o rs2066844)

- Gly908Arg (G908R o SNP12 o rs2066845)
- Leu1007fsinsC (L1007fs o SNP13 o rs41450053)

Los tres polimorfismos se encuentran localizados en la región C terminal del dominio LRR y son responsables de más del 80% de los alelos mutados, siendo poco probable que la contribución de las restantes variantes sea significativa al estar presentes en un escaso número de individuos.

Los estudios realizados, generalmente en poblaciones de raza blanca, indican que del 30 al 40% de los pacientes son heterocigotos para una de las tres mutaciones. Entre el 3-15 % son homocigotos o heterocigotos compuestos (dos mutaciones diferentes, una en cada cromosoma), en comparación con la población de controles sanos, en la que el 7-12 % son heterocigotos y el 0-1 % homocigotos. También se ha observado que la frecuencia de las mutaciones es diferente según la localización de la EC, siendo del 26.9% cuando es ileal pura, 19.7% en caso de ileocolitis y 12.7% en colónica (Cuthbert *et al.*, 2002).

Se estima la existencia de un riesgo medio relativo de desarrollar EC en portadores de una mutación de 2-3 veces mayor y hasta 20-40 veces superior en el caso de dos mutaciones simultáneas (heterocigoto compuesto u homocigoto), lo que sugiere un efecto de dosis génica para las tres mutaciones (Hampe *et al.*, 2001). En la población europea el riesgo de EC aumenta más de 17 veces cuando el sujeto es homocigoto para la mutación NOD2 (Economou *et al.*, 2004), sin embargo esto no ocurre en otras áreas geográficas como en Asia y en África subsahariana (Dassopoulos *et al.*; Inoue *et al.*, 2002). La penetrancia es reducida, menos del 10% de los pacientes portadores de dos alelos de riesgo NOD2/CARD15 desarrollará la enfermedad, ello implica que otros genes y estímulos medioambientales están también implicados en el desarrollo de la misma.

Los estudios iniciales observaron que las mutaciones en el gen NOD2/CARD 15 se asociaban con diferentes factores de la EC como la edad temprana de aparición de la enfermedad, la localización ileal así como la tendencia a desarrollar patrones más agresivos de evolución (estenosantes-fistulizantes) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Factores de la Senfermedad asociados a mutaciones en NOD2/CARD15.

| Factores asociados: | |
|---|--|
| Localización ileal | (Buning <i>et al.</i> , 2004; Economou <i>et al.</i> , 2004) |
| Patrón estenosante y fistulizante | (Abreu <i>et al.</i> , 2002; Helio <i>et al.</i> , 2003; Vermeire <i>et al.</i> , 2005) |
| Presentación temprana de la enfermedad | (Ahmad <i>et al.</i> , 2002; Buning <i>et al.</i> , 2004; Helio <i>et al.</i> , 2003; Lesage <i>et al.</i> , 2002) |
| Familiares de pacientes portadores de mutaciones | (Economou <i>et al.</i> , 2004; Helio <i>et al.</i> , 2003) |
| Cirugía previa, sobre todo resección ileocecal | (Ahmad <i>et al.</i> , 2002; Buning <i>et al.</i> , 2004; Helio <i>et al.</i> , 2003; Radlmayr <i>et al.</i> , 2002) |
| Mayor riesgo de reintervenciones | (Alvarez-Lobos <i>et al.</i> , 2005; Buning <i>et al.</i> , 2004) |
| Factores no asociados: | |
| Manifestaciones extraintestinales | (Ahmad <i>et al.</i> , 2002) |
| Hábito tabáquico | (Ahmad <i>et al.</i> , 2002; McGovern <i>et al.</i> , 2005) |
| Uso de 5-ASA, esteroides, metronidazol o inmunosupresores | (Helio <i>et al.</i> , 2003) |

El desencadenamiento de la respuesta inmune frente a componentes bacterianos está mediado por receptores de reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos tales como los *Toll-like receptors* (TLR) y el NOD. Se ha observado que el polimorfismo Asp299Gly de lipopolisacáridos del TLR4 se asocia a un aumento de susceptibilidad a infecciones por Gram negativos. Este polimorfismo se ha asociado a un aumento del riesgo de EC y CU (12% y 10% respecto al 5% en los controles). Si se asocian ambos polimorfismos, TLR4 y NOD2, el riesgo relativo es de 4.7 en comparación con un riesgo relativo de 2.6 y 2.5 para TLR4 y variantes NOD2 por separado (Franchimont *et al.*, 2004). Estos hallazgos apoyan la idea de la influencia genética de los receptores de reconocimiento de bacterias en el inicio de la EC.

En la EC, tras la descripción de este primer gen de susceptibilidad, el NOD2/CARD15 (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a) y los estudios poblacionales, se han identificado numerosos genes mediante los denominados estudios genómicos de asociación (*genome-wide association studies* o GWAS), los cuales han supuesto un gran avance en el conocimiento de los factores genéticos de la EC. Estos estudios son muy completos, se han realizado con análisis bioinformáticos muy sofisticados y han permitido conocer un número cada vez mayor de genes asociados a la EII, así como profundizar en aspectos de su naturaleza poligénica y de su patogenia. Estos estudios se empezaron a realizar sólo en pacientes con EC y a partir de los resultados obtenidos se iniciaron estudios en CU.

Un meta-análisis publicado recientemente con 6 estudios GWAS en la EC analiza los datos de más de 6300 casos y 15000 controles e identifica 30 nuevos genes de susceptibilidad que incluyen SMAD3, ERAP2, Interleuquina (IL)-10, IL-2RA, TYK2, FUT2, DNMT3A, DENND1B, BACH2 y TAGAP entre otros (Franke *et al.*, 2010). Hasta la fecha, se han encontrado unas 100 regiones (*locus*) o genes de susceptibilidad para la EII, 71 asociados con la EC y 47 con la CU (Lees *et al.*, 2011). Aproximadamente una tercera parte de los *locus* de susceptibilidad descritos están asociados tanto a la CU como a la EC (IL23R, IL18RAP, IL12/p40, JAK2 y STAT3 entre otras); 21 son específicos de la CU (IL10, IL22, IL26, Interferón- γ (IFN- γ), etc.) y 23 de la EC (NOD2, GCKR, ATG16L1, etc.) (Thompson *et al.*, 2011).

Gracias a los estudios GWAS se han podido analizar miles de SNPs, con datos relevantes que permiten profundizar en mecanismos patogénicos y potenciales dianas terapéuticas. Entre estos nuevos descubrimientos destacan la importancia de los mecanismos de autofagia, el reconocimiento de receptores que interactúan en la respuesta inmune innata y la respuesta Th17/IL23 (Cho *et al.*, 2011; Lees *et al.*, 2011).

La autofagia o autodigestión celular es un proceso de eliminación y regeneración celular fundamental que permite eliminar determinadas proteínas y orgánulos (Mizushima *et al.*, 2008; Naser *et al.*, 2012). Se ha relacionado con la proliferación y diferenciación celular, la respuesta inmune frente a patógenos

y como una herramienta que permite a la célula obtener energía permitiendo su supervivencia en condiciones adversas. La autofagia aumenta la supervivencia celular en estados de privación de nutrientes o de factores de crecimiento y de estrés del retículo endoplasmático, así como de infecciones (Cho *et al.*, 2011; Lees *et al.*, 2011; Levine *et al.*, 2007). Es importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células T de la respuesta inmune innata, claves del establecimiento de la tolerancia de la barrera mucosa intestinal. Las interrelaciones entre la autofagia, que funciona primariamente como mecanismo de supervivencia celular, y la apoptosis, que es una ruta que conduce inevitablemente a la muerte celular, son complejas. Los dos mecanismos son regulados por factores comunes, comparten componentes e interactúan entre sí. Muchas señales de activación de apoptosis inducen también autofagia y existen señales que inhiben ambos procesos. Hasta ahora los intrincados mecanismos moleculares entre ambos están por dilucidar.

En lo referente a los genes que regulan la autofagia en la EC, recientemente, se ha asociado un gen que codifica para una proteína implicada en la autofagia ATG16L1 (*autophagy-related 16-like 1*) (Levine *et al.*, 2007; Naser *et al.*, 2012). Esta proteína se expresa en los linfocitos, macrófagos y en las células de Paneth del intestino delgado donde se produce la exocitosis o eliminación de los gránulos de secreción que contienen péptidos antimicrobianos (Cadwell *et al.*, 2008). La sustitución Thr300Ala en ATG16L1 (rs2241880) ha sido asociada con la EC. No existen diferencias en los niveles de expresión de proteína ATG16L1 en la mucosa de pacientes con EC vs controles sanos, con lo que se asume que esta mutación confiere una alteración únicamente en la función de la proteína. Estudios experimentales demuestran que esta alteración se relaciona con una anormal respuesta de las células de Paneth frente a patógenos, una respuesta exagerada frente a agresiones y un aumento de la susceptibilidad de lesiones ileales (Cadwell *et al.*, 2010). En este sentido se ha demostrado un vínculo funcional entre NOD2 y ATG16L1, ambas se consideran proteínas de inducción de autofagia y están codificadas por genes que aumentan el riesgo de EC (Cooney *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010). La activación de NOD2 por el muramil dipéptido de lipopolisacáridos bacterianos desencadena la formación de vacuolas autofágicas en las células dendríticas y

epiteliales, para lo que se requiere el contacto directo de NOD2 con ATG16L1. En los pacientes con EC asociada a mutaciones en NOD2 y en ATG16L1 no existe este mecanismo de eliminación por autofagia de patógenos intracelulares, lo cual apoya la idea de la autofagia como posible mecanismo desencadenante de la EC.

Otro mecanismo que relaciona estrechamente a la autofagia y la inmunidad innata es la respuesta al desplegamiento de proteínas inducida por estrés en el retículo endoplasmático producido por el acumulo de proteínas no plegadas o mal plegadas (Fritz *et al.*, 2011). Recientemente estudios GWAS han encontrado una relación genética entre este mecanismo y la EC a través de los genes XBP1 y ORMDL3 los cuales participan en esta respuesta (Barrett *et al.*, 2008; Kaser *et al.*, 2011).

Estudios GWAS han relacionado a la EC con otros genes codificantes de proteínas reguladoras de la autofagia como la IRGM (*immunity-related guanosine triphosphatase M*) y la LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) (Barrett *et al.*, 2008; Leshed *et al.*, 2010; Parkes *et al.*, 2007). IRGM es una proteína estimuladora de la autofagia que se requiere durante la fase de inicio. El polimorfismo del gen IRGM rs13361189 produce una delección de 20 kb que se ha relacionado simultáneamente con la reducción de la expresión de este gen y con la EC (McCarroll *et al.*, 2008). Esta proteína participa en la eliminación de patógenos intracelulares por autofagia mediada por INF- γ (Leshed *et al.*, 2010). Respecto a la LRRK2 se conoce que está localizada en el cromosoma 12q12 y que su deficiencia provoca en la célula un deterioro de los autofagosomas y un incremento de la apoptosis, la respuesta inflamatoria y el daño oxidativo (Skipper *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2010)

Los estudios GWAS han establecido una fuerte correlación entre los genes que regulan la vía de la IL-23 y el desarrollo de la EC (Wang *et al.*, 2009). Entre los múltiples genes que se encuentran involucrados en la señalización IL23/Th17 se encuentran el receptor de IL-23, IL-12B, JAK2, Tyk2 y STAT3 (Lees *et al.*, 2011). La variante asociada de forma más significativa con la EC, después del NOD, codifica el cambio de Arg381Gln en el gen del receptor de la IL-23, localizado en el cromosoma 1p31. La glutamina 381, presente hasta en un 14% de la población sana, protege frente a la EII, reduce 3 veces el riesgo de EC

ileal y un poco menos en la CU. Este polimorfismo en el receptor de IL-23 se ha asociado también con la psoriasis (Nair *et al.*, 2009) y la espondilitis anquilosante (Burton *et al.*, 2007). En este sentido, recientemente se ha aprobado para el tratamiento de la psoriasis el uso de anticuerpos contra la IL-23 y la IL-12B (subunidad p40) (Krueger *et al.*, 2007). El uso de estos anticuerpos ha mostrado en estudios preliminares su potencial utilidad para el tratamiento de la EC (Mannon *et al.*, 2004).

Finalmente, existen estudios genéticos focalizados en el conocimiento de posibles moléculas de señalización celular que pueden estar implicadas en la patogenia de la enfermedad. El objetivo de estos estudios es establecer si existen diferencias en los niveles de expresión (cantidad de ARNm) de estos genes y/o mutaciones, lo cual nos proporciona información sobre posibles rutas implicadas en la patogenia de la enfermedad así como posibles dianas terapéuticas. En este sentido, el STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription1) implicado en la respuesta de fase aguda, es un gen incluido dentro de los genes inducibles por IFN γ (interferón gamma) y produce la activación de la vía TH1 mediada por IFN γ , IL12 e IL23 (Niessner *et al.*, 1995). En este grupo se incluyen también STAT3 y otras proteínas transmembrana IFN inducibles, IFITM1 y IFITM3, que actúan en la activación de macrófagos. Además del IFN, existen otras citoquinas que pueden activar el STAT1 como factores de crecimiento epidermal, factores de crecimiento derivados de plaquetas, la IL-6 o el factor 1 estimulador de colonias (Zhong *et al.*, 1994; Gerhartz *et al.*, 1996; Vignais *et al.*, 1996). La activación específica de STAT1 ha sido demostrada en enfermedades inflamatorias crónicas como el asma (Sampath *et al.*, 1999) y la artritis reumatoide (Yokota *et al.*, 2001), así como en la EII. Un estudio realizado por Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2007) en biopsias de mucosa de pacientes con EC y CU encontró diferencias en los patrones de expresión de los genes inducibles por IFN γ y sólo en la EC se observó una expresión génica aumentada de STAT1 respecto a los controles sanos. Sin embargo, existe un estudio que encontró un aumento de la expresión y activación de STAT1 en la mucosa intestinal tanto en los pacientes con CU como en los pacientes con EC, aunque en estos últimos en menor medida (Schreiber *et al.*, 2002).

La ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1) es una proteína de transporte intra y extra-celular, vinculada a ATP, que codifica para la “multidrug-resistance p-glycoprotein 170”, lo cual confiere multiresistencia a fármacos. Estudios recientes han descrito el papel de esta proteína en la disminución de la acumulación de fármacos en células y su implicación en el desarrollo de resistencias a fármacos en diferentes tipos de cáncer (Caronia *et al.*, 2011; Krech *et al.*, 2012; Tucker *et al.*, 2012). La identificación de una asociación entre polimorfismos de ABCB1/MDR1 y un aumento de susceptibilidad para desarrollar EII, ha generado un interés creciente en el estudio de esta proteína y su papel en la EII (Brant *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2003). Se ha reportado una disminución de la expresión de ABCB1/MDR1 en la mucosa de pacientes con CU (Langmann *et al.*, 2004). Además estudios genéticos sugieren una correlación entre diferentes variantes del gen ABCB1 y la susceptibilidad y el fenotipo de CU (Ho *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito una disminución de expresión génica de ABCB1 en mucosa de pacientes con CU y también en pacientes con EC y colitis infecciosa (Wu *et al.*, 2007).

La PSKH1 (Serine/threonine-protein kinase H1) es una molécula encargada de la fosforilación de proteínas, tiene un papel estructural y regulador importante en el mantenimiento del aparato de Golgi y actúa como reguladora del procesamiento y tráfico del pre-ARNm (Brede *et al.*, 2003). Un estudio realizado en biopsias de pacientes con EII, tanto en EC como en CU, ha encontrado un aumento de la expresión génica de PSKH1 en la mucosa afecta y no afecta de estos pacientes comparados con controles sanos (Wu *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Factor inmunológico: respuesta inmune, TNF- α y apoptosis.

Clásicamente se ha considerado que el elemento inmunológico fundamental en la patogenia de la EC era una alteración en los linfocitos CD4+. En la EC dichos linfocitos están polarizados a una respuesta Th1 donde las citoquinas implicadas son la IL-2, IL-12, el INF- γ y el TNF- α (Fiocchi, 1998). Existe consenso en la comunidad científica, basado en la evidencia generada por varios estudios, de que en la EC los linfocitos de la lámina propia presentan una resistencia a la apoptosis; la proliferación de células T excede a la muerte

celular, y se perpetúa la respuesta inflamatoria intestinal (Boirivant *et al.*, 1999; Ina *et al.*, 1999; Sprent *et al.*, 2001).

En condiciones fisiológicas normales, las células T aisladas de la lámina propia intestinal muestran una susceptibilidad aumentada a desarrollar apoptosis (muerte celular programada) en comparación con las células T de sangre periférica. Esta tendencia a la apoptosis depende de la presión inmunológica que los agentes ambientales ejercen sobre la mucosa intestinal (Bu *et al.*, 2001).

Se ha descrito una resistencia a la apoptosis de dichos linfocitos en la lámina propia de la mucosa intestinal de los pacientes con EC. Este aspecto es fundamental al haber observado que los nuevos fármacos provocan su efecto, al menos en parte, induciendo la apoptosis de estos linfocitos. Este es un aspecto cuya importancia se ha remarcado al demostrarse que el tratamiento con anti-TNF- α induce un incremento de la apoptosis de linfocitos T de la lámina propia de los pacientes con EC lo cual, además, se refleja también en sangre periférica, donde las células inmunitarias aumentan su índice apoptótico (Atreya *et al.*, 2000; Lugerling *et al.*, 2001; ten Hove *et al.*, 2002). Cabe destacar que actualmente se está probando el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en pacientes con EC severa refractaria a fármacos anti-TNF- α con resultados esperanzadores (Burt *et al.*, 2010).

Hasta el momento, se desconoce si esta resistencia a la apoptosis es intrínseca-primaria o si bien es secundaria-adquirida y mediada por la acción de ciertas citoquinas y otros factores liberados durante esta respuesta inmune exacerbada. Es posible que la resistencia a la apoptosis de estos linfocitos pueda justificarse, en parte, por la disminución del cociente entre la expresión intracelular de proteínas de la familia Bcl-2: proteínas Bax (pro-apoptóticas) y proteínas Bcl-2 (anti-apoptóticas) (Cuthbert *et al.*, 2002). De hecho, hay estudios que demuestran que las células T de las biopsias de mucosa intestinal de pacientes con EC tienen una expresión reducida de proteínas Bax (Boirivant *et al.*, 1999; Ina *et al.*, 1999). Las proteínas relacionadas con la familia Bcl-2 se localizan en la membrana mitocondrial externa (Ina *et al.*, 1999). Estas proteínas regulan la permeabilidad mitocondrial mediante la modificación del

potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Este potencial se genera y mantiene normalmente gracias al correcto funcionamiento de la cadena respiratoria, localizada en la membrana interna mitocondrial, y la actividad de esta organela puede medirse con diferentes parámetros tales como consumo de oxígeno, $\Delta\psi_m$, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), etc (Green *et al.*, 1998; Martinou, 1999; Tatton *et al.*, 1999).

La mitocondria es una organela importante en el control de los mecanismos de muerte celular. Aunque el programa apoptótico puede ejecutarse en algunas células o situaciones de forma independiente a la mitocondria, está demostrado que hay muchos tipos celulares así como diversos estímulos, que requieren de la vía amplificadora mitocondrial para la consecución de la misma (Lenaz, 2012; van Dullemen *et al.*, 1995). En una mitocondria normofuncionante, no se generan estímulos apoptóticos. Cuando la membrana mitocondrial se despolariza, se liberan una serie de sustancias que son capaces de iniciar, por sí mismas, el programa apoptótico.

Respecto al TNF- α , citoquina muy implicada en la patogénesis de la EC (Podolsky, 2002), también se ha documentado que es capaz de inducir la producción de ERO en la mitocondria (Ko *et al.*, 2001; Lenaz, 2012). Muchos estímulos apoptóticos, similares al TNF- α , inducen la generación de ERO al interaccionar con la cadena respiratoria mitocondrial (Armstrong *et al.*, 2002; Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Le Bras *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 1998) y las ERO así generadas parecen estar implicadas en la regulación de la apoptosis (Hildeman *et al.*, 1999; Maianski *et al.*, 2003; Sidoti-de Fraisse *et al.*, 1998). Así pues, las mitocondrias son la fuente principal para generar superóxido (O_2^-) que se metabolizará en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero también hay estudios que demuestran que son organelas diana donde puede actuar el H_2O_2 , ya que este radical puede inducir un aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con el consecuente descenso del $\Delta\psi_m$ (Gores *et al.*, 1998; Hirokawa *et al.*, 1998; Le Bras *et al.*, 2005; Lemasters *et al.*, 1998) y de la formación de ATP, lo cual a su vez limita las posibilidades de desarrollar en la célula un programa apoptótico (Sanchez-Alcazar *et al.*, 1997).

2.1.2.3 Permeabilidad intestinal y ambiente.

La evidencia científica sugiere que la EC acontece en un sujeto genéticamente predispuesto y por la interacción entre microorganismos intestinales y el sistema inmune de la mucosa intestinal (Xavier *et al.*, 2007). En este sentido, la EC se asocia con una interrupción de la barrera epitelial normal que produce un aumento de la permeabilidad intestinal y perpetúa la inflamación crónica del intestino (Salim *et al.*). Los estudios GWAS, comentados previamente, han identificado numerosos genes que relacionan defectos en la inmunidad innata y adquirida y la función de la barrera epitelial entre ellos el más destacado es NOD2/CARD15 (Barrett *et al.*, 2008; Barrett *et al.*, 2009; Mayer, 2010). Estos estudios han identificado también mutaciones de proteínas como la IRGM y ATG16L1 que participan en la autofagia o mecanismo de eliminación de bacterias y orgánulos defectuosos intracelulares (Levine *et al.*, 2007), así como mutaciones de genes que codifican para proteínas del epitelio intestinal (como OCTN y DLG5) y que se asocian con aumento de la susceptibilidad de EC. Además se ha demostrado un vínculo funcional entre NOD2 y ATG16L1, ambas están codificadas por genes que aumentan el riesgo de EC, lo cual confirma el papel importante de la barrera mucosa intestinal en la patogenia de la enfermedad (Cooney *et al.*, 2010; Naser *et al.*, 2012).

Las *tight junctions* o uniones estrechas, esenciales para el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa intestinal, son estructuras dinámicas intercelulares que limitan la velocidad para la absorción pasiva de las moléculas hidrofílicas en el intestino y, por lo tanto, determinan la permeabilidad intestinal. Al examinar los patrones de expresión y distribución de estas estructuras, se observan diferencias entre los pacientes con EC y la población sana (Zeissig *et al.*, 2007). En la mucosa intestinal no inflamada de pacientes con EC se han observado alteraciones e irregularidades en la organización de las *tight junctions* y se ha visto que son más vulnerables a los estímulos lumbales, con el consecuente aumento de la permeabilidad (Schoultz *et al.*, 2011; Soderholm *et al.*, 2002). Además los pacientes con EC en remisión con alteración de la permeabilidad intestinal tienen más riesgo de sufrir recaída de la enfermedad (Arnott *et al.*, 2000; Oshitani *et al.*, 2005). De la

misma forma, se sugiere que este fenómeno podría contribuir al desarrollo de neoinflamación intestinal o recurrencia en la EC.

Los pacientes con EII presentan en el epitelio de la mucosa intestinal un elevado número de bacterias intracelulares y moléculas de adhesión en la superficie celular que pueden alterar la permeabilidad de la barrera intestinal mediante la síntesis de diferentes enzimas alfa-hemolisinas (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Aunque los primeros estudios no confirmaron este aumento de permeabilidad en los familiares de estos pacientes (Hollander *et al.*, 1986; Lindberg *et al.*, 1995), posteriormente se ha establecido que, los familiares de primer grado asintomáticos de pacientes con EC tienen alterada la función de barrera en el intestino (May *et al.*, 1993; Peeters *et al.*, 1997). De esta forma, los familiares con mayor permeabilidad podrían tener mayor riesgo de padecer la enfermedad. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos involucrados y de cómo contribuyen a la inflamación intestinal. Se ha informado de un aumento de la permeabilidad epitelial a las proteínas que precede al brote de la inflamación ileal en la EC, lo que indica una disfunción de la barrera como evento temprano en la inflamación de la mucosa (Soderholm *et al.*, 1999).

El efecto del TNF- α y el IFN- γ , citoquinas importantes en la patogenia de la EC, sobre la barrera intestinal se ha evaluado en estudios experimentales. Ambas citoquinas regulan y aumentan la permeabilidad transcelular y paracelular (Wang *et al.*, 2005). Además el tratamiento con anti-TNF- α ha demostrado mejorar las propiedades de la barrera así como disminuir la permeabilidad debido a la activación de la apoptosis epitelial, siendo muy efectivo en mejorar la barrera intestinal en los pacientes con EC (Ye *et al.*, 2006).

El aumento progresivo de la incidencia de la EC, las diferencias entre áreas geográficas y el hecho de que la concordancia entre gemelos no sea del 100%, aboga por la influencia de factores ambientales en la etiopatogenia de esta enfermedad. En este sentido, la teoría de la mejora de la higiene, algunos alimentos así como componentes de los mismos, los anticonceptivos orales y el estrés se han sugerido posibles factores desencadenantes de la EC, sin embargo ninguno se ha demostrado de forma consistente. A continuación se presentan algunos de los factores implicados más representativos.

- **Tabaco:** Entre los factores ambientales, es el de mayor interés. Un metaanálisis confirma que el hábito tabáquico actúa como protector en la CU, comportando un alto riesgo para la EC (Mahid *et al.*, 2006). Además, su consumo se correlaciona con una mayor probabilidad de un curso clínico peor de la EC y con mayor riesgo de recurrencia postquirúrgica (Ryan *et al.*, 2004). El mecanismo que explica esta diferencia en la influencia del tabaco en la EC y la CU sigue siendo desconocido. Está demostrado que fumar afecta a la inmunidad sistémica, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal y altera el correcto funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo (Rubin *et al.*, 2000). El papel del fumador pasivo, especialmente en niños, como factor de riesgo o factor protector sigue siendo controvertido y ningún estudio lo ha podido confirmar (Lakatos *et al.*, 2007).

- **Apendicectomía:** Se ha sugerido un papel protector de esta intervención en el desarrollo de EC, aunque no todos los estudios lo confirman. Se piensa que podría ser debido a que el tejido linfoide del apéndice sería el punto de partida de las células que participarían en el desarrollo de la inflamación intestinal (Andersson *et al.*, 2003).

- **AINE (antiinflamatorios no esteroideos):** Existe evidencia que sugiere reactivaciones de la enfermedad en pacientes tratados con AINE, probablemente por una reacción de tipo idiosincrásico, pero los datos disponibles no son completamente concluyentes. No queda claro si los inhibidores de la COX-2 son más seguros que los AINE convencionales, siendo la inhibición de la síntesis de prostaglandinas el punto clave para explicar los efectos secundarios de estos fármacos (Kefalakes *et al.*, 2009). Los estudios de mejor calidad no apoyan el hecho de que sean un factor etiológico en la inducción de recidivas (Forrest *et al.*, 2004; Reinisch *et al.*, 2003). Por tanto, el tratamiento antiinflamatorio no está contraindicado en la enfermedad inflamatoria intestinal, sobre todo en pacientes en remisión clínica, no obstante se debe ajustar a indicaciones definidas y bien establecidas, con un mayor cuidado en aquellas situaciones clínicas en las que el paciente está en brote de la enfermedad.

- **Anticonceptivos orales:** Numerosos estudios epidemiológicos han valorado la relación entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollar EC; sin embargo, la mayoría incluyen un escaso número de pacientes y obtienen resultados controvertidos, unos a favor (Timmer *et al.*, 1998) y otros en contra (Cosnes *et al.*, 1999). En un estudio caso-control, realizado en 103 mujeres españolas, los anticonceptivos supusieron un factor de riesgo para el desarrollo de EC sólo en el análisis univariante y no en el multivariante (Sicilia *et al.*, 2001). Recientemente se ha publicado un estudio prospectivo con una cohorte de más de 230.000 mujeres americanas, de ellas 315 con EC, en el que el uso de anticonceptivos orales se asocia con riesgo de EC (Khalili *et al.*, 2012). Sin embargo, no podemos concluir que exista una asociación clara entre el uso de anticonceptivos orales y la predisposición a desarrollar EC, por lo que su consumo no está contraindicado en las pacientes que padecen esta enfermedad y están bien controladas. Teóricamente, predisponen al desarrollo de EII a través de sus efectos trombóticos en la microcirculación, por ello, se recomienda el empleo de los de nueva generación, con menor carga estrogénica y menos trombogénicos.

- **Alimentos:** Algunos alimentos así como componentes de los mismos (trigo, maíz, leche, azúcares refinados, grasas o alcohol), aditivos alimentarios e incluso la pasta de dientes, han sido relacionados con el desarrollo de la EII. En el momento actual no existen evidencias científicas de que ningún alimento desencadene, perpetúe o agrave la EII. A todos los enfermos se les debe aconsejar una dieta rica, variada y equilibrada (Andersen *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 1993).

- **Estrés:** Existen estudios que reportan que el estrés psicosocial aumenta el riesgo de recaída en pacientes con CU quiescente. Sin embargo, parece que el estrés actúa menos como inductor de la enfermedad y más como modulador del curso de la misma (Rampton, 2009). Estudios procedentes de observaciones clínicas y de experimentos neuroinmunológicos con animales de laboratorio demuestran que el estrés es capaz de modificar las manifestaciones de la enfermedad, el curso clínico y la respuesta al tratamiento (Maunder, 2005; Maunder *et al.*, 2008). Además estudios experimentales han identificado que los neurotransmisores y neurohormonas producidos en el sistema nervioso

central y en el sistema gastrointestinal son similares y que las inervaciones neuronales de ambos sistemas están interconectadas (Mawdsley *et al.*, 2006). Finalmente, el estrés aumenta la permeabilidad intestinal y la consecuente entrada excesiva de gran cantidad de antígenos lumbinales, provocando la activación de las células T presensibilizadas de la mucosa y produciendo inflamación (Maunder, 2005)

- **Infecciones:** La teoría de la mejora de la higiene debida a una menor exposición a microorganismos patógenos o no patógenos en los niños, con la consecuente disminución de infecciones ha sido implicada como una posible causa de la EII (Shaw *et al.*, 2011). Es conocido que las interacciones bacteria-mucosa intestinal desempeñan un papel importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune. Si esta interacción no es adecuada, la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar. En la EC las bacterias comensales del tracto entérico constituyen la diana a la que se enfrenta el sistema inmune y, por tanto, el estímulo que desencadena y perpetúa los fenómenos inflamatorios que destruyen la mucosa. Aunque se han estudiado múltiples gérmenes en la etiopatogenia de la EII, ninguno de ellos ha logrado demostrar su papel patogénico en la misma.

Flora intestinal comensal:

La idea clásica de que la flora intestinal comensal juega un papel fundamental en el desarrollo de la EII se basa en el efecto beneficioso de los antibióticos en el tratamiento de la EC y en la pouchitis secundaria a la cirugía de la CU y asociada a una disbiosis (contacto entre la flora del intestino delgado y la del colon) que se trata también con antibióticos. Además se ha observado que la mayoría de modelos experimentales de EII fracasan en el desarrollo de inflamación cuando mantienen un ambiente libre de gérmenes (McGuckin *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha intentado explicar el papel de la microflora intestinal como importante factor ambiental que influye en el desarrollo de la EC (McGuckin *et al.*, 2009). Existen dos ideas que intentan explicarlo. La primera se basa en que la EII está causada por una anormal respuesta inmunológica

frente a la microflora intestinal normal, por lo que alteraciones en el sistema inmune innato de la mucosa, como por ejemplo modificaciones funcionales de NOD2, provocan una respuesta inmune excesiva y causan inflamación en la mucosa intestinal. La segunda hipótesis se basa en cambios anómalos en la composición de la microflora intestinal, lo cual produce una respuesta patológica y causa inflamación en la mucosa intestinal (Almenier *et al.*, 2012; McGuckin *et al.*, 2009).

Agentes infecciosos específicos:

Muchos microorganismos han sido propuestos como potenciales causantes de la EII, entre los que destacan *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus* y *Saccharomyces cerevisiae* entre otros. No obstante el que mayor controversia a provocado ha sido el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). En varios estudios se ha postulado que el agente infeccioso MAP, presente en la leche de vaca tras su pasteurización, pudiera ser el desencadenante de la respuesta inmunológica desproporcionada y permanente que desarrolla la enfermedad, aunque esta teoría permanece controvertida y aún no concluida. En vacas lecheras y otros animales, MAP causa la enfermedad de Johne, una inflamación crónica granulomatosa del intestino que ocasiona diarrea con afectación progresiva del estado general. MAP ha sido identificado en diferentes capas de la mucosa intestinal de pacientes con EC por distintos métodos de microscopía y se ha encontrado también en sangre (Ellingson *et al.*, 2005). Se sugiere que este agente podría infectar a las células endoteliales y los adipocitos, haciendo que proliferen, dando lugar a la obstrucción de vasos ya existentes (formación de granulomas) y provocando el desarrollo de nuevos vasos (neoangiogénesis y linfangiogénesis) y grasa del mesenterio (Pierce, 2009). Las células T con fenotipo Th1 o Th1/Th17 de los pacientes con EC presentan una mayor reactividad frente a MAP, que puede sugerir un posible papel de las micobacterias en la inflamación (Olsen *et al.*, 2009).

2.2) Radicales libres

2.2.1 Concepto

Un radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados girando en su orbital externo. Esta propiedad hace que los radicales libres sean muy reactivos y se caractericen por tener una vida media extraordinariamente pequeña, del orden de milisegundos, aunque puede variar según el tipo de radical libre.

La condición de tener electrones no apareados confiere la reactividad puesto que el electrón impar busca otro para salir del desequilibrio atómico, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital (radical reductor), a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un no radical, en cuyo caso, este último se convierte en un radical libre.

Aunque en la naturaleza los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados, se utiliza de forma errónea el término *radical libre de oxígeno*, ya que se asigna a todos los reactivos intermediarios de las especies de oxígeno, incluyendo aquellas formas moleculares que no son radicales. Por este motivo, es más adecuado hablar de *especies reactivas de oxígeno* (ERO) en lugar de *radicales libres de oxígeno* (Abuja *et al.*, 2001).

Tabla 2.2. Resumen de las clases de especies reactivas de oxígeno.

| <u>Radicales</u> | <u>No radicales</u> |
|--|--------------------------------|
| $O_2^{\bullet -}$ Anión superóxido | 1O_2 Oxígeno singlete |
| HO_2^{\bullet} Radical hidroperóxido | H_2O_2 Peróxido de hidrógeno |
| HO^{\bullet} Radical hidroxilo | $ONOO^-$ Peroxinitrito |
| RO^{\bullet} Radical alcoxilo | $ROOH$ Hidroperóxido |
| ROO^{\bullet} Radical peroxilo | |

Además de las ERO, existen también radicales libres nitrogenados o *especies reactivas de nitrógeno* (ERN) cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos.

En la actualidad hay múltiples líneas de investigación sobre los efectos de las ERO. Se ha evidenciado que poseen un papel patológico importante y que se encuentran implicados en el inicio y desarrollo de numerosas enfermedades. Cuando están en exceso son capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas y producir inactivación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y daños al ADN, dando lugar a importantes lesiones tisulares que provocan un efecto deletéreo sobre el funcionamiento de los órganos.

Debido a que la vida se desarrolla en presencia de oxígeno, los organismos han convivido y están expuestos a la generación de ERO. Éstos se han mostrado responsables del daño oxidativo a macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, glúcidos y proteínas (Halliwell, 1996). Se ha relacionado la presencia de ERO con los mecanismos fisiopatológicos de multitud de patologías como la diabetes, patologías cardiovasculares (Byers, 1993), procesos reumáticos (Wolf y cols., 1986), patologías gastroenterológicas, afecciones broncopulmonares (Slade y cols., 1993) o procesos neurodegenerativos, así como algunos cánceres. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Bondy, 1992) o el daño causado por el ejercicio físico agotador (Sastre *et al.*, 1992). Sin embargo, en muchas de estas patologías y procesos fisiológicos se desconoce si los ERO son causa o consecuencia.

Sin embargo, hoy en día existe suficiente evidencia científica que demuestra que las ERO realizan además una función de señalización intracelular implicada en la regulación de los procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular, así como del proceso inflamatorio y de la respuesta adaptativa a la lesión o al estrés (Adler *et al.*, 1999; Herrlich *et al.*, 2000). Asimismo, el papel de las enzimas antioxidantes se interpreta actualmente en el contexto de una fina regulación del estado redox celular con importantes implicaciones en la regulación de procesos celulares como el ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis (Kahl *et al.*, 2004). La capacidad de regular el proceso

apoptótico, tanto de las propias ERO como de las enzimas antioxidantes, ha sido ampliamente caracterizada *in vitro*. El H_2O_2 , en concentraciones subletales y por tanto fisiológicas, regula el proceso apoptótico (Kim et al, 2005) al inhibir la liberación de citocromo c mitocondrial que suele inducir el estímulo apoptótico Fas. Del mismo modo, este radical, generado vía inducción de la superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn) determina una resistencia al efecto citotóxico del TNF- α , citoquina perteneciente a la familia Fas. La SOD-Mn, mitocondrial, ha sido caracterizada por muchos estudios como enzima antiapoptótica, efecto que ejerce frente a una amplia variedad de estímulos apoptóticos (Bernard *et al.*, 2001a; Kiningham *et al.*, 1999; Manna *et al.*, 1998). A este respecto existe una homogeneidad de resultados en la literatura, evidenciándose además que ejerce su papel protector frente a la apoptosis actuando tanto sobre la vía apoptótica mediada por receptor Fas, como sobre la vía apoptótica mitocondrial (Kahl *et al.*, 2004). La interpretación inmediata del efecto antiapoptótico de la SOD-Mn sería que el O_2^- tiene una implicación directa en el fenómeno apoptótico o bien, que está inhibiendo vías de supervivencia celular. Sin embargo, conviene señalar que el producto de la reacción de la SOD-Mn es el H_2O_2 , radical libre implicado también en la regulación de la proliferación y la muerte celular (ver arriba). Este hecho ilustra la necesidad de que exista un balance entre la enzima SOD-Mn y las enzimas encargadas de eliminar el H_2O_2 (catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) fundamentalmente).

2.2.2 Clases de Especies Reactivas del Oxígeno

El término de ERO se usa para designar tanto a los radicales de oxígeno como a las especies no radicales, pero que se comportan como oxidantes. A continuación se describen los más relevantes e implicados en este proyecto:

2.2.2.1 Radicales Libres del Oxígeno

2.2.2.1.1 Radical superóxido (O_2^-)

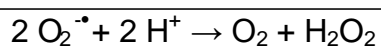
Procede de la simple reducción de electrones del oxígeno molecular y es un radical de oxígeno libre, ya que contiene un electrón no apareado. A diferencia de otros, este radical es poco reactivo, sin embargo, como se explica más

adelante, es muy importante en fisiopatología porque se genera en gran cantidad y es capaz de convertirse en otras ERO que son muy tóxicas y dañinas, tales como el radical hidroxilo (Ames *et al.*, 1993; Fridovich, 1997). Además no ataca de manera significativa a lípidos poliinsaturados o al ADN (Fridovich, 1997).

El O_2^- se genera a través de una gran variedad de fuentes, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. En la patogenia de la EII la generación de ERO procede de neutrófilos y macrófagos que interactúan con moléculas proinflamatorias como las citocinas, los inmunocomplejos o productos bacterianos y provocan la activación de la enzima de membrana nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, que a su vez desencadena la liberación de grandes cantidades de ERO. Aunque no cabe duda de que la generación de O_2^- por fagocitos (y en menor medida por eosinófilos, linfocitos y fibroblastos) es esencial para una defensa efectiva contra la infección bacteriana, un exceso de producción continua en los procesos inflamatorios puede causar la destrucción extensa de tejidos (Weiss, 1989). Además existen fuentes exógenas de O_2^- como el humo de tabaco y radiaciones ionizantes, que contribuyen a su incremento y pueden intervenir en el desencadenamiento de determinados procesos patológicos.

Aproximadamente el 1-5 % del oxígeno consumido por los tejidos sanos puede ser transformado en O_2^- , produciendo un constante movimiento de electrones dentro de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Turrens, 1997). Esto conlleva que, en condiciones normales, la mitocondria sea una de las principales fuentes de producción intracelular endógena de O_2^- , aunque también puede generarse por sistemas enzimáticos endógenos, tales como la enzima xantina oxidasa peroxisomal, que se activa por la re-introducción de oxígeno después de períodos de hipoxia.

A pesar de la enorme producción de este radical, en sí mismo no es considerado como particularmente reactivo. No atraviesa rápidamente la bicapa lipídica de la membrana y sufre dismutación espontáneamente a pH fisiológico:



Sin embargo, y de forma paradójica, el peligro en O_2^- radica en su neutralización. La reacción de dismutación es acelerada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), siendo la primera de una cascada de otras reacciones oxidantes, que producen otras ERO como el H_2O_2 , el ácido hipocloroso (HOCl) y el radical hidroxilo (OH^\bullet).

2.2.2.1.2 Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno (OH^\bullet)

Estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de tres electrones. No obstante, se ha demostrado que la generación de OH^\bullet se produce también a través de vías alternativas muy relevantes en la inflamación, como la inactivación de la superóxido dismutasa cobre zinc (SOD-Cu/Zn) por H_2O_2 (Yim *et al.*, 1990) y a través de interacciones entre el O_2^- y HOCl (Candeias *et al.*, 1993), HOCl y los iones de hierro reducidos (Candeias *et al.*, 1994) y de H_2O_2 con el óxido nítrico (NO) (Nappi *et al.*, 1998).

Se trata del oxidante más potente de los sistemas biológicos, la ERO más reactiva que se conoce (Lubec, 1996), con una vida media extremadamente corta (a 37 °C, 1×10^{-9} segundos) y mínima capacidad de difusión. Debido a esto, reacciona muy cerca de su lugar de formación con la mayoría de las biomoléculas (Del Maestro, 1980; Halliwell, 1991). Es capaz de reaccionar con todas las moléculas conocidas y es muy importante por su capacidad para inactivar a la principal enzima mitocondrial (piruvato deshidrogenasa), por el daño que produce en el ADN (induce mutaciones en las enzimas y las inactiva) y en las membranas (desencadena la peroxidación lipídica). En el organismo no existen enzimas ni sistemas de defensa directos capacitados para neutralizar el radical hidroxilo. Sin embargo, el daño en los tejidos inducido por el OH^\bullet puede ser impedido, por la unión o "secuestro" a iones de metales de transición, por ejemplo, a la albúmina, ceruloplasmina, ferritina, transferrina y metalotioneína.

2.2.2.1.3 Óxido nítrico (NO)

En analogía con las ERO, las ERN derivan de nitrógeno e incluyen el NO y el peroxinitrito ($ONOO^-$). En los últimos años se ha demostrado un notable interés por el papel de las ERN en las reacciones redox celulares y existe evidencia

avalada por gran cantidad de trabajos publicados que describen su papel en la inflamación.

A pesar de que el NO es muy liposoluble, con una vida media considerablemente larga y capaz de difundirse lejos de su lugar de síntesis, todavía existe debate acerca de si la producción de NO es realmente nociva para los tejidos inflamados (Grisham *et al.*, 1999; Kubes *et al.*, 2000). Tampoco está claro si la enzima productora de NO, la óxido nítrico sintetasa, se expresa en las células inflamatorias.

Probablemente el NO por sí solo no es nocivo e incluso puede ser beneficioso mediante la reducción de la inflamación (Lefer *et al.*, 1999). Así pues, el NO ha demostrado que es capaz de proteger a las células epiteliales contra la toxicidad de H_2O_2 (Kim *et al.*, 1998; Wink *et al.*, 1995), que defiende a los macrófagos frente a la citotoxicidad inducida por citocinas (Scivittaro *et al.*, 1997) y que puede disminuir la unión de leucocitos a las células endoteliales (Binion *et al.*, 2000).

Entre las diferentes funciones fisiológicas que posee destaca como regulador del flujo sanguíneo local e inhibidor de la agregación plaquetaria, contribuye en la defensa inmunitaria primaria, actúa como neurotransmisor, posee efecto antiinflamatorio (en condiciones normales) o acción proinflamatoria (si está aumentado).

En los últimos años se han realizado gran cantidad de estudios además de por las funciones fisiológicas que desempeña, por ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre (Lipton *et al.*, 1993) y porque a través de su rápida interacción con O_2^- , puede formar múltiples ERO tóxicas (Packer *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 1997).

En exceso es muy citotóxico porque puede reaccionar con el O_2^- formando $ONOO^-$ que es altamente reactivo (Grisham *et al.*, 1999). Además es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas e interferir con la señalización celular por nitración de residuos de tirosina en proteínas.

Por otro lado, el NO, actúa, incluso en concentraciones fisiológicas, bloqueando la cadena respiratoria mitocondrial lo cual se refleja tanto en una inhibición de la respiración, como en modificaciones de las capacidades apoptóticas de las células (Beltran *et al.*, 2000; Beltran *et al.*, 2002). El bloqueo de la cadena respiratoria conlleva un incremento de la formación de ERO y se genera un estrés oxidativo que también ha sido implicado en la generación de apoptosis (Chandel *et al.*, 2001; Martinou, 1999). Indiscutiblemente, cualquier situación inflamatoria, entre ellas la que acontece en la EII, supone un aumento de NO entre otros mediadores y, por tanto, se generará un efecto mitocondrial que podría contribuir a explicar las diferencias encontradas en la regulación de la apoptosis de las células de estos pacientes.

2.2.2.2 Especies Reactivas del Oxígeno no radicales

2.2.2.2.1 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Es el estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de dos electrones del ión peróxido. El H_2O_2 no es una ERO como tal, pues no posee electrones desapareados.

Cualquier sistema de producción de O_2^- es capaz de producir H_2O_2 y, en consecuencia, los fagocitos también pueden generar y liberar cantidades notables de H_2O_2 . A pesar de poder ejercer daños irreversibles a las células epiteliales, es considerado un radical relativamente débil (Mulier *et al.*, 1998). Su elevada reactividad *in vivo* es atribuida no sólo a su estabilidad y difusibilidad, sino a su gran capacidad para reaccionar con iones metálicos como Fe^{2+} o Cu^+ , para formar OH^\bullet (mediante la reacción de Fenton que se explicará posteriormente). La formación de OH^\bullet a partir de H_2O_2 puede ser evitada a través de la reducción de dos electrones del H_2O_2 al agua, reacción catalizada por las enzimas CAT o GPx.

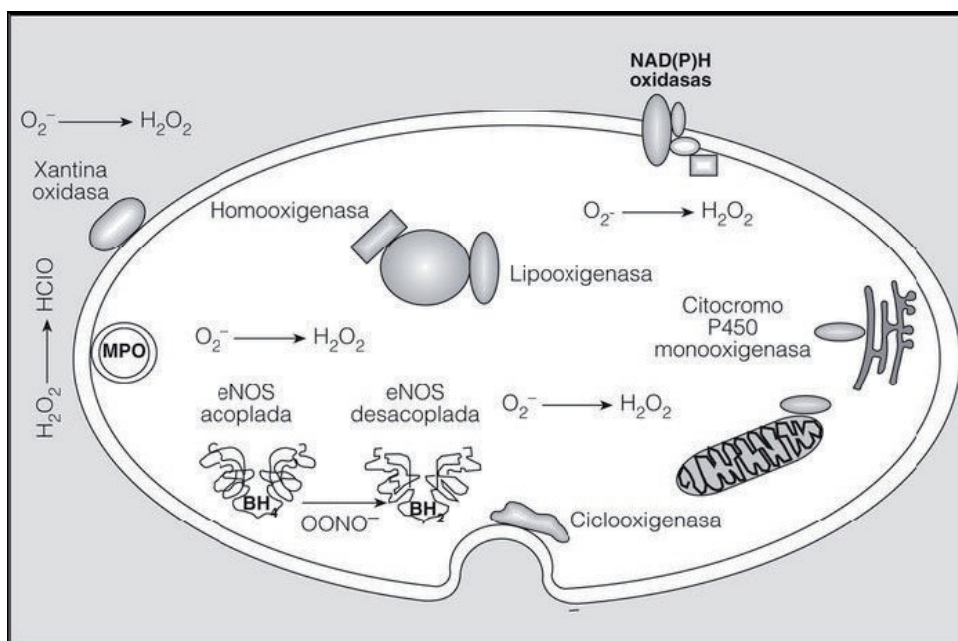
Su importancia recae en el hecho de que participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de ERO y en que puede atravesar las

membranas biológicas, pudiendo causar a la célula daño oxidativo lejano al lugar de producción.

2.2.3 Origen de las Especies Reactivas de Oxígeno

Las ERO pueden producirse tanto de forma endógena como proceder de fuentes exógenas (Barrett *et al.*, 2009). Los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies de formación endógena, es decir, son generadas en los procesos biológicos intra y extracelulares normales y patológicos, en prácticamente todos los tejidos (Halliwell, 1991). Pueden producirse de forma excesiva e inadecuada o bien en un medio en el que las defensas que normalmente protegen a los tejidos son insuficientes. Además el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes del exterior.

Figura 2.2. Fuentes potenciales de especies reactivas de oxígeno.

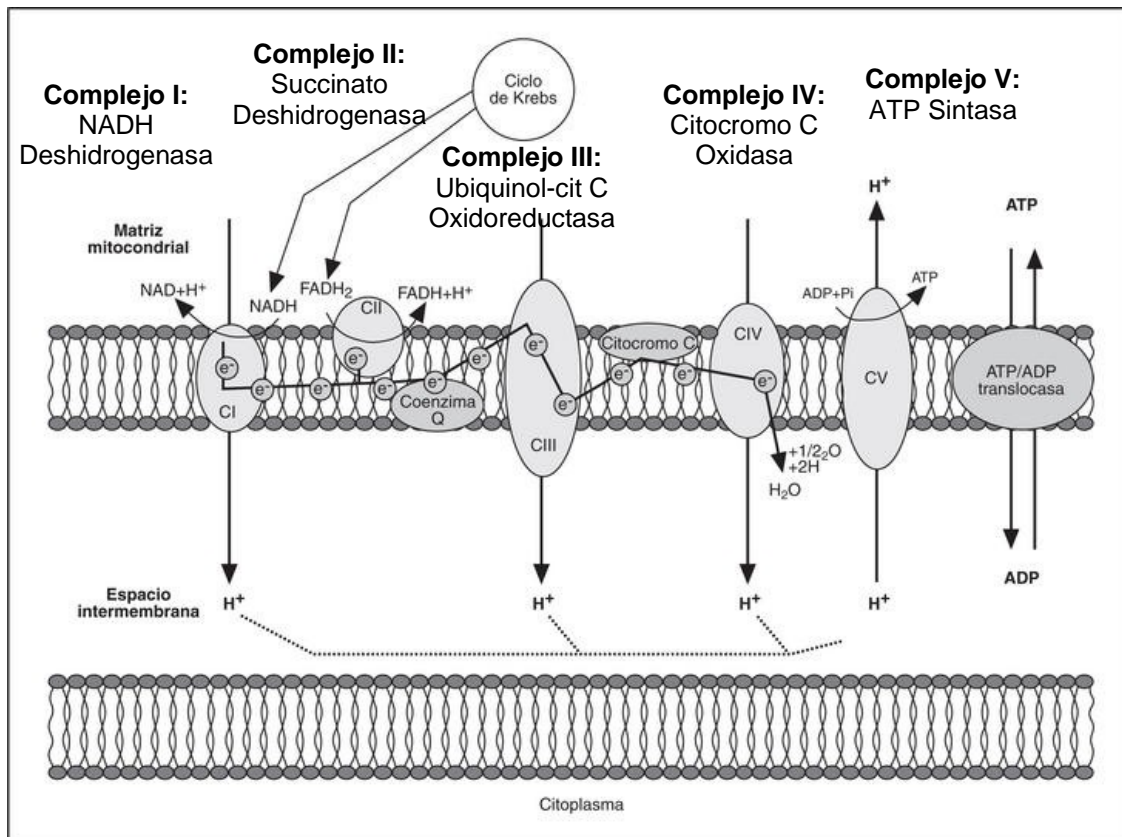


2.2.3.1 Fuentes endógenas

2.2.3.1.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial

La cadena de transporte electrónico mitocondrial no funciona de manera perfecta y es una de las principales fuentes de ERO en la célula.

Figura 2.3. Oxidación del oxígeno a través de la cadena respiratoria mitocondrial



Aproximadamente el 95% de todo el oxígeno consumido por las células se metaboliza de forma completa en la mitocondria. Para que la reducción del oxígeno sea completa se requiere que la citocromo a₃, del complejo IV de la cadena respiratoria, mantenga unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta la transferencia completa de 4 electrones, produciendo dos moléculas de H₂O sin formación de intermediarios tóxicos (Benzi *et al.*, 1995).

Por el contrario, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero no son capaces de retener el ión O₂⁻ formado (Benzi y Moretti, 1995). La

especie radical así formada es el O_2^- (producido del orden de 10^{10} moléculas por célula y por día) que realiza un daño *in situ*, pero puede dismutar a su vez generando H_2O_2 (Ames *et al.*, 1993; Benzi *et al.*, 1995). El H_2O_2 sí es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris *et al.*, 1972).

2.2.3.1.2 Las células fagocitarias

Los fagocitos activados (neutrófilos, macrófagos, monocitos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar O_2^- y H_2O_2 como uno de los mecanismos para defenderse de los microorganismos (Babior, 1978).

En enfermedades inflamatorias estos fagocitos activados son una fuente importante de radicales libres que se producen en el lugar de la inflamación específicamente para la defensa del órgano atacado, pero pueden acabar dañando los tejidos y producir estrés oxidativo.

La estimulación de los receptores de la membrana de los fagocitos por diversos factores (complemento, endotoxinas, leucotrienos, inmunocomplejos), activan la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana leucocitaria, la cual, asociada con el citocromo b-245 y una flavoproteína, reduce el oxígeno molecular exclusivamente, generando grandes cantidades de radical O_2^- (Babior, 1978; Quinn *et al.*, 2004). Normalmente la NADPH oxidasa se encuentra en estado latente.

Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan NO^\bullet , por acción de la oxido-nítrico-sintasa (NOS) sobre la arginina intracelular. La combinación del O_2^- con el NO^\bullet da lugar a la formación del $ONOO^-$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.

2.2.3.1.3 Sistema xantina oxidasa

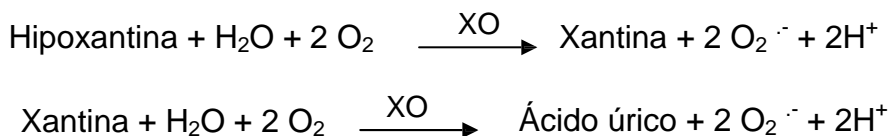
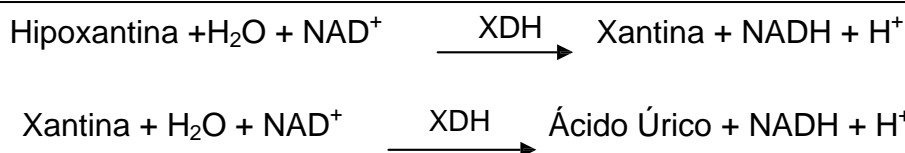
Actualmente se sabe que la enzima xantina óxidoreductasa posee dos formas que son producto alternativo del mismo gen: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO), que se forma por modificaciones post-transcripcionales a partir de la forma deshidrogenasa. Ambas formas enzimáticas catalizan la

hidroxilación de una amplia gama de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y aldehídos (Hille, 1996; Hille *et al.*, 1995).

Su función más reconocida es como factor limitante de la degradación de ácidos nucleicos, durante la cual las purinas son degradadas hasta ácido úrico a expensas de la producción de anión O_2^- .

La XO y la XDH muestran reactividades diferentes hacia el oxígeno molecular y el NAD^+ , prefiriendo el primero la oxidasa y el segundo la forma deshidrogenasa (Nishino, 1994).

Esta dualidad de la XO le confiere la capacidad de producir potentes oxidantes, pero también genera ácido úrico, un potente antioxidante (Ames *et al.*, 1981; Becker, 1993; Halliwell *et al.*, 1990).



Esta enzima en su forma deshidrogenasa no produce especies activadas de oxígeno, ya que emplea el NAD^+ como aceptor de electrones (Kinnula *et al.*, 1995). Así como la XO se relaciona con diversos procesos patológicos y produce un daño oxidativo a los tejidos, la XDH puede ser un importante componente de la defensa del organismo contra el daño provocado por las ERO a través de la acción antioxidante del ácido úrico. La enzima, *in vivo*, está mayoritariamente en la forma deshidrogenasa y esta enzima puede transformarse en la forma oxidasa, en ciertas condiciones, a través de un proceso reversible o bien a través de un proceso irreversible. La conversión de XDH a XO de forma reversible se produce mediante calentamiento o mediante oxidación y de forma irreversible por proteólisis (Stirpe *et al.*, 1969).

En su forma oxidada, esta enzima emplea oxígeno molecular como aceptor de electrones produciendo radical O_2^- , pero sabemos que puede producir también H_2O_2 . Si se produce la reducción univalente del oxígeno dará lugar a la formación de O_2^- (McCord *et al.*, 1968) y si la reducción es divalente formará H_2O_2 (Fridovich, 1970; Porras *et al.*, 1981).

2.2.3.1.4 Sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P_{450} y b_5 , que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos (Aust *et al.*, 1993; Capdevila *et al.*, 1981). Bajo la denominación de citocromos P_{450} se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidos entre los seres vivos y son considerados como los más poderosos agentes oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Foster *et al.*, 1993).

2.2.3.1.5 Peroxisomas

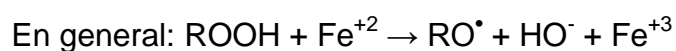
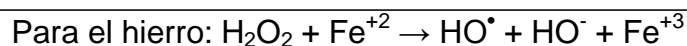
Se denominan peroxisomas y microsomas a pequeñas vesículas (0,3-1,5 μM) provistas de membrana plasmática semipermeable, que contienen varias enzimas que producen o utilizan H_2O_2 .

Se refiere como un conjunto heterogéneo de vesículas membranosas que sedimentan a 100.000. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, para la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen H_2O_2 (Boveris *et al.*, 1972), siendo una fuente importante de este radical. La CAT peroxisomal metaboliza la mayor parte del H_2O_2 formado en los peroxisomas (Barrett *et al.*, 2009; Frei, 1994). Por otro lado, el citocromo P_{450} tiene un papel relevante en los microsomas en la detoxificación de xenobióticos (Philpot, 1991).

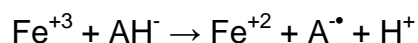
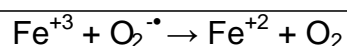
2.2.3.1.6 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Aunque fue Fenton quien descubrió a finales del siglo XIX que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezcla de H_2O_2 y el ion ferroso (Fe^{+2}), fueron Haber y Weiss quienes posteriormente dieron una primera explicación del mecanismo de reacción.

Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo por Fe^{+2} . El hierro parece ser el metal más importante que actúa en los sistemas biológicos, a pesar de que se puede realizar la reacción en menor medida con otros metales diferentes, como el cobre y otros iones. Esta reacción se produce porque el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo.



El Fe^{+2} se oxida con facilidad a Fe^{+3} , que es químicamente más estable y muy insoluble. Por ello, el hierro libre que existe en los sistemas biológicos está en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell *et al.*, 1986). Sin embargo, el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rowley *et al.*, 1983; Sawyer, 1988) y el radical O_2^- (Frei, 1994), con lo que genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



2.2.3.1.7 Otras enzimas y moléculas

En la célula hay una gran variedad de componentes solubles capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, por ejemplo los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahydropterinas. El radical primario formado en la reducción del oxígeno por estas moléculas es el O_2^- . Asimismo, también se produce H_2O_2 como producto secundario a partir de la dismutación

del radical O_2^- (espontáneamente o catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD)).

Algunas enzimas citosólicas solubles como la enzima óxido nítrico sintasa, la aldehído oxidasa, la dihidroorotato deshidrogenasa, la flavinproteín deshidrogenasa y la triptófano dioxigenasa, también generan radicales libres durante su ciclo catalítico. Así mismo, existen enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que producen radicales libres en el metabolismo de su sustrato, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White *et al.*, 1990).

2.2.3.2 Fuentes exógenas

Algunos ejemplos de fuentes exógenas de ERO son:

- Los metales pesados (cobre, cromo, vanadio y cobalto) cuya acción tóxica acontece a nivel de la membrana celular alterando la permeabilidad y el funcionamiento normal de las enzimas implicadas en el transporte activo (Stohs *et al.*, 1995).

- En la dieta ingerimos muchos compuestos de naturaleza prooxidante.

- Los fármacos antineoplásicos (adriamicina, bleomicina, daunorrubicina) y antibióticos producen especies reactivas de oxígeno (Doroshov *et al.*, 1983).

- Los pesticidas (paraquat, malation) que producen un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución de la peroxidación lipídica y una disminución de la capacidad antioxidante (Djukic *et al.*, 2007). Así como aditivos industriales (PCBs, PBDEs) que pueden inducir estrés oxidativo, daño al ADN y apoptosis (Giordano *et al.*, 2008; Venkataraman *et al.*, 2007)

- Además son fuente de radicales libres el humo del tabaco, las radiaciones electromagnéticas, la polución ambiental, el ozono, etc (Ames, 1983; Rock *et al.*, 1996).

2.3) DEFENSAS ANTIOXIDANTES

La clásica definición de antioxidante es cualquier sustancia que, en presencia del sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de tal sustrato. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, su variabilidad operativa y su versatilidad para combinarse con una importante variedad de ERO.

Las defensas antioxidantes celulares, comprendidas fundamentalmente por moléculas y enzimas antioxidantes (EAO), evitan que los ERO se acumulen y ejerzan su efecto lesivo. Sólo cuando la capacidad antioxidante celular es superada podremos esperar que se acumule una cantidad de ERO dañina. Sin embargo, la función de las EAO se entiende hoy en día que va más allá del efecto de barrera defensiva y se interpreta en el contexto de una fina regulación del estado redox celular, con importantes implicaciones en la regulación del ciclo celular y de la muerte celular programada o apoptosis. Por ejemplo, entre las EAO, la superóxido dismutasa manganeso (SOD-Mn) ha sido caracterizada por muchos estudios como enzima antiapoptótica, efecto que ejerce frente a una amplia variedad de estímulos apoptóticos (Bernard *et al.*, 2001a; Kiningham *et al.*, 1999; Manna *et al.*, 1998).

Las ERO pueden ser eliminados mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos que se exponen resumidamente a continuación.

2.3.1. Sistema antioxidante no enzimático

El sistema no enzimático está formado por una serie de compuestos de bajo peso molecular y mayoritariamente de origen exógeno. Estos compuestos, a diferencia de los enzimáticos, se consumen durante su acción antioxidante y deben ser reemplazados. Algunos provienen principalmente de la dieta a través de aportes de vitamina E, vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Además existen algunos componentes de origen endógeno como el glutatión (GSH), la metalotioneina, el ácido úrico, la bilirrubina, la coenzima Q y ciertas proteínas plasmáticas que ejercen un rol protector (Sies *et al.*, 1995a; Sies *et al.*, 1995b).

2.3.2. Sistemas antioxidantes enzimáticos

Probablemente, este sistema constituya la defensa endógena más importante contra el daño provocado por las ERO. El sistema antioxidante enzimático está formado por una serie de enzimas con capacidad antioxidante de origen endógeno, que no se consumen al reaccionar con las ERO y que dependen de ciertos cofactores, generalmente de metales como Cu, Fe, Mn, Zn o Se.

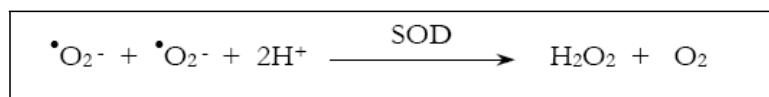
Este sistema constituye la primera y principal línea de defensa contra las ERO. Está integrado por tres enzimas fundamentales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Otras dos enzimas, glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST), no son estrictamente EAO pero colaboran indirectamente con la GPx, contribuyen a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.

En rasgos generales, la SOD cataliza la destrucción del radical O_2^- , formando H_2O_2 como producto de una reacción que es acelerada unas diez mil veces por la SOD (Mc Cord y Fridovich, 1969). La CAT y GPx neutralizan H_2O_2 y lo convierten en H_2O y O_2 . Finalmente, la GR regenera los depósitos intracelulares de GSH, a partir de GSSG y NADPH. La GST cataliza la conjugación de xenobióticos, ERO y toxinas con GSH.

2.3.2.1 Superóxido dismutasa

Poco después del descubrimiento de la actividad de la SOD por McCord y Fridovich en 1969 (McCord *et al.*, 1969), se puso de manifiesto que esta enzima es absolutamente necesaria para mantener la vida en los organismos aeróbicos. Como se mencionó antes, la SOD cataliza la dismutación del O_2^- convirtiéndolo en H_2O_2 , en lo que parece ser la reacción enzimática más rápida conocida. En consecuencia, la pérdida de la función de SOD puede inducir una toxicidad oxidativa celular a través de un aumento de los niveles de O_2^- o, más importante aún, en sus metabolitos derivados como el OH^\bullet o el $ONOO^-$.

En los seres humanos, existen diferentes isoformas de la enzima SOD, diferenciándose en su estructura y según contenga uno u otro ión metálico en su centro activo, separándose en dos clases filogenéticas dependiendo de la similitud en la secuencia de aminoácidos, pero todas ellas catalizan la misma reacción química con una eficacia comparable (Fridovich, 1983). Incluye enzimas localizadas en orgánulos, compartimentos subcelulares y en pequeñas cantidades en líquidos extracelulares. Existen tres isoformas de SOD en los seres humanos; la citoplasmática o cobre/zinc (SOD-Cu/Zn), la mitocondrial o manganeso (SOD-Mn) y una extracelular (SOD-EC) (Zelko *et al.*, 2002). Todas se distribuyen en células eucariotas.



La **SOD Cu/Zn** es dimérica, cianuro sensible, con peso molecular de aproximadamente 32 kDa y su gen se localiza en el cromosoma 11. Aunque habitualmente se encuentra difusa por todo el citoplasma, también se ha localizado en menor medida en el núcleo y, pese a que se describe como ausente en la mitocondria, se ha encontrado en el espacio intermembrana de ésta, en los lisosomas y en los peroxisomas (Keller *et al.*, 1991). Es de lejos la isoforma más abundante de SOD, constituye aproximadamente el 70% de la actividad de la SOD total (Marklund, 1984). Se puede encontrar en el epitelio y en todos los tipos de fagocitos de la mayoría de los órganos (Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000). Se distribuye principalmente en los tejidos con gran actividad metabólica como hígado, cerebro, testículos, riñón y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas.

Aparte de neutralizar el radical O_2^- , SOD-Cu/Zn también puede aceptar H_2O_2 como sustrato para interactuar con el cobre reducido (Cu^+) (Yim *et al.*, 1990). Esta reacción reduce H_2O_2 , con la formación de OH^\bullet . Además, SOD-Cu/Zn puede aceptar ONOO^- como sustrato, formando iones nitronio que, posteriormente, se pueden transferir a los grupos nitrato de tirosinas de diferentes proteínas (Ischiropoulos *et al.*, 1992). La doble función de SOD sobre el O_2^- y el H_2O_2 es cada vez más reconocida. En los seres humanos, la sobreexpresión de SOD-Cu/Zn se ha asociado con el síndrome de Down

(Kedziora *et al.*, 1988) y su gen se ha relacionado con la enfermedad degenerativa de la motoneurona o esclerosis lateral amiotrófica (Rosen *et al.*, 1993).

La **SOD-Mn** es tetramérica, con peso molecular de unos 96 kDa, contiene un átomo de Mn por subunidad y su gen se localiza en el cromosoma 6. Se localiza principalmente en la matriz mitocondrial, pero también se encuentra en el citosol, donde se piensa que tiene lugar su biosíntesis, siendo entonces transportada al interior de la mitocondria. Su presencia en la mitocondria es de gran importancia, puesto que la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris *et al.*, 1973; Kinnula *et al.*, 1995). Constituye aproximadamente el 15% del total de actividad SOD de los tejidos (Marklund, 1984), donde es detectada en las células epiteliales así como en fagocitos. Se distribuye fundamentalmente en aquellos tejidos en los que el proceso respiratorio es alto, como el miocardio. La importancia de esta isoenzima y de la potencial toxicidad mitocondrial del O_2^- producido, se ha ilustrado de manera efectiva en ratones *knockout* para el gen SOD-Mn, que mueren pocos días después del nacimiento, mientras que los *knockout* para SOD-Cu/Zn y SOD extracelular (SOD-EC) sobreviven bastante bien al estrés.

Extracelularmente aparece otra isoforma ligada al cobre y al zinc (**SOD-EC**), descrita más recientemente, tetramérica y caracterizada por su gran peso molecular de unos 135 kDa (Marklund *et al.*, 1982). Posee una alta afinidad por los glicosaminoglicanos, tales como la heparina (Marklund, 1982), por ello puede existir en concentraciones muy altas en los compartimientos extracelulares, mientras que se estima que sólo representa el 0,5-17% de la actividad de la SOD total en los tejidos (Marklund, 1984). Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en el intersticio, con ello probablemente pueda interceptar el daño causado por el O_2^- que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función. Sin embargo, en algunos casos, puede almacenarse intracelularmente en vesículas secretoras, lo cual podría contribuir en la protección contra el radical O_2^- (Marklund, 2002). Finalmente, se ha observado que en el pulmón humano tiene una distribución específica en la matriz del tejido conectivo, en células del músculo liso de alrededor de los

vasos más grandes y en las vías respiratorias (Oury *et al.*, 1994). Basándose en estos hallazgos, se ha especulado que puede contribuir a la protección de los elementos de la matriz de colágeno contra las ERO o participar en la modulación del tono vascular por la prevención de la conversión de NO a ONOO⁻ (Oury *et al.*, 1996).

Finalmente, existe otro tipo de SOD, estrechamente relacionada con la SOD-Mn que contiene hierro, la **SOD-Fe**, de origen procarionota pero que sólo se encuentra en algunas especies de bacterias y plantas.

Sólo un equilibrio o la coordinada acción de las tres enzimas SOD (Mn, Cu/Zn y Fe) asegura una baja concentración de ERO en la célula, y por lo tanto sus actividades deben ser reguladas de manera muy precisa. La regulación de la expresión de las isoenzimas SOD se ha investigado en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* y todos coinciden en que la SOD-Cu/Zn se expresa constitutivamente, mientras que la SOD-Mn es altamente inducible.

La transcripción del gen SOD-Cu/Zn parece estar controlada por factores relacionados con el Sp-1 y se afecta ligeramente por la exposición a citoquinas, oxidantes u otras formas de estrés, como la radiación ultravioleta. Además de su expresión constitutiva, en los macrófagos, la actividad SOD-Cu/Zn puede ser inducida por las hormonas tiroideas y la insulina. El gen SOD-Cu/Zn está regulado por los factores de transcripción NF- κ B y el factor activador de la proteína 1 (AP-1), lo que hace que sea fácilmente inducible en condiciones inflamatorias.

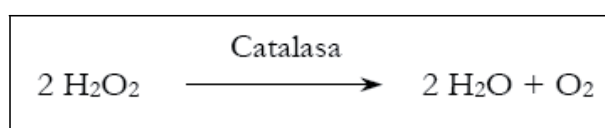
La expresión de la SOD-EC, como el caso de SOD-Cu/Zn es constitutiva, no está influenciada por su sustrato u otras ERO. Sin embargo, puede elevarse por el IFN- γ y disminuir por la IL-1, TNF- α y TGF- β (Allen *et al.*, 2000).

La regulación de la expresión de SOD-Mn se ha demostrado tras la exposición a diversos oxidantes como el TNF- α , la interleucina (IL)-1 y la IL-6, el interferón (IFN)- γ , la irradiación o las endotoxinas. La insulina y dexametasona pueden reducir la actividad de la SOD-Mn tanto en los macrófagos como en las células epiteliales intestinales.

Existe evidencia científica que relaciona diferentes SNPs de SOD-Mn con el desarrollo de enfermedades crónicas y autoinmunes, así como con distintos cánceres. En este sentido el SNP rs4880 se ha relacionado con el Parkinson (Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1996) y con la diabetes mellitus (Flekac *et al.*, 2008). La demencia de Alzheimer se ha relacionado con SNPs de SOD como el rs5746136 y el rs2758346 (Wiener *et al.*, 2007). La espina bífida se ha correlacionado con otros polimorfismos de SOD como el rs5746096 y el rs2758346 (Davidson *et al.*, 2008). El lupus eritematoso sistémico también se ha visto correlacionado con diferentes SNPs de SOD-Mn como el rs52812045 (Piotrowski *et al.*, 2010; Sobkowiak *et al.*, 2008). Otros polimorfismos como el rs2758339 se han relacionado con el riesgo de aparición de numerosos cánceres (Bag *et al.*, 2008; Hernandez-Saavedra *et al.*, 2009; Sutton *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Wheatley-Price *et al.*, 2008).

2.3.2.2. Catalasa

Esta enzima se halla fundamentalmente en los peroxisomas (Tolbert *et al.*, 1981), si bien recientemente se ha descrito cierta actividad CAT en mitocondrias y en el citosol también (Rodriguez *et al.*, 2000). Su actividad en el medio extracelular es insignificante. Posee un peso molecular muy alto de 240 kDa y su gen en humanos se localiza en el cromosoma 11. Es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de Fe realiza el intercambio redox.



CAT es una de las enzimas conocidas más eficientes sin embargo, aunque actúa sobre todo cuando las concentraciones de H_2O_2 son elevadas y se distribuye ampliamente por los tejidos. Se encuentra en altas cantidades en hígado, riñón y eritrocitos. Se ha descrito su presencia en la mitocondria de corazón y en intestino (Bhaskar *et al.*, 1995; Durak *et al.*, 2000), pero no en la de otros tejidos incluido el músculo esquelético (Turrens, 2003). Su actividad varía no sólo según el órgano, sino en la misma célula; algunas de ellas estimulan la producción de CAT ante incrementos de la producción de H_2O_2 .

Algunos datos de la literatura científica centraron nuestro interés en intentar dilucidar las consecuencias de esta inhibición permanente de la CAT en los pacientes con EC. En el lupus eritematoso sistémico la patogenia es desconocida, sin embargo es una entidad autoinmune de naturaleza inflamatoria donde el estrés oxidativo se ha visto implicado en la patogenia (Bauer *et al.*, 1999) con el consecuente daño oxidativo (Kurien *et al.*, 2003; Warchol *et al.*, 2008). Un estudio ha reportado en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico un aumento de la actividad SOD y de los niveles de MDA así como una disminución de las enzimas GPx y CAT (Taysi *et al.*, 2002). Argumentan que el aumento de O_2^- es convertido en H_2O_2 por un aumento de actividad SOD, pero que el H_2O_2 no puede ser detoxificado por las enzimas CAT y GPx porque su actividad está disminuida. Este H_2O_2 es convertido pues en radical hidroxil y ácido hipocloroso por la mieloperoxidasa, lo cual se traduce en un aumento del MDA reflejo del daño por estrés oxidativo. Además, en la literatura existen descritas varias mutaciones de la enzima CAT (Goth *et al.*, 2004) las cuales tienen relación con el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus (Chistiakov *et al.*, 2000), el vitíligo (Casp *et al.*, 2002; Schallreuter *et al.*, 1991) o la hipertensión (Jiang *et al.*, 2001). Desde el punto de vista clínico, se han descrito situaciones de acatalasemia que puede manifestarse bajo una condición homocigota (con un 10 % de actividad CAT residual) o en condiciones heterocigotas (manteniendo un 50% de actividad CAT). En general, la acatalasemia es un síndrome relativamente benigno cuya manifestación descrita clásicamente es la ulceración y gangrena oral (enfermedad de Takahara) (Gross *et al.*, 1977; Matsunaga *et al.*, 1985), la cual podría producirse por una deficiencia de CAT en el tejido oral, donde se considera que jugaría un papel importante la flora bacteriana, el grado de higiene y otros factores ambientales. Últimamente se han descrito otras manifestaciones clínicas en relación a una alteración del metabolismo lipídico y por tanto, un aumento del riesgo de enfermedad arterial coronaria (Goth, 2000). Recientemente se ha revisado todas las situaciones de acatalasemia descritas, así como las alteraciones genéticas que las determinan (Ogata *et al.*, 2008).

Existe evidencia científica que relaciona diferentes SNPs de CAT con el desarrollo de enfermedades crónicas y autoinmunes. Así el rs7943316 con

fenotipo AA se asocia con aumento del riesgo de asma en relación a la exposición de oxidantes (tabaco) y a la toma de antioxidantes (vegetales) (Polonikov *et al.*, 2009). El polimorfismo rs1001179 con el fenotipo -262 TT se ha asociado con un menor grado de actividad en la artritis reumatoide (Bohanec Grabar *et al.*, 2009). Polimorfismos como rs769217, rs704724 y rs1001179 se han relacionado con el vitíligo (Em *et al.*, 2007; Gavalas *et al.*, 2006). Otros SNPs como el rs7943316, rs1049982, rs525938, rs2268064, rs2300182, rs3758730 y rs2284365 tienen alta influencia en el desarrollo de osteonecrosis tanto protegiendo como ayudando en la aparición de la enfermedad (Kim *et al.*, 2008). Finalmente, los SNPs rs494024, rs12273124 y rs475043 se han asociado con la aparición de sordera en sujetos expuestos a altos niveles de ruido donde es conocido que el aumento de estrés oxidativo es un factor clave en la aparición de la enfermedad (Konings *et al.*, 2007).

Sin embargo, no toda alteración de la actividad CAT depende de una mutación, sino que en ocasiones, como en las células tumorales, es debida a una disminución de la expresión del gen (Goth *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1992) o bien es debida al efecto de mecanismos reguladores post transcripcionales.

Estudios realizados "in vivo", aunque en animales, demuestran que la exposición de células al TNF- α también determina una disminución de la actividad CAT (Yasmineh *et al.*, 1991) así como de la expresión de ARNm de CAT (Beier *et al.*, 1997). Además, experimentalmente se ha observado que la enzima CAT se regula post-transcripcionalmente gracias a una proteína de pulmón de rata que degrada el ARNm de CAT (Clerch *et al.*, 1992) y, asimismo, hay varias moléculas de señalización, como son distintas proteinkininas (PKA, PKC γ y PKC ζ), proteínfosfatasas (1 γ y 2A), que pueden modificar su actividad (Yano *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha descrito recientemente un mecanismo que relaciona la regulación de la CAT con la respuesta inflamatoria, de modo que (Perez-Rivero *et al.*, 2008) se describe "in vitro" que una deficiencia de telomerasa, enzima que impide el acortamiento de telómeros y, por tanto, el envejecimiento celular, induce una disminución de la actividad CAT con la consecuente producción de radicales libres, los cuales a su vez promueven la síntesis de citoquinas

profibróticas (como el TGF- β 1) y de proteínas de la matriz extracelular (tales como fibronectina). Por lo tanto, por primera vez se demuestra que la modificación de la actividad CAT va emparejada a modulaciones de síntesis de citoquinas y, por tanto, tiene un impacto funcional más allá de la simple defensa antioxidante.

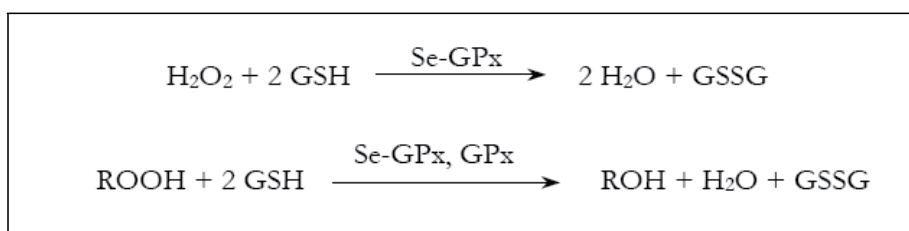
2.3.2.3. Glutación peroxidasa

La GPx desempeña la misma función que la CAT, pero con mayor afinidad por el H₂O₂, por ello juega un papel primordial en su detoxificación y también en la de los lipoperóxidos que se generan en las células, evitando la oxidación de lípidos mediada por el ONOO⁻. Al igual que la CAT, también puede contener hierro.

La GPx a nivel intracelular se localiza en el citosol y menos en la matriz mitocondrial y los peroxisomas. Las diferentes isoenzimas que se conocen se expresan en tejidos específicos de los mamíferos, algunas se han localizado en las células de absorción del epitelio intestinal (Tham *et al.*, 1998).

Se ha expuesto anteriormente que CAT y GPx funcionalmente son iguales, no obstante, GPx reviste mayor importancia porque posee más afinidad por el H₂O₂ y actúa con niveles bajos de éste. Además, en células inflamatorias de humanos, GPx y su sustrato glutación, se encuentran preferentemente en monocitos frente a neutrófilos, mientras que CAT está en niveles mucho más altos en los neutrófilos que en los monocitos. Todas estas observaciones junto con diversos datos *in vitro* (Hata *et al.*, 1997; Masaki *et al.*, 1998), indican que el glutación/GPx en el ciclo redox actúa como la defensa principal contra una baja y continua exposición al H₂O₂, mientras que CAT se vuelve más significativa en las condiciones de estrés oxidativo agudo grave. Existen estudios que parecen indicar que la función primordial de la enzima CAT no sería tanto la de detoxificar H₂O₂, sino la de la regulación de la apoptosis (Nenoi *et al.*, 2001). En este sentido, el gen de la CAT parece ser insensible al estrés oxidativo de forma que no se expresa cuando aumentan las ERO y por tanto, se considera un gen "housekeeper" no regulado (Yoo *et al.*, 1994).

Hay dos tipos de GPx, una forma dependiente de selenio (Se) y otra que no lo es (Ketterer, 1986). En la primera, denominada GPx1, el Se es un elemento esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína, es tetramérica, de unos 80 kDa y su gen se localiza en el cromosoma 3. Elimina tanto hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2). La otra forma no tiene Se, posee menor peso molecular, es dimérica y sólo es capaz de eliminar ROOH.



Existe poca información a cerca de la regulación de la expresión de la enzima GPx metabolizadora del H_2O_2 . Sus niveles de expresión son inducidos por la exposición a H_2O_2 . La insulina aumenta las actividades de GPx, y también de CAT, en macrófagos; mientras que las hormonas tiroideas y glucocorticoides reducen su actividad.

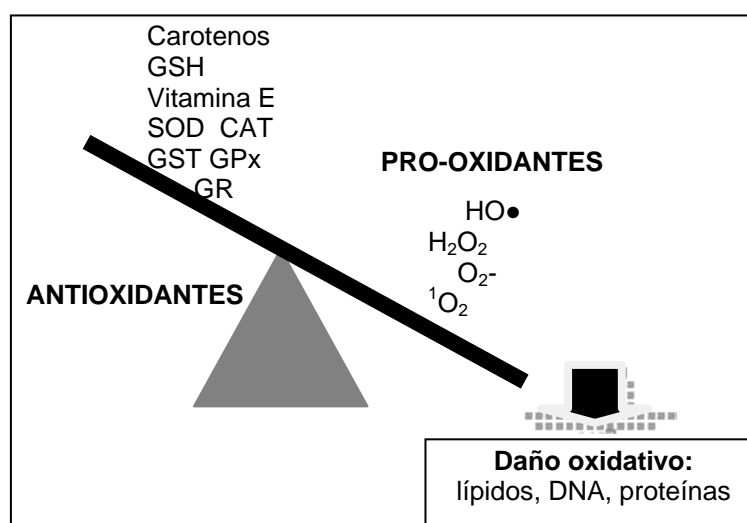
2.4) ESTRÉS OXIDATIVO

2.4.1. Concepto

Los organismos han desarrollado mecanismos de defensa frente a la acción tóxica de los radicales libres, que permiten su eliminación o transformación en moléculas estables. La formación de un gran número de ERO derivadas del O_2 , si no es contrarrestada por agentes antioxidantes, provocan lesiones intra y extracelulares (Cerutti *et al.*, 1991). Para contrarrestar los efectos nocivos de las ERO, el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante. Al conjunto de estos mecanismos se le llama **capacidad antioxidante** del organismo.

Todos los sistemas biológicos están en un estado de equilibrio aproximado entre las fuerzas prooxidantes y la capacidad antioxidante. Cuando la producción de ERO por las células excede su capacidad de interceptarlos y eliminarlos alcanzando unos niveles tóxicos, se produce un desequilibrio oxidativo que se conoce como **estrés oxidativo**. No obstante, aunque ésta es la situación más habitual, el estrés oxidativo puede originarse bien por un exceso de sustancias pro-oxidantes, bien por una deficiencia de agentes antioxidantes o por ambos factores a la vez.

Figura 2.4. Balanza prooxidante-antioxidante en situación de desequilibrio a favor del daño oxidativo.



2.4.2. Índices de estrés oxidativo.

Los mecanismos por los que las ERO producen lesión celular son complejos, además pueden lesionar diversos tipos de estructuras diana, lo cual depende del agente reactivo y de su lugar de generación. La oxidación se produce principalmente a nivel de lípidos, glúcidos, ácidos nucleicos y proteínas. Las ERO atacan a estas biomoléculas y son capaces de oxidarlas causando pérdida de función, acumulación de moléculas oxidadas, mutaciones, etc. Los lípidos son los más susceptibles a ser dañados oxidativamente y dentro de ellos los ácidos grasos poliinsaturados (Cheeseman *et al.*, 1993).

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Podemos determinar el impacto del estrés oxidativo sobre el organismo midiendo de forma indirecta los productos de la oxidación de las diferentes biomoléculas.

2.4.2.1 Daño oxidativo a lípidos

Todas las células están rodeadas por una membrana celular que las separa del medio extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Los lípidos de las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles de sufrir lesión oxidativa.

El mecanismo se denomina peroxidación lipídica y comienza cuando una ERO, generalmente $\text{OH}\bullet$, ataca un carbono, sobre todo a nivel de dobles enlaces (altamente reactivos) de las cadenas hidrofóbicas de fosfolípidos que forman la bicapa de las membranas biológicas. Éstos actúan eliminando un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados y generando un radical alquílico, el cual reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $\text{R-COO}\bullet$. Estos radicales pueden a su vez reaccionar con otras cadenas de ácidos grasos adyacentes dando lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, principalmente aldehídos (malondialdehído o MDA) e hidrocarburos de cadena corta (etano y etileno) (Frei, 1994; Halliwell, 1994). De

esta forma se propaga la reacción y los fosfolípidos se destruyen y desorganizan.

La acumulación de hidroperóxidos en la membrana celular tiene un profundo efecto sobre su fluidez, así como sobre la actividad de las enzimas de membrana transportadoras, los receptores de membrana y otras proteínas (Jourd'Heuil *et al.*, 1993). El resultado de la peroxidación lipídica produce cambios en la permeabilidad y la selectividad de la membrana con pérdida de su funcionamiento y, en última instancia, conduce a alteraciones en la homeostasis y el metabolismo celular. Por otra parte, los hidroperóxidos y aldehídos, son directamente tóxicos para las células y sus organelas, tienen propiedades quimiotácticas de neutrófilos y puede regular la producción de citoquinas (Aw, 1998).

La peroxidación de lípidos se acelera sólo cuando los sistemas de desintoxicación celular no han logrado eliminar de manera eficaz los precursores de $\text{OH}\bullet$, en particular el H_2O_2 . Una vez iniciada la reacción, la peroxidación de lípidos es combatida satisfactoriamente por los antioxidantes liposolubles como el α -tocoferol (vitamina E), aunque también se ha demostrado que el NO puede actuar como un antioxidante que rompe la cadena contra la peroxidación lipídica (Hogg *et al.*, 1999).

2.4.2.2 Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas son importantes constituyentes de las células y todos los aminoácidos presentes en ellas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres. La tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Una pequeña modificación puede suponer un gran cambio en la actividad biológica de la proteína.

Para que las ERO produzcan daño a las proteínas, es necesario que se acumulen o que el daño vaya dirigido a un lugar concreto de la proteína. El radical $\text{OH}\bullet$ es el más efectivo en la inducción del daño oxidativo a proteínas. Generalmente, el proceso conlleva la introducción de grupos carbonilo e hidroxilo que provocan un cambio de la función, del recambio y degradación de

la proteína. Otros efectos secundarios incluyen la fragmentación, el *cross-linking* y el desdoblamiento de proteína. De esta forma el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman *et al.*, 1992). También es conocido que el radical OH^\bullet interactúa con muchos aminoácidos y, en ocasiones, genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición, hecho muy frecuente.

Otra modificación permanente que puede afectar desfavorablemente la función biológica de proteínas es la nitración de residuos de tirosinas por ONOO^- . La tirosina es un aminoácido importante, implicado en reacciones de de- y fosforilación y en las vías de transducción de señales. La nitración no sólo puede comprometer la función de la proteína, sino que también puede tener consecuencias serias en la regulación celular. Es de gran interés que las enzimas SOD que catalizan la reacción de dismutación del radical O_2^- para formar H_2O_2 , han sido identificadas como objetivos específicos de nitración. Se ha observado que la nitración de la SOD-Cu/Zn citoplasmática *in vitro* ocurre sin la producir pérdida de la actividad enzimática (Ischiropoulos *et al.*, 1992), mientras que en modelos de rechazo de transplante de riñón la nitración de la tirosina de SOD-Mn mitocondrial se asocia con pérdida de la función de la enzima (MacMillan-Crow *et al.*, 1996). Sin embargo, se debe mencionar que la nitración e inactivación de la proteína también podría ocurrir por una vía ONOO^- independiente, es decir, catalizada por la mieloperoxidasa.

Además, muchas ERO son capaces de oxidar los grupos sulfhidrilos (-SH-) de las proteínas alterando su conformación espacial y, como consecuencia, su función.

Los cambios en la estructura de las proteínas también pueden ser debidos a errores en la síntesis de las mismas por el efecto de los ERO. La nueva estructura molecular formada puede provocar la pérdida de funcionalidad e iniciar una cadena de alteraciones en el metabolismo celular. En general, enzimas proteolíticas presentes en la célula eliminan rápidamente la mayor parte de proteínas dañadas. El grado de afectación de la célula por el ataque de las ERO a proteínas es muy amplio y si el organismo no responde de

manera adecuada, teniendo en cuenta que las proteínas regulan multitud de funciones, las ERO pueden favorecer la aparición de patologías graves.

2.4.2.3 Daño oxidativo al ADN

Tanto el ADN nuclear como mitocondrial son puntos de ataque de las ERO, los cuales pueden producir alteraciones estructurales en el ADN, por rotura de las hebras y alteración por hidroxilación de las bases que la componen, conduciendo a la depleción de la adenosina trifosfato y a mutaciones génicas, que producirán transformación maligna o muerte celular.

El O_2^- es relativamente poco reactivo con el ADN, en cambio tanto el NO como el ONOO⁻ han sido implicados en el daño directo a la cromatina (Cuzzocrea *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1992). El radical OH[•] es el que produce la mayor parte de alteraciones y ataca cualquier posición del azúcar desoxirribosa del ADN provocando la ruptura de una o las dos cadenas. Una vez el H₂O₂ escapa de la neutralización por enzimas citosólicas y alcanza el núcleo, reacciona con el hierro de la cromatina (o el cobre liberado por la SOD-Cu/Zn) produciendo OH[•] *in situ*, el cual atacará los residuos de ADN cercano. La protección contra el daño del ADN mediado por OH[•] puede venir de una proteína rica en tiol, la metalotioneína, que no puede eliminar todo el OH[•], de forma que se acumula en el núcleo de célula durante las fases del ciclo.

La oxidación de las bases nitrogenadas del ADN por acción de las ERO da lugar a diversos productos. Tres de las bases modificadas más importantes son: la guanina que se oxida a 8-hidroxiguanina y su equivalente 2'-deoxinucleósico, la 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG); la adenina que se oxida a 8-hidroxiadenina; y la timina que se oxida a timina glicol. Estos productos de oxidación pueden ser usados para determinar el grado de ataque de las ERO al ADN (Cathcart *et al.*, 1984; Shigenaga *et al.*, 1989).

Aunque existen enzimas que reparan las alteraciones del ADN (por ejemplo, la ya comentada metalotioneína), si el daño es muy extenso, no pueden reparar todo. Consecuentemente, durante la replicación de ese ADN dañado, las ADN polimerasas incorporan bases equivocadas al leer la base oxidada, perpetuando la mutación y transmitiéndola a las futuras generaciones celulares.

2.5) ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

2.5.1. Evidencia de estrés oxidativo en la EII

En los últimos años, se ha prestado especial atención al papel del estrés oxidativo como agente etiológico y/o factor desencadenante de la EII, lo que ha despertado un interés creciente y ha sido progresivamente revisado (Kruidenier *et al.*, 2002; Pavlick *et al.*, 2002; Rezaie *et al.*, 2007).

Las células inmunes activadas que alcanzan la mucosa en la EII liberan una serie de ERO que son potencialmente perjudiciales, sobre todo cuando existe una disminución de las defensas antioxidantes y el estrés oxidativo se ha establecido (Fantone *et al.*, 1982; Grisham, 1994). De hecho, en las células epiteliales de la mucosa de los pacientes con EII existe evidencia de lesión secundaria al efecto de las ERO y una disminución de las defensas antioxidantes (Kruidenier *et al.*, 2003a; Kruidenier *et al.*, 2003c; Lih-Brody *et al.*, 1996; McKenzie *et al.*, 1996; Mulder *et al.*, 1991; Tuzun *et al.*, 2002). La medición del daño oxidativo *in vivo* en humanos con EII, se ha basado fundamentalmente en la evaluación de moléculas oxidativamente modificadas. Respecto al daño oxidativo a lípidos, se han documentado incrementos de los niveles de metabolitos tipo MDA y 4-hidroxinonanal en la mucosa de pacientes con EII (Chiarotto *et al.*, 1997; Selley, 1997), así como también, aumento de la excreción de etano y pentano en la respiración de estos pacientes como marcadores no invasivos de peroxidación lipídica, que en muchas ocasiones se correlacionaban con la actividad de la enfermedad (Aghdassi *et al.*, 2000; Pelli *et al.*, 1999; Sedghi *et al.*, 1994).

El daño oxidativo al ADN en la mucosa ha sido evaluado en un solo estudio encontrando un incremento en los niveles de 8-oxo-dG (Lih-Brody *et al.*, 1996). En relación al daño oxidativo a proteínas, en este mismo trabajo se ha reportado un incremento del contenido de carbonil (Lih-Brody *et al.*, 1996) y por inmunohistoquímica se ha establecido un aumento de la 3-nitrotirosina (indicador de la nitración de residuos de tirosinas por ONOO⁻) en las células mononucleares de la lámina propia de estos pacientes, correlacionándose con

la actividad de la enfermedad (Dijkstra *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1996).

Además, el daño oxidativo parece afectar de igual modo a los leucocitos de sangre periférica así como la consecuente bajada de las defensas antioxidantes plasmáticas (D'Odorico *et al.*, 2001; Kitahora *et al.*, 1988; Koutroubakis *et al.*, 2004). No obstante, los niveles excesivos de ERO en la EII en comparación con los sujetos sanos no sólo se detectan en la mucosa y leucocitos de sangre periférica, sino en una gran variedad sustancias orgánicas como el plasma, el suero, la saliva y el aire exhalado sobre todo en los pacientes con EC (Rezaie *et al.*, 2006; Tuzun *et al.*, 2002; Wendland *et al.*, 2001).

2.5.2. Especies reactivas de oxígeno

En la mayoría de los estudios realizados hasta ahora, la presencia de ERO en la EII se ha medido indirectamente, de acuerdo a los niveles de las moléculas dañadas por oxidación (Kruidenier *et al.*, 2002), siendo pocos los estudios que se han llevado a cabo para caracterizar las ERO directamente implicadas. La razón principal de esto radica, sin duda, en la dificultad técnica para medir directamente en células y tejidos, debido a la corta vida media biológica de las ERO. A lo largo de los años, varias técnicas de fácil manejo han sido desarrolladas para realizar medidas, como la histoquímica y ensayos colorimétricos, pero todas ellas carecen de la sensibilidad y especificidad suficiente. Se podría argumentar que las técnicas para la medición de compuestos de corta vida media biológica son caras y está restringida su aplicación (Faulkner *et al.*, 1993; Mueller, 2000; Togashi *et al.*, 2000). Es el caso de las técnicas más eficientes para medir las ERO, como la ESR (electron spin resonance), la espectroscopia y la quimioluminiscencia, que implican un equipo de laboratorio muy caro y altamente especializado. Además, la mayor parte de estos estudios se realizan *ex vivo* y su extrapolación a la situación *in vivo* es cuestionable.

Sin embargo, durante las últimas décadas, muchos estudios han demostrado que los niveles de ERO específicas pueden ser detectados por una técnica

bastante accesible, la citometría de flujo mediante tintes fluorescentes (Armstrong *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 1994; Matteucci *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2004). Existen estudios que han evaluado niveles de ERO directamente en la EII aplicando técnicas de quimioluminiscencia sobre biopsias de colon de pacientes con CU y EC. Sus resultados han sido constantes. Al comparar con mucosa control normal, la producción de ERO es considerablemente superior en las muestras de mucosa de EII, además se correlaciona positivamente con el grado de actividad de la enfermedad y parece ser derivada de neutrófilos (Keshavarzian *et al.*, 1992; Lih-Brody *et al.*, 1996; Sedghi *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1992). De igual forma, los niveles de NO se encuentran aumentados en la mucosa del colon de estos pacientes y se correlacionan también con los índices de actividad clínica y endoscópica de la enfermedad (Herulf *et al.*, 1998; Rachmilewitz *et al.*, 1998; Rachmilewitz *et al.*, 1995). Además, de forma indirecta se ha confirmado el incremento de NO, mediante el hallazgo en mucosa de un aumento de actividad y de los niveles de proteína de la enzima óxido nítrico sintetasa (Boughton-Smith *et al.*, 1993; Dijkstra *et al.*, 1998; Godkin *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998; Kolios *et al.*, 1998; Leonard *et al.*, 1998; McLaughlan *et al.*, 1997; Rachmilewitz *et al.*, 1995; Singer *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998). Así, ambas mediciones, directas e indirectas, de las ERO en la EII sugieren fuertemente la existencia en la mucosa de un incremento de la producción y exposición al O_2^- , NO o a sus metabolitos intermedios.

2.5.3. Situación de las defensas antioxidantes

Las diferencias en la regulación de la expresión entre las enzimas SOD, CAT y GPx pueden no sólo reflejar sus diferentes funciones en condiciones fisiológicas normales, sino que también pueden poner en peligro la eliminación eficaz de las ERO en condiciones inflamatorias tales como la EII. Una disminución en la actividad de las EAO o un desequilibrio de sobre-expresión de una de estas enzimas, puede aumentar la vulnerabilidad de las células a las ERO. Así pues, un aumento de la SOD contribuye a la eliminación del O_2^- de la célula pero a su vez aumenta la producción de H_2O_2 , lo que podría ser perjudicial si no existe o no hay disponible suficiente CAT o GPx. Del mismo modo, un exceso de GPx innecesariamente podría agotar el glutatión y/o las

reservas de NADPH, a pesar de que la CAT esté presente. Este concepto de desequilibrio en la respuesta antioxidante de la enzima ha sido apreciado en diversas enfermedades inflamatorias (Gaetani *et al.*, 1998; Moysan *et al.*, 1993; Picardo *et al.*, 1996). Además existen estudios que han descrito una pérdida del efecto antioxidante en presencia de una actividad elevada de SOD y en ausencia de suficiente CAT o GPx, lo cual se ha atribuido a que el H₂O₂ formado por la SOD y en ausencia de CAT, puede ser convertido, de acuerdo con la reacción de Fenton, en el hidroxil que es otro radical de oxígeno muy tóxico (McCord, 1993).

La expresión de antioxidantes en los pacientes con EII se ha analizado en varios estudios, los cuales han detectado un desequilibrio en la concentración de antioxidantes, confirmando la presencia de estrés oxidativo en los órganos vitales de los pacientes con EII (Aghdassi *et al.*, 2003; Fernandez-Banares *et al.*, 1989; Jahanshahi *et al.*, 2004; Koutroubakis *et al.*, 2004; Kruidenier *et al.*, 2003c; Mulder *et al.*, 1991; Rezaie *et al.*, 2006; Tuzun *et al.*, 2002; Wendland *et al.*, 2001).

Respecto a la actividad total de la SOD existen trabajos en CU pero no en EC y los resultados son dispares sin correlacionarse con la actividad (Durak *et al.*, 2000). La expresión intestinal endógena de las diferentes isoformas de la SOD ha sido poco investigada. Una disminución de la actividad y concentración de la proteína SOD Cu/Zn ha sido reportada en granulocitos de sangre periférica (Verspaget *et al.*, 1988) y en la mucosa de EC con enfermedad activa (Lih-Brody *et al.*, 1996; Mulder *et al.*, 1991). Sin embargo, sólo existe un estudio realizado con las tres isoformas de SOD y comparando mucosa inflamada y no inflamada (Kruidenier *et al.*, 2003b). Este trabajo revela cambios de expresión de las tres isoformas de la enzima SOD en el epitelio de la mucosa intestinal de los pacientes con EC. Observan un incremento de SOD-Mn en la mucosa sana e inflamada de estos pacientes, mientras que la SOD-Cu/Zn se encuentra disminuida únicamente en la mucosa inflamada. De igual forma, la actividad enzimática de la SOD-Cu/Zn presenta igual distribución pero la SOD-Mn no presenta incremento, lo que sugiere que se encuentre de forma inactiva en estos pacientes. Este desorden en la cascada antioxidante podría contribuir a la inducción y perpetuación de la inflamación en estos pacientes y apoya una

vez más la posibilidad de que la mitocondria juegue un papel en la patogenia de la EC.

En la literatura existen trabajos que correlacionan diferentes polimorfismos de SOD con la EII. En este sentido un trabajo llevado a cabo en 134 pacientes con CU comparado con 125 controles sanos asocia al SNP de SOD-Mn SOD2 Ala-9Val (rs4880) con la CU y a su genotipo homocigoto T/T con la aparición más temprana de la enfermedad (a los 20 años o antes) (Kosaka *et al.*, 2009). Además otro estudio asocia a este polimorfismo Ala-9Val de SOD mitocondrial con el desarrollo de cáncer colorrectal en una población hispana (Stoehlmacher *et al.*, 2002).

El H₂O₂ puede ser metabolizado por dos enzimas diferentes, la GPx y la CAT. Diferentes estudios previos han demostrado que la enzima GPx está aumentada tanto en las biopsias de colon (Kruidenier *et al.*, 2003c) como en el plasma (Hoffenberg *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1994; Tuzun *et al.*, 2002) de los pacientes con EC activa e inactiva considerándose un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo. Existen dos estudios que han reportado un incremento de la actividad de GPx en la mucosa de los pacientes con EC ileal (Iantomasi *et al.*, 1994) así como en la CU (Iantomasi *et al.*, 1994; Sturniolo *et al.*, 1998). Sin embargo, otros estudios en mucosa han observado que la GPx parece que no sufre variaciones en la CU (Bhaskar *et al.*, 1995; Durak *et al.*, 2000). Respecto a la actividad determinada en sangre periférica, Maor *et al.* encontraron que los pacientes con EC activa presentaban niveles de actividad en suero de la GPx más elevados que los pacientes control, no encontrando diferencias entre los controles y los pacientes con EC inactiva (Maor *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio reciente no ha encontrado diferencias en los niveles de GPx en plasma de pacientes con EC activa, inactiva y controles sanos (Akman *et al.*). Respecto a los niveles de GPx medidos en eritrocitos, los hallazgos son más constantes y todos los estudios apuntan a una disminución en la actividad de la GPx en los pacientes con EC comparado con los controles sanos (Reimund *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1994).

La actividad de CAT intestinal en la EII ha sido evaluada en unos pocos estudios y parece no afectarse. Se ha observado que la actividad CAT medida

en mucosa se mantiene tanto en la CU (Bhaskar *et al.*, 1995; Durak *et al.*, 2000) como en la EC de colon (Aimone-Gastin *et al.*, 1994; Bhaskar *et al.*, 1995; Durak *et al.*, 2000; O'Morain *et al.*, 1984). No obstante el status de la enzima CAT en sangre periférica ha sido poco estudiado en la EC y el conocimiento generado sobre la misma ha venido fundamentalmente de estudios farmacológicos realizados con líneas celulares tumorales (Chovolou *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 1998; Neno *et al.*, 2001).

2.5.4. Fuentes de especies reactivas de oxígeno

Se ha investigado poco en relación con las posibles fuentes de ERO en la EII. Sin embargo, está bien establecido que las mitocondrias son unas organelas esenciales para la producción de ERO y que la disfunción de éstas o la inhibición de la cadena respiratoria se consideran una fuente importante de ERO (Kakkar *et al.*, 2007). La mitocondria, a través de la producción de ERO, han sido implicadas en la regulación de la autoinmunidad, la apoptosis y la autofagia (Chen *et al.*, 2008; Matteucci *et al.*, 2008). Además, las citocinas, incluyendo el TNF- α , son capaces de inducir la producción de ERO en la mitocondria (Ko *et al.*, 2001; Schulze-Osthoff *et al.*, 1992). Sin embargo, el estado de la función mitocondrial nunca se ha caracterizado en la EII, aunque estudios recientes han observado, mediante microscopía electrónica y confocal, la existencia de cambios morfológicos en las mitocondrias localizadas en la región apical de los enterocitos ileales de los pacientes con EII (Soderholm *et al.*, 2002). En este estudio, la alteración de la permeabilidad intestinal se relacionó con la depleción de ATP en el epitelio intestinal y con la presencia de cambios mitocondriales morfológicos, sugiriendo un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. También se ha hipotetizado, basándose en una situación clínica, la posibilidad de que la mitocondria juegue un papel en la patogenia de la EC (Restivo *et al.*, 2004) y se han publicado trabajos que centran el defecto apoptótico, sobradamente demostrado de la EII, en un defecto de la vía apoptótica mitocondrial (Doering *et al.*, 2004; Sturm *et al.*, 2004).

Cabe destacar que muchos estudios han medido por separado sólo las ERO (Fantone *et al.*, 1982; Fernandez-Banares *et al.*, 1989; McKenzie *et al.*, 1996; Wendland *et al.*, 2001) o sólo la capacidad antioxidante (Koutroubakis *et al.*,

2004; Kruidenier *et al.*, 2003c; Mulder *et al.*, 1991; Rezaie *et al.*, 2006) con el fin de mostrar el estrés oxidativo en la EII. Sin embargo, es importante tener en cuenta que en un mismo estudio es de igual importancia medir tanto los niveles de ERO como el estado antioxidante de las células, a fin de evitar el sesgo que podría resultar de la consideración de un solo lado de la balanza (Rezaie *et al.*, 2007). Además, conviene señalar que parece existir una alteración de la capacidad para producir ERO en las células inmunes periféricas de los pacientes con EII y se cree que esta alteración, que implica una respuesta inmune anormal, ocurre antes de que las células lleguen a la mucosa intestinal (Curnutte *et al.*, 1974; Kitahora *et al.*, 1988), aspecto que se ha sugerido pero que está pendiente de demostrar.

En el momento actual no están bien caracterizados el origen de los ERO, los radicales responsables del daño oxidativo, el estado concreto del conjunto de las defensas antioxidantes y tampoco se ha analizado si el estrés oxidativo aparece o se exagera con el brote clínico de la enfermedad o por el contrario está presente de forma continua en los pacientes con EII.

2.6) APOPTOSIS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Ha sido reiteradamente reportada la existencia de alteraciones en la capacidad de apoptosis y en la respuesta inmune de las células implicadas en la EII (Boirivant *et al.*, 1999; Xavier *et al.*, 2007). Se ha observado que los linfocitos obtenidos a partir de muestras de mucosa intestinal de estos pacientes son más resistentes a desarrollar apoptosis que los linfocitos obtenidos en idénticas condiciones de sujetos control sanos (Boirivant *et al.*, 1999; Ina *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2001). Esta resistencia contribuye a generar una respuesta inmune sostenida y lesiva en la mucosa intestinal, que en última instancia estaría favoreciendo el daño tisular asociado al proceso inmunológico exacerbado. Sin embargo, parece que los linfocitos de sangre periférica no muestran esta resistencia a la apoptosis en pacientes con EC activa (Boirivant *et al.*, 1999; Doering *et al.*, 2004). Hasta la fecha, no hay estudios que hayan clarificado si la resistencia a la apoptosis de los linfocitos de la EC es un defecto intrínseco a ellos o adquirido tras su llegada a la mucosa intestinal y dirigido por los estímulos ambientales-inflamatorios con los que se enfrentan.

Probablemente los mecanismos que regulen la capacidad apoptótica de los linfocitos sean múltiples, con mayor o menor interrelación entre ellos. En la EC se ha observado que existe un defecto en la apoptosis mediada por Fas, secundario a una elevada expresión de Flip, un inhibidor de la apoptosis (Monteleone *et al.*, 2006). El receptor Fas pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) siendo el mejor caracterizado hasta el momento. Su función de señalización más conocida es la de participar en la inducción de la apoptosis mediante el reconocimiento de su ligando, *Fas-ligand*, y el ensamblaje de todas las proteínas que forman el DISC (*death-inducing signaling complex*) intracelularmente: la FADD, la procaspasa-8/10 y el c-FLIP (Ehrenschwender *et al.*, 2009; Krammer, 2000; Krammer *et al.*, 2007). La formación del complejo DISC produce la activación de la cascada de las caspasas que son las encargadas de desarrollar el proceso de apoptosis (Wang *et al.*, 2010). Como ya se ha dicho, la activación del Fas mediante agonista Fas provoca el inicio de apoptosis via mitocondrial liberando el citocromo c, aspecto que es inhibido según la concentración de H₂O₂. De estos

resultados se puede deducir que existe un estrecho vínculo entre la señalización via Fas y la señalización vía CAT/H₂O₂ e indica la importancia del estudio conjunto de ambas rutas intracelulares en la EC.

El NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) es un intermediario de muchos procesos celulares con funciones anti-apoptóticas ampliamente descritas (Visekruna *et al.*, 2006). Sin embargo, ya existen autores que indican que el papel del NF-κB en la regulación de la apoptosis todavía no está bien definido. En este sentido están los resultados que sustentan que NF-κB es importante en la protección de la apoptosis en los linfocitos T (Mariani *et al.*, 2000; Ogura *et al.*, 2001a) y que el NF-κB se activa en gran medida tras la señalización con anticuerpo Fas agonista (Bosque *et al.*, 2005). Sin embargo, existen estudios que no han encontrado diferencias en los niveles del NF-κB en la EC, concluyendo que no debe de ser un factor clave en la apoptosis en las condiciones estudiadas.

Estudios previos han descrito que la proteína pro-apoptótica ASK (apoptosis signal-regulating kinase 1) está involucrada en la inducción de la apoptosis (Furuhata *et al.*, 2009; Hayakawa *et al.*, 2006). También se ha observado que algunas ERO, como H₂O₂, O₂⁻ y el radical hidroxil, inducen cambios conformacionales en la proteína inhibidora de ASK-1 (thioredoxin) que resultan en la disociación del complejo y, por tanto, la activación de ASK. Otros estudios han revelado que ASK-1 media en la señalización del TNF-α (Tamura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005) y el H₂O₂ sobre la apoptosis (Tamura *et al.*, 2006).

La PPID (Peptidylprolyl isomerase D), también denominada ciclofilina D, es una proteína de la matriz mitocondrial implicada en la supresión de la apoptosis (Linard *et al.*, 2009). Se ha reportado aumentada en varios tumores donde ejerce un efecto antiapoptótico Bcl2-dependiente (Eliseev *et al.*, 2009). La proteína que codifica para el gen PPID es miembro de la familia de la peptidilprolil cis-trans isomerasa (PPIasa) que es capaz de acelerar el plegamiento de proteínas y que posee un lugar de unión para la ciclosporina A (fármaco inmunosupresor) (Eliseev *et al.*, 2009). En la literatura hay descrito que la mucosa tanto inflamada como no inflamada de pacientes los pacientes con EC y CU tenía una expresión aumentada de PPID respecto a los controles sanos,

pudiendo ser éste un evento local y limitado a la mucosa, cuyo papel en la patogenia de la EII queda por clarificar (Wu *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

El presente trabajo se basa en la caracterización de la inmunidad adquirida, en definir la función mitocondrial, el origen y elementos generadores y reguladores del estrés oxidativo en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y su implicación en la regulación de la capacidad apoptótica de los linfocitos T CD4+ implicados clásicamente en la etiopatogenia de la EC.

Objetivo general:

Caracterizar la función mitocondrial y el estrés oxidativo en los pacientes con EC de debut comparando con sujetos sanos.

Objetivos concretos:

1. Caracterizar la producción basal y estimulada de ERO (O_2^- , H_2O_2 , NO) en las CMSP de los pacientes con EC y comparar con las de voluntarios sanos.
2. Caracterización de la función mitocondrial de las CMSP, mediante la medición del $\Delta\Psi_m$, de los pacientes con EC de debut y en remisión comparado con sujetos sanos, con el fin de establecer las bases de un posible origen mitocondrial de los ERO.
3. Caracterizar el impacto del estrés oxidativo sobre las CMSP, midiendo productos de oxidación molecular (daño oxidativo) sobre los lípidos y el ADN.
4. Caracterizar las defensas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) de estos pacientes con el fin de clarificar el origen del daño oxidativo.
 - 4.1 Análisis de la concentración de las enzimas antioxidantes (EAO)
 - 4.2 Determinación de la actividad de los principales sistemas antioxidantes

- 4.3 Análisis genético mediante la cuantificación de los niveles de ARNm de los genes que codifican para las EAO y otras moléculas implicadas en el estrés oxidativo
- 4.4 Determinar si existe alguna mutación (polimorfismo genético) que limite la actividad de las EAO y otros genes relacionados.
5. Relacionar la actividad de EAO con la capacidad apoptótica de los linfocitos T en sangre periférica de pacientes con EC.
6. Caracterizar el perfil temporal de la expresión de la citoquina TNF- α y correlacionarla con las actividades de las EAO.
7. Caracterizar la expresión de moléculas implicadas en el desarrollo y regulación del estrés oxidativo y la apoptosis.

Los experimentos se realizaron en células de pacientes con EC en el inicio de la enfermedad, aún sin empezar ningún tratamiento para evitar el sesgo que el medicamento podría ejercer en la generación de ERO, y en pacientes controles sanos, sin enfermedades conocidas, ni toma de medicación ni fumadores.

Se han estudiado los mismos pacientes en el estado de actividad e inactividad de la EC con el fin de clarificar si la producción de ERO y el daño oxidativo, así como los demás parámetros estudiados, se recuperan en situación clínica de remisión o se mantienen constantes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1) SELECCIÓN DE PACIENTES, VOLUNTARIOS SANOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES.

4.1.1. Criterios de inclusión

- **Casos:** Se incluyeron pacientes con **enfermedad de Crohn** (EC) y se seleccionaron en distintos momentos evolutivos: al debut de la enfermedad, en remisión tras debut y en remisión de larga evolución. Fueron seleccionados en el momento del debut de la enfermedad para evitar las posibles interferencias de los fármacos utilizados en el manejo de la misma (corticoides, inmunosupresores, antibióticos) sobre los parámetros del estudio. En los pacientes de debut se exigió que no presentaran ninguna otra enfermedad crónica y no estuvieran tomando ninguna medicación en el momento de la inclusión.

- **Controles:** Los voluntarios **sanos** no debían presentar ninguna enfermedad conocida, ni estar bajo ninguna medicación. Se incluían tras comprobar que sus parámetros analíticos (incluyendo perfil lipídico y reactantes de fase aguda) se ajustaban a la normalidad.

4.1.2. Criterios de exclusión

La existencia de patología y/o toma habitual o reciente de medicamentos, tanto en controles como en pacientes con EC era un criterio de exclusión. Era un requisito que los pacientes incluidos tuvieran más de 16 años.

4.1.3. Grupos experimentales

Para realizar todos los experimentos del presente estudio fue necesario un volumen importante de sangre y algunos de ellos se realizaron en fresco, se utilizaron dos cohortes de pacientes con similares características.

Grupo experimental de la primera parte del estudio (caracterización de la función mitocondrial y estrés oxidativo, TNF- α y primera parte de actividades enzimáticas):

Se incluyó un total de 25 pacientes con EC. El diagnóstico de la enfermedad se realizó de acuerdo con los criterios de Leonard-Jones (Tabla 4.1). Los experimentos fueron realizados al debut de la enfermedad (*paciente activo*), antes de iniciar ningún tratamiento, y se repitieron cuando el paciente estaba en remisión (*paciente en remisión*). Además se incluyó un grupo de pacientes en remisión de larga evolución (*paciente inactivo*). La actividad de la enfermedad se midió con el índice de Harvey-Bradshaw (Tabla 4.2) que recoge los síntomas que presenta el paciente en las últimas 24 horas.

Tabla 4.1. Criterios de Leonard-Jones

| | Clínica o Endoscopia | Radiología | Biopsia | Pieza quirúrgica |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|
| Lesión digestiva alta | + | + | + | + |
| Lesión anal | + | + | + | |
| Distribución Segmentaria | + | + | + | + |
| Lesión transmural | | | | |
| Fisura | | + | | + |
| Absceso | + | + | | + |
| Fístula | + | + | | + |
| Estenosis | + | + | | + |
| Hallazgos histológicos | | | | |
| Úlcera | | | + | + |
| Agregados linfoides | | | + | + |
| Granulomas | | | + | + |

Se considera EC definida la presencia de granulomas en el estudio histológico junto a otro criterio o, en ausencia de granulomas, la existencia de tres criterios.

Se define la enfermedad como probable con dos criterios en ausencia de granulomas.

Tabla 4.2. Índice de Harvey-Bradsaw

| Variable nº | Puntos |
|--|---|
| 1. <u>Estado general</u> | Muy bueno 0; Regular 1; Malo 2; Muy malo 3; Malísimo 4 |
| 2. <u>Dolor abdominal</u> | No 0; Ligero 1; Moderado 2; Intenso 3 |
| 3. <u>Número de deposiciones blandas-líquidas diarias</u> (n puntos) | |
| 4. <u>Masa abdominal</u> | No 0; Dudosa 1; Definida 2; Definida y dolorosa 3 |
| 5. <u>Complicaciones</u> | <ul style="list-style-type: none"> Artralgia 1 Uveítis 1 Eritema nodoso 1 Úlceras aftoides 1 Pioderma gangrenoso 1 Fístula anal 1 Otras fístulas 1 Abscesos 1 |

* Si < 6 leve; 6-12 moderada; > 12 grave

De los 25 pacientes incluidos se analizaron 19 en remisión. En 6 de ellos no fue posible repetir el experimento por diversas causas: 1 falleció por causas no relacionadas con la enfermedad, 3 no estaban dispuestos a participar en la segunda parte del estudio, 1 se cambió de ciudad y 2 presentaron un curso tan agresivo de la enfermedad que fue imposible confirmar la remisión.

El grupo control estaba constituido por 25 sujetos sanos que participaron voluntariamente y de forma no retribuida en el estudio.

Una parte de los experimentos se llevó a cabo en un grupo de 20 pacientes diagnosticados de EC más de cinco años, que estaban en remisión clínica

persistente (Harvey <4 por más de 6 meses), y que no tenían lesiones morfológicas (*pacientes inactivos*).

La curación de la mucosa fue evaluada realizando una colonoscopia, cápsulendoscopia y/o entero-resonancia de acuerdo a la localización de la enfermedad.

En todos los casos los pacientes fueron debidamente informados de los objetivos y metodología del estudio y firmaron el consentimiento preparado para tal fin. El día de la extracción de sangre se realizó además una analítica completa (hematología y bioquímica) incluyendo los reactantes de fase aguda (PCR, VSG, fibrinógeno).

Se rellenó un cuaderno de recogida de datos preparado para el desarrollo del estudio donde se recogían las características demográficas y hábitos de vida, características clínicas, analíticas y exploraciones complementarias realizadas. Todos los pacientes con EC fueron clasificados según la clasificación de Montreal (Tabla 4.3).

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital La Fe y se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

Tabla 4.3. Clasificación de Montreal de la enfermedad de Crohn propuesta por la Organización Mundial de Gastroenterología.

| Clasificación de Montreal para la enfermedad de Crohn | | |
|--|--|--|
| Edad al diagnóstico (A) | | |
| A1 | 16 años o menos | |
| A2 | 17-40 años | |
| A3 | >40 años | |
| Localización (L) | | |
| L1 | Íleon terminal | L1+L4 (íleon terminal+tracto digestivo alto) |
| L2 | Colon | L2+L4 (colon+tracto digestivo alto) |
| L3 | Ileocólica | L3+L4 (ileocólica+tracto digestivo alto) |
| L4 | Tracto digestivo alto | |
| Patrón clínico (B) | | |
| B1 | No estenosante, no fistulizante(*), o inflamatorio | B1p (inflamatorio con afección perianal asociada) |
| B2 | Estenosante | B2p (estenosante con afección perianal asociada) |
| B3 | Fistulizante | B3p (fistulizante con afección perianal asociada) |

(*) Se utiliza el término fistulizante, aunque el original es penetrante. Este patrón de comportamiento clínico se considera transitorio, porque la historia natural lleva casi siempre a los patrones B2 o B3, o mixtos.

Grupo experimental de la segunda parte del estudio (estudio de la actividad y concentración de las enzimas antioxidantes y análisis genético)

Un total de 20 pacientes al debut de la enfermedad y 18 controles sanos fueron incluidos en el estudio. Una parte de los experimentos se llevó a cabo en un grupo de 10 pacientes diagnosticados de EC que estaban en remisión clínica (Harvey <4 por más de 6 meses) y que no tenían lesiones morfológicas (*pacientes inactivos*): 5 de ellos pertenecían al grupo debuts, 2 consiguieron remisión post-cirugía y 3 en remisión que estaban incluidos en el otro grupo experimental como debuts. No fue posible repetir el experimento en todos los pacientes, por varias causas, pero fundamentalmente por no poder conseguir la remisión. La curación de la mucosa fue evaluada también realizando una colonoscopia, cápsulendoscopia y/o entero-resonancia de acuerdo a la localización de la enfermedad. Se tuvieron en cuenta los diferentes índices para valorar de actividad mucosa, el índice de actividad endoscópica para la EC (CDEIs) y el índice cuantitativo de actividad para la resonancia magnética (MaRIA) respectivamente.

Se exigieron los mismos criterios de inclusión y exclusión, añadiendo el nuevo criterio de inclusión de ser no fumador para los controles sanos, para evitar posibles interferencias en los parámetros estudiados.

4.2) AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Los protocolos experimentales fueron realizados con células de la serie blanca de sangre periférica (células mononucleares y granulocitos).

Para la primera parte del estudio se extrajo una muestra de unos 15 ml de sangre de cada individuo, en tubos de K3-EDTA, tras un mínimo de 12 horas de ayuno.

Las células de la serie blanca fueron aisladas mediante sedimentación sobre columna de Ficol-Histopaque. Para ello 3 ml de sangre total se vertieron sobre 8 ml de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) en un tubo de plástico de 15 ml. Después de 45-60 minutos de sedimentación por gravedad a temperatura ambiente, de forma que la serie roja sedimenta en el fondo. El plasma rico en células blancas (capa superior) fue recogido y alicuotado en eppendorfs. Posteriormente se realizó una centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma de las células.

El plasma fue almacenado a -80°C para análisis posteriores de proteínas y enzimas (ADN/ARN y estudios de cromatografía líquida de alta resolución).

De las células así obtenidas, una parte se diluyó a 1:0.5 v/v con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (1009 mg/ml) y 1x glutamina, y se incubaron a 37°C hasta que el experimento se llevó a cabo. Después de contar las células, los leucocitos se ajustaron a una concentración de 500.000 células/ml con RPMI. El resto de células fueron almacenadas a - 80°C para posteriores experimentos.

El resumen del protocolo se expone a continuación:

Extracción de células de la serie blanca:

- Tres ml de sangre periférica se añaden a un tubo con 8 ml de Histopaque atemperado. Verter la sangre lentamente por la pared del tubo
- Dejar sedimentar durante un tiempo (45-60 minutos) hasta que la serie roja sedimente al fondo
- Recoger la fase superior y repartir en eppendorfs
- Centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm
- Separar el sobrenadante (plasma) y guardar
- Diluir el pellet (células) en RPMI (2:1)
- Coger 250 μ l de la mezcla (células con RPMI) y repartir en varios eppendorfs

Para la segunda parte del estudio se obtuvieron unos 12 ml de sangre repartidos en 4 tubos de EDTA. Un tubo se utilizó para aislamiento de la serie blanca mediante sedimentación sobre columna de Ficol-Histopaque como se ha explicado anteriormente, para posteriores estudios de análisis de actividad y concentración de proteínas (western blot). El resto se utilizó para obtención de ARN de leucocitos en fresco (ver apartado 9), para estudios posteriores de análisis de expresión génica.

4.3) CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE SUPERÓXIDO (O_2^-), PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2) Y ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$) POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios de citometría se llevaron a cabo en un Citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter). Se utilizó el sistema de software II (Beckman-Coulter) para la adquisición de datos. Los resultados se expresaron en función de la intensidad de la fluorescencia y en unidades arbitrarias.

La serie blanca fue separada en linfocitos, monocitos o granulocitos de acuerdo a sus marcadores de linaje específicos y utilizamos los anticuerpos monoclonales específicos con fluorocromos para poderlos detectar:

- Isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD3- FITC
- Ficoeritrina-Texas rojo (ECD): anti-CD3-ECD
- Ficoeritrina unida a cianina-5 fluorescente (PE/CY5): CD4-PC5

Los linfocitos T helper CD4 fueron identificados como células CD4 y CD3 positivas con CD3-FITC/CD3-ECD y CD4-PC5. Los monocitos como células CD4 positivas, pero CD3 negativas, con CD4-PC5. Los granulocitos fueron identificados exclusivamente por su morfología.

4.3.1. Contaje y marcaje de células para el citómetro

- Usar 150 μ l de la alícuota de células para cada medición
- Añadir 5 μ l de CD3-FITC y 2.5 μ l de CD4-PC5 como marcador de la producción de O_2^- y 5 μ l CD3-ECD y 2.5 μ l de CD4-PC5 para la detección del H_2O_2 y NO
- Incubar a 37°C durante 5 minutos en la oscuridad
- Añadir 50 μ l de células marcadas y 950 μ l HEPES
- Contar en citómetro la cantidad de células de cada población (linfocitos CD3+ CD4+ y monocitos CD3- CD4)
- Diluir células a 500.000 c/ml con RPMI

4.3.2. Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno en monocitos y linfocitos:

Las ERO se estimaron mediante el uso de fluorocromos específicos. El hidroetidio (HE) para la monitorización de O_2^- y 2', 7'-diclorohidro-fluoresceína diacetato (DCFH) para la monitorización de H_2O_2 . La producción de ERO se estimuló con plumbagina (Pb) para el O_2^- y de t-butir-hidroperóxido (TBH) para el H_2O_2 . La producción de NO se monitorizó usando el fluorocromo 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2/DA).

4.3.2.1. Producción basal y estimulada de O_2^-

El HE es un fluorocromo que se utiliza habitualmente para detectar los niveles y la formación de O_2^- . Este compuesto se oxida y produce bromuro de etidio, que se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena y fluoresce mediante la emisión de fluorescencia roja (absorción/emisión: 518/605 nm).

Para determinar la producción basal de O_2^- el HE se añadió a 50 μ l de células marcadas a una concentración final de 5 μ M. Posteriormente se incubó durante una hora y se midió la fluorescencia generada por citometría de flujo.

Una vez que tuvimos la producción basal de O_2^- , se añadió una dosis de 2,5 y 12,5 mM de Pb (generador de O_2^-), incubando durante 10 minutos a 37°C, con el fin de inducir la producción de O_2^- . Previamente, se realizó una curva dosis-respuesta para Pb para confirmar que el O_2^- se producía de forma dosis dependiente.

Algunos experimentos se realizaron en presencia de un inhibidor de la actividad SOD mediante la adición de dietiltiocarbamato (DETC) (n=10).

4.3.2.2. Producción basal y estimulada de H_2O_2

La prueba para detectar el H_2O_2 se basó en la oxidación de DCFH, el cual emite una baja fluorescencia basal porque está atrapado dentro de la célula.

El DCFH es un compuesto no fluorescente de naturaleza hidrofóbica que, tras entrar en la célula, puede desacetilarse por la acción de esterasas intracelulares dando lugar al compuesto no fluorescente 2',7'-diclorofluorescina. A continuación, este compuesto reacciona con el H_2O_2 y se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual posee un elevado componente fluorescente (520 nm) y se puede medir por técnicas fluorimétricas o de citometría de flujo.

Para determinar los niveles basales de H_2O_2 se añadió DCFH a 50 μ l de células marcadas a una concentración final de 20 μ M. Posteriormente se incubó durante una hora y se midió por citometría de flujo la fluorescencia generada.

Una vez identificada la producción basal de H_2O_2 se procedió a la estimulación de la producción del radical añadiendo una dosis de 1 y 10 μ M de TBH (generador de H_2O_2). Luego se midió al citómetro tras incubar a 37°C durante 10 minutos. Se realizó también previamente una curva dosis-respuesta del TBH para confirmar que el H_2O_2 se producía de forma dosis dependiente.

4.3.2.3. Producción de NO

La producción de NO se midió usando el fluorocromo DAF-2/DA, el cual no fluoresce hasta que la producción de NO lo convierte en el tinte fluorescente, DAF-2.

Para cuantificar la producción de NO, se añadió DAF a 50 μ l de células marcadas a una concentración final de 5 μ M. A continuación se incubó a 37°C durante una hora y la fluorescencia generada se midió por citometría de flujo.

4.3.3. Niveles del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

La cadena respiratoria mitocondrial produce energía que es reestablecida como un gradiente electroquímico, éste consiste en un potencial transmembrana eléctrico negativo en el interior de la mitocondria de alrededor 180-200 mV y un gradiente de protones de una unidad. Esta energía es capaz de producir la síntesis de una molécula de ATP, una molécula importante para una gran cantidad de procesos celulares.

El $\Delta\psi_m$ fue monitorizado mediante el tetrametilrodamina metil éster (TMRM), que es un marcador fluorescente derivado de la rodamina que fluoresce al acumularse en el interior de mitocondrias activas de forma directamente proporcional a la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. En bajas concentraciones, el fluorocromo TMRM no suprime la respiración celular (Scaduto *et al.*, 1999).

El método utilizado consistió en la incubación de 100 μ l de la alícuota de las células en la oscuridad con los marcadores de CD3 y CD4 (10 μ l de CD3-FITC y 5 μ l de CD4-PC5) durante 5 minutos y a 37°C.

Una vez que estuvieron marcadas las células, se tomaron dos alícuotas de 50 μ l y se diluyeron con HEPES a un volumen final de 1 ml. El TMRM se añadió a uno de los tubos a una concentración final de 500 nM. Después se incubó durante una hora. El resto del tubo fue utilizado como blanco.

El $\Delta\psi_m$ se midió también tras la adición del desacoplador carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) (5 μ M) para inhibir las mitocondrias. El FCCP hace permeable la membrana mitocondrial interna a los protones y desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria.

4.4) MEDIDA DEL DAÑO OXIDATIVO POR HPLC

Para medir el impacto del estrés oxidativo sobre las células mononucleares de sangre periférica, medimos el daño oxidativo sobre los lípidos de membrana y sobre el DNA, mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA) y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) respectivamente, obtenidos por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columna en fase reversa.

4.4.1. Determinación de los niveles de malondialdehído (MDA)

4.4.1.1. Fundamento de la técnica

Los fosfolípidos de membrana son muy vulnerables al ataque por ERO debido a la susceptibilidad de sus cadenas poliinsaturadas.

El daño celular producido por un exceso de ERO (estrés oxidativo), se puede explicar por una alteración de la membrana celular, a través de la cual los ácidos grasos de la bicapa lipídica sufren una peroxidación por un radical hidroxilo, con lo que se deteriora su estructura y se altera su permeabilidad.

En este trabajo, el grado de peroxidación lipídica se determinó por la concentración sérica de MDA en células mononucleares, extraídas mediante columna de Ficol-Histopaque, con base en la reacción del aldehído con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Se utilizó HPLC con columna en fase reversa y se determinó espectrofotométricamente con un detector ultravioleta usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como patrón (procedimiento descrito por Wong, SHY. Clin. Chem. 1987).

El método se basa en la hidrólisis por ebullición de los lipoperóxidos en ácido fosfórico. El MDA es uno de los productos de la hidrólisis con capacidad para reaccionar con el TBA y formar MDA (TBA)₂. Las proteínas plasmáticas se precipitan con metanol y se retiran de la mezcla de reacción mediante centrifugación. La proteína de extracto libre se fracciona por el HPLC en una columna de gel de sílice octadecil con el fin de separar el MDA-TBA eluido que interfiere con los cromógenos. El MDA-TBA se eluye de la columna con

metanol/tampón fosfato. Después se cuantifica por espectrofotometría a 532 nm.

4.4.1.2 Protocolo

El protocolo se resume a continuación:

- A 50 μL de muestra añadir 75 μL de H_3PO_4 0,44 M y 25 μL de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico; agitar y mantener 60 minutos en un baño a 95 °C.
- Una vez transcurrido el tiempo, añadir 150 μL de la solución neutralizante (metanol). Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos a 4 °C e inyectan 25 μL del sobrenadante obtenido en el H.P.L.C.
- El proceso cromatográfico se realiza a un flujo constante de 1 mL/min usando condiciones isocráticas con una fase móvil con composición KH_2PO_4 50 mM pH = 6.8 y acetonitrilo (70:30).
- El tiempo de retención del aducto TBA-MDA₂ es aproximadamente 5 minutos.
- Realizar la detección del aducto TBA-MDA₂ con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm.
- Las concentraciones plasmáticas de lipoperóxidos se calculan en referencia a una curva de calibración preparada con 1,1,3,3-tetrametoxipropano, que sufre una hidrólisis para liberar cantidades estequiométricas de MDA.

4.4.2. Determinación de los niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG)

4.4.2.1 Fundamento de la técnica

El 8-oxo-dG constituye un marcador biológico de daño oxidativo al DNA. Permite determinar la oxidación del mismo, ya que los radicales libres cuando atacan al ADN causan una oxidación de la guanosina para dar 8-oxo-dG. Para su determinación se empleó un método previamente descrito (Shigenaga MK,

Methods Enzymol. 1994). Éste se basa en la medida de los niveles de 8-oxo-dG mediante la técnica de HPLC, con detección electroquímica.

4.4.2.2. Protocolo

El ADN celular se extrajo según el siguiente protocolo:

- Añadir 30 ml de tampón de lisis (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1mM EDTA, pH 7.4) a una muestra de 3-5 ml de sangre en un tubo con EDTA. Agitar suavemente, incubar durante 30 minutos en el hielo y centrifugar a 1200 rpm durante 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante (residuos de la sangre), añadir 10 ml de tampón de lisis para volver a resuspender el pellet y centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante, añadir 5 ml de solución SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8), resuspender el pellet y centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Eliminar sobrenadante. Añadir 5 ml de solución SE y resuspender el precipitado. Añadir 40 µl de proteinasa K (10 mg / ml) y 250 µl SDS 20%, agitar suavemente y se incuba durante una noche a 37°C en un baño de agua.
- Añadir 5 ml de solución SE y 10 ml de fenol, agitar manualmente durante 10 minutos, y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 10 °C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 10 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), agitar manualmente durante 10 minutos y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 10 ° C.
- Una vez más transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 10 ml cloroformo/isoaminoalcohol (24:1), agitar manualmente durante 10 minutos, y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos a 10°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 300 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 10 ml de isopropanol. Agitar suavemente hasta que el ADN haya precipitado y capturar el ADN con la punta de una micropipeta
- Lavar el ADN con etanol al 70 % y disolverlo con 0,5-1 ml de agua bidestilada toda la noche a 4°C en un agitador rotatorio.

- Medir la concentración de ADN en un espectrofotómetro a 260 nm.

Para la determinación de 8-oxo-dG en ADN genómico, se realizó lo siguiente:

- Lavar el ADN aislado 2 veces con etanol al 70%. Secar y resuspender en 200 μ L de Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0) para su digestión enzimática.
- La primera digestión consiste en añadir, a 200 μ g totales de DNA, 100 U de DNasa I en 40 μ L Tris 10 mM y 10 μ L de MgCl₂ 0.5 M (concentración final de 20 mM) e incubar durante 1 hora a 37°C.
- En el siguiente paso, bajar el pH de la mezcla de reacción a 5.1 mediante la adición de 15 μ L de acetato sódico 0.5 M pH 5.1.
- Posteriormente, añadir 10 μ L de nucleasa P1 (5 U) y 30 μ L de ZnSO₄ 10 mM (concentración final de 1mM) e incubar la mezcla durante 1 hora a 37°C.
- Después de neutralizar el pH de la mezcla de reacción con 100 μ L de Tris 0.4 M pH 7.8, añadir 20 μ L de fosfatasa alcalina (3 U) e incubar durante 30 minutos a 37°C.
- Precipitar las proteínas con la adición de acetona (5 volúmenes), desecharlas mediante centrifugación y secar el sobrenadante por evaporación.

El ensayo de la 8-oxo-dG se determinó mediante HPLC. El ADN hidrolisado se disolvió en agua grado HPLC y filtrada con una jeringa de 0.2-40 μ m antes de aplicar a la columna Waters ODS HPLC (2.5x0.46 ID; 5 μ m de tamaño de partícula). La cantidad de 8-oxo-dG y la dG en el ADN digerido se midió por detección de absorbancia UV y electroquímica respectivamente. También analizamos patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar aquellas bases derivadas del ADN celular.

4.5) NIVELES DE ARNm DE TNF- α

4.5.1. Aislamiento de ARN / ADN

El ARN total de las células se aisló utilizando TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, número de catálogo: 10296-010), siguiendo este protocolo:

- Resuspender el pellet de células con 1 ml de Trizol hasta la completa disolución e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Añadir 200 μ l de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C
- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo
- Añadir 500 μ l de Isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos
- Desechar el sobrenadante
- Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75% y vortear
- Centrifugar a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C
- Dejar secar al aire el pellet
- Resuspender con agua libre de ARN sas (22 μ l)
- Incubar 10 minutos a 55-60°

4.5.2. Cuantificación de los niveles de ARNm

Los niveles de ARNm se determinaron mediante análisis con PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando el aparato ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para el estudio de la expresión de genes de interés, en este caso para el TNF- α , una vez extraído el ARN total se realizó una retrotranscripción para el paso del ARN a ADNc. Posteriormente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó el ADN utilizando primers específicos.

- Para la realización de la **retrotranscripción** (RT-PCR) de las muestras, alícuotas de 2 µg fueron sometidas a retrotranscripción y se llevaron al termociclador en las condiciones estándar habituales:

| | |
|------------|------|
| 30 minutos | 16°C |
| 30 minutos | 42°C |
| 5 minutos | 85°C |
| ∞* | 4°C |

*Durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo

- Para la realización de la **PCR cuantitativa en tiempo real** (Q-PCR) se usaron *primers* y sondas específicas para el TNF-α (Assay-on-demand, Hs00174128_m1, Applied Biosystems). Estos *primers* son secuencias cortas de 18-22 nucleótidos que son reconocidas por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción y que delimitan la zona de material genético a amplificar.

Se utilizó el kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (de Applied Biosystems, P/N 4304437, Foster City, CA). El volumen total de la reacción fue de 20 µl incluyendo:

- 1) Taq Man Universal PCR Master Mix (1X)
- 2) Forward y reverse primer (50 en 900 nM)
- 3) Sonda-primer específico para TNF-α (2.5 µM)
- 4) 2.3 µl de ADNc, producto de transcripción inversa del ARN
- 5) Completar con H₂O

● Las condiciones de PCR fueron:

- 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima; la polimerasa precisa de calor para su activación.
- 40 ciclos de:
 - 15 segundos a 95°C: se desnaturaliza el cDNA (se separan las dos hebras)
 - 1 minuto a 60°C: el cebador se unirá a su secuencia complementaria molde de ADNc, permitiendo así el alineamiento.

La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador y empieza a sintetizar.

Para normalizar las medidas de las muestras se usó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como “housekeeping” o control interno. Cada muestra se analizó por triplicado y la expresión se calculó según el método tradicional de $2^{-\Delta Ct}$.

4.6) CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS DIFERENTES ENZIMAS ANTIOXIDANTES

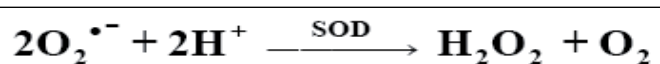
Los mecanismos antioxidantes fueron caracterizados por medición de la actividad de las enzimas más representativas: Superóxido Dismutasa (encargada de la dismutación del radical O_2^-), Catalasa (que se encarga de la metabolización del H_2O_2) y Glutatión Peroxidasa (que metaboliza los peróxidos lipídicos y el H_2O_2).

4.6.1. Estudio de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD fue medida con el Bioxytech® SOD-525™ assay kit (OxisResearch) para medir la actividad SOD global y el *Superoxide Dismutase Assay kit* (Cayman Chemical) para la actividad por separado de los diferentes tipos de SOD (Cu/Zn y Mn) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

4.6.1.1. Fundamento

La SOD es una metaloenzima que cataliza la reacción de dismutación del O_2^- , en oxígeno y H_2O_2 , que constituyen una parte fundamental de los mecanismos de defensa antioxidante celular (Sandstrom *et al.*, 1994).



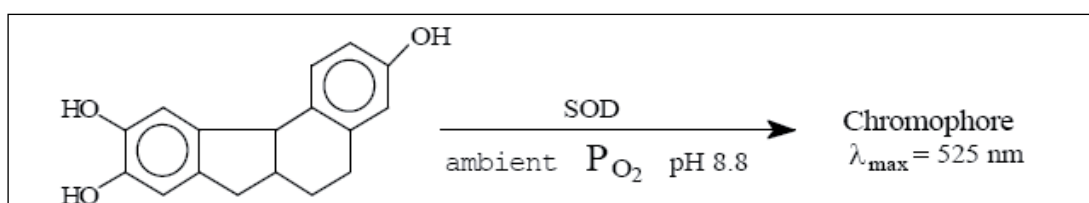
La reacción catalizada por SOD es extremadamente rápida, $2 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$, y en presencia de suficientes cantidades de la enzima, normalmente mantiene la concentración de O_2^- muy bajo. Sin embargo, en una reacción competitiva, el NO reacciona con el O_2^- , con una tasa constante de $6,7 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ para formar el peroxinitrito, un fuerte agente oxidante y nitrante (Beckman *et al.*, 1996).

4.6.1.2. Actividad SOD global

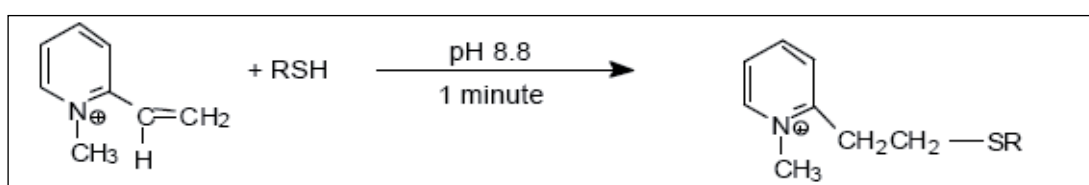
4.6.1.2.1. Principios del procedimiento

La actividad SOD global fue medida mediante el método recomendado en el Bioxytech® SOD-525™ assay kit (OxisResearch, número de catálogo 21010).

El método se basa en el aumento de SOD mediante la tasa de autooxidación de 5, 6, 6 bis, 11 ter-tetrahidro-3, 9, 10 rihydroxybenzo [c] flúor (reactivo R1) en una solución alcalina acuosa, con el fin de producir un cromóforo con absorbancia máxima a 525 nm.



La interferencia debido a mercaptanos como el glutatión reducido es controlada por el pretratamiento de las muestras con metil-2-vinylpyridinium (reactivo R2), que directamente elimina mercaptanos por medio de una rápida reacción de alquilación.



La medida de los cambios de absorbancia a 525 nm se realiza después de la adición del reactivo R1.

La actividad de la SOD se determina a partir de la relación de los tipos de autooxidación en presencia (Vs) y en ausencia (Vc) de la SOD. La relación VS/VC como función de la actividad de la SOD es independiente del tipo de SOD (SOD-Cu/Zn, SOD-Mn, SOD-Fe) que se está midiendo.

Una unidad de SOD-525 se define como la actividad que duplica la tasa de autoxidación del control blanco ($V_s/V_c = 2$). La relación entre la V_s/V_c y la actividad de la SOD es descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{V_s}{V_c} = 1 + \frac{[SOD]}{\alpha \cdot [SOD] + \beta}$$

4.6.1.2.2. Reactivos

- Reactivo R1:

5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibenzo[c]fluoreno en HCl que contiene ácido dietileno-triamino-pentaacético (DTPA) y etanol

- Reactivo R2:

1-metil-2-vinilpiridinium trifluorometanosulfonato en HCl

- Tampón:

2-amino-2-metil-1,3-propanediol, que contiene ácido bórico y DTPA, pH = 8.8 (a 37°C)

4.6.1.2.3. Protocolo

El procedimiento se realizó en cubeta y el procedimiento experimental fue el siguiente:

- 900 μ l de tampón en cada cubeta
- Añadir 40 μ l de muestra o de blanco
- Añadir 30 μ l del reactivo R2
- Incubar a 37 °C durante 1 minuto
- Añadir 30 μ l del reactivo R1
- Medir la absorbancia a 525 nm cada 3 segundos durante 2 minutos

4.6.1.2.4. Cálculos

Hay dos formas de determinar la actividad SOD en este protocolo. La primera es mediante una tabla con las relaciones Vs/Vc ya establecidas (ver tabla) y la segunda calculándolo directamente con la siguiente fórmula, que fue el método que nosotros utilizamos.

Todas las medidas fueron normalizadas según la concentración de proteínas calculada por método Lowry (ver delante).

$$[SOD] = \frac{0.93 \cdot \left(\frac{V_s}{V_c} - 1 \right)}{1.073 - 0.073 \cdot \left(\frac{V_s}{V_c} \right)}$$

Vs/Vc RATIO TABLE

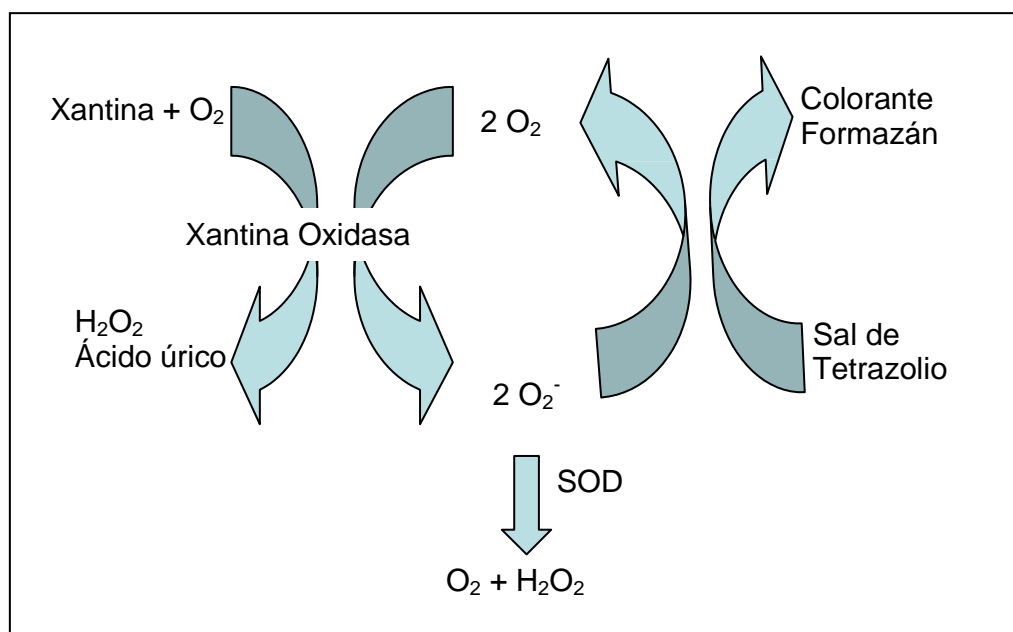
| Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units | Vs/Vc | Units |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1.00 | 0.00 | 2.00 | 1.00 | 3.00 | 2.18 | 4.00 | 3.57 | 5.00 | 5.25 | 6.00 | 7.32 | 7.00 | 9.93 |
| 1.05 | 0.05 | 2.05 | 1.06 | 3.05 | 2.24 | 4.05 | 3.65 | 5.05 | 5.35 | 6.05 | 7.44 | 7.05 | 10.08 |
| 1.10 | 0.09 | 2.10 | 1.11 | 3.10 | 2.31 | 4.10 | 3.73 | 5.10 | 5.44 | 6.10 | 7.56 | 7.10 | 10.23 |
| 1.15 | 0.14 | 2.15 | 1.17 | 3.15 | 2.37 | 4.15 | 3.80 | 5.15 | 5.54 | 6.15 | 7.68 | 7.15 | 10.38 |
| 1.20 | 0.19 | 2.20 | 1.22 | 3.20 | 2.44 | 4.20 | 3.88 | 5.20 | 5.63 | 6.20 | 7.80 | 7.20 | 10.53 |
| 1.25 | 0.24 | 2.25 | 1.28 | 3.25 | 2.50 | 4.25 | 3.96 | 5.25 | 5.73 | 6.25 | 7.92 | 7.25 | 10.69 |
| 1.30 | 0.29 | 2.30 | 1.34 | 3.30 | 2.57 | 4.30 | 4.04 | 5.30 | 5.83 | 6.30 | 8.04 | 7.30 | 10.85 |
| 1.35 | 0.33 | 2.35 | 1.39 | 3.35 | 2.64 | 4.35 | 4.12 | 5.35 | 5.93 | 6.35 | 8.16 | 7.35 | 11.01 |
| 1.40 | 0.38 | 2.40 | 1.45 | 3.40 | 2.71 | 4.40 | 4.21 | 5.40 | 6.03 | 6.40 | 8.29 | 7.40 | 11.17 |
| 1.45 | 0.43 | 2.45 | 1.51 | 3.45 | 2.77 | 4.45 | 4.29 | 5.45 | 6.13 | 6.45 | 8.42 | 7.45 | 11.34 |
| 1.50 | 0.48 | 2.50 | 1.57 | 3.50 | 2.84 | 4.50 | 4.37 | 5.50 | 6.23 | 6.50 | 8.55 | 7.50 | 11.50 |
| 1.55 | 0.53 | 2.55 | 1.63 | 3.55 | 2.91 | 4.55 | 4.46 | 5.55 | 6.34 | 6.55 | 8.68 | 7.55 | 11.67 |
| 1.60 | 0.58 | 2.60 | 1.68 | 3.60 | 2.98 | 4.60 | 4.54 | 5.60 | 6.44 | 6.60 | 8.81 | 7.60 | 11.84 |
| 1.65 | 0.63 | 2.65 | 1.74 | 3.65 | 3.06 | 4.65 | 4.63 | 5.65 | 6.55 | 6.65 | 8.94 | 7.65 | 12.02 |
| 1.70 | 0.69 | 2.70 | 1.81 | 3.70 | 3.13 | 4.70 | 4.71 | 5.70 | 6.65 | 6.70 | 9.08 | 7.70 | 12.20 |
| 1.75 | 0.74 | 2.75 | 1.87 | 3.75 | 3.20 | 4.75 | 4.80 | 5.75 | 6.76 | 6.75 | 9.22 | 7.75 | 12.38 |
| 1.80 | 0.79 | 2.80 | 1.93 | 3.80 | 3.27 | 4.80 | 4.89 | 5.80 | 6.87 | 6.80 | 9.35 | 7.80 | 12.56 |
| 1.85 | 0.84 | 2.85 | 1.99 | 3.85 | 3.35 | 4.85 | 4.98 | 5.85 | 6.98 | 6.85 | 9.50 | 7.85 | 12.74 |
| 1.90 | 0.90 | 2.90 | 2.05 | 3.90 | 3.42 | 4.90 | 5.07 | 5.90 | 7.09 | 6.90 | 9.64 | 7.90 | 12.93 |
| 1.95 | 0.95 | 2.95 | 2.11 | 3.95 | 3.50 | 4.95 | 5.16 | 5.95 | 7.21 | 6.95 | 9.78 | 7.95 | 13.12 |

4.6.1.3. Actividad SOD-Cu/Zn y SOD-Mn

4.6.1.3.1. Principios del procedimiento

Para llevar a cabo la cuantificación de la actividad SOD, usamos el *Superoxide Dismutase Assay kit* (Cayman Chemical; número de catálogo 706002). Este kit utiliza sal de tetrazolio para la detección de los radicales O_2^- generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina (ver figura 4.1). Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para hacer patente la dismutación del 50% del radical O_2^- . Con este ensayo se pueden medir los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y Fe).

Figura 4.1. Principios del procedimiento.



4.6.1.3.2. Preparación de las muestras:

Para separar las dos enzimas SOD citosólica y mitocondrial (SOD-Cu/Zn y SOD-Mn respectivamente) se puede realizar mediante la adición de 1-3 mM de cianida potásica, que inhibe la SOD-Cu/Zn y extracelular, resultando la actividad de SOD-Mn. También lo podemos hacer mediante centrifugación de la muestra. Tras realizar pruebas con los dos métodos obtamos por la

centrifugación por resultar mucho más fácil de realizar y con mejores resultados.

Así, a partir de las células de serie blanca (pellet) congeladas a -80°C , realizamos los siguientes pasos:

- Centrifugar a 10000 g, 15 minutos, 4°C .
- Recuperamos el sobrenadante que tiene la SOD citosólica y el pellet obtenido la parte mitocondrial.
- Homogenizamos este pellet mitocondrial con un tampón que constituido por 20 mM HEPES a pH 7,2 conteniendo 1mM EGTA, 210 mM Manitol y 70 mM sacarosa.
- Sonicamos las dos partes mitocondrial y citosólica
- Centrifugar 1500 g, 5 minutos, a 4°C .
- Recuperamos el sobrenadante de ambas partes: tenemos de cada muestra dos eppendorfs, uno con la SOD-Cu/Zn y otro con la SOD-Mn.

4.6.1.3.3. Preparación de reactivos

- *Assay Buffer (AB) 10X:*

Se diluyen 3 ml de AB con 27 ml de agua bidestilada.

El AB final contiene: 50 mM TrisHCl, pH 8, 0,1 mM DTPA.

- *Sample Buffer (SB) 10X:*

Se diluyen 2 ml de SB concentrado con 18 ml de agua bidestilada.

El *Sample Buffer* final contiene: 50 mM TrisHCl, pH 8.

- *Radical Detector:*

Contiene la sal de tetrazolina. Se cogen 50 μL con 19,95 ml de AB.

- Estándar SOD:

Es una solución de SOD Cu/Zn de eritrocitos bovinos.

- Xantina oxidasa:

A 50 μL se le añaden 19,95 ml de SB.

4.6.1.3.4. Protocolo

Utilizamos una placa de 96 pocillos. El volumen total fue 230 μL en cada pocillo. La temperatura de la reacción fue de 25°C. La absorbancia se midió a los 440-460 nm.

Primero preparar una curva estándar. Para ello diluir 20 μL del estándar SOD con 1,98 ml de SB. Después hacer lo siguiente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Preparación de la curva estándar.

| TUBO | SOD Stock (μL) | Sample Buffer (μL) | Final SOD actv (U/ml) |
|----------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| A | 0 | 1.000 | 0 |
| B | 20 | 980 | 0,025 |
| C | 40 | 960 | 0,05 |
| D | 80 | 920 | 0,1 |
| E | 120 | 880 | 0,15 |
| F | 160 | 840 | 0,2 |
| G | 200 | 800 | 0,25 |

- Añadir 200 μL del *Radical Detector* diluido y 10 μL de cada muestra o del estándar SOD en el caso de la curva de calibrado.
- Añadir 20 μL de la Xantina Oxidasa a cada pocillo lo más rápidamente posible.
- Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y con la placa en agitación.
- Leer la absorbancia a 440-460 nm.

4.6.1.3.5 Cálculos

Representamos los valores de absorbancia de la curva estándar ajustando a una línea recta. Determinamos la ecuación de la regresión lineal:

$$y = ax + b$$

Obtenemos una recta de pendiente a cuya ordenada en el origen es b .

La actividad SOD en U/ml de cada muestra analizada viene dada por:

$$\text{SOD (U/ml)} = \left[\frac{\text{Abs 0 curva estándar/Abs muestra} - b}{a} \times \frac{0.023 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \times \text{factor de dilución} \right]$$

Después se ajustó a la concentración de proteínas obtenida por el Método Lowry.

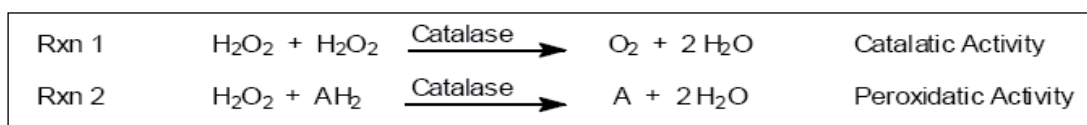
4.6.2. Estudio de la actividad catalasa (CAT)

4.6.2.1 Fundamento

La determinación de la actividad CAT se llevó a cabo mediante un ensayo espectrofotométrico (Bioxytech ® catalase-520tm assay; número de catálogo 21042).

El H_2O_2 es un producto tóxico del metabolismo aeróbico normal y de la producción de ERO patógenas. La CAT (EC 1.11.1.6, oxidorreductasa $2\text{H}_2\text{O}_2$) es una enzima que destruye el H_2O_2 por dismutación (actividad catalítica; Reacción 1) y también por la actividad peroxidativa (Reacción 2). En la reacción peroxidativa, los alcoholes de bajo peso molecular sirven como

donadores de electrones. No obstante, el significado fisiológico de la actividad peroxidativa es controvertido.

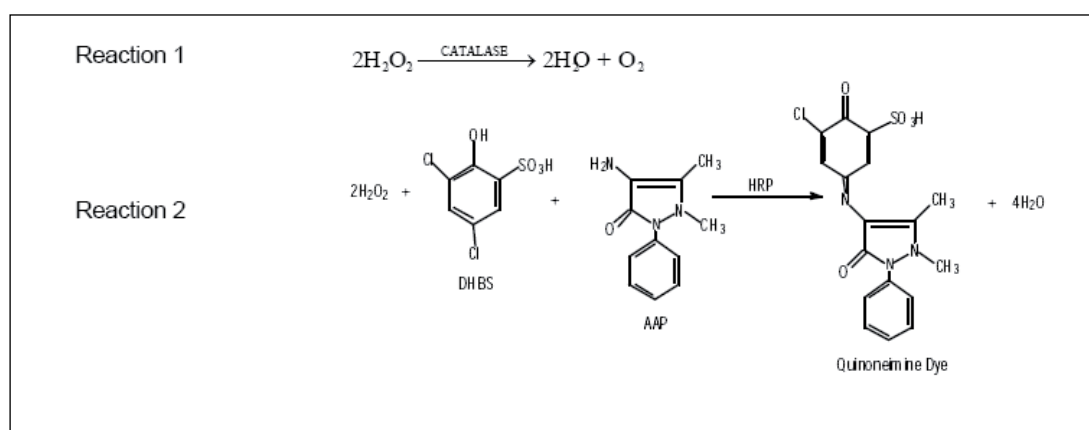


La medida espectrofotométrica directa de esta actividad requiere mediciones en la región ultravioleta (Aebi, 1984) (Aebi, 1984) donde puede interferir la absorción de proteínas y otros componentes de las muestras biológicas; el ensayo del OXIS Catalasa-520 utiliza la luz visible (520 nm) reduciendo significativamente las interferencias de la muestra.

4.6.2.2 Principio de la reacción

El principio de la reacción tiene dos pasos que se resumen en la siguiente figura.

Figura 4.2. Reacción de la actividad catalasa



La velocidad de dismutación del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular (O_2) es proporcional a la concentración de CAT (reacción 1). Por lo tanto, las muestras que contienen CAT se incuban en presencia de una concentración conocida de H_2O_2 . Después de incubarse exactamente un minuto, la reacción es parada con ácido sódico. La cantidad de H_2O_2 sobrante de la reacción es entonces

determinada por la reacción oxidativa de acoplamiento del 4-aminofenazona (4-aminoantipireno, AAP) y el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (DHBS), en presencia de H₂O₂ y catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) (reacción 2) (Fossati *et al.*, 1980). La quinoneimina coloreada resultante (N-(4-antipiryl)-3-cloro-5-sulfonato-p benzoquinonemonoimina) es medida a 520 nm. La actividad CAT se expresó en U/g de proteína.

4.6.2.3. Procedimiento

Las muestras que se usaron para este procedimiento fueron las células de la serie blanca aisladas y conservadas a -80 °C. Se realizó en cubeta para medir en espectrofotómetro.

- Añadir 30 µL de la curva estándar preparada o de la muestra a analizar en cada tubo de 1,5 ml
- Añadir 500 µL del sustrato (10 mM H₂O₂)
- Incubar durante 1 minuto exacto a temperatura ambiente
- Añadir 500 µL *Stop Reagent* (para parar la reacción)
- Tapar y mezclar por inversión (no usar vórtex)
- Añadir 20 µL de esta mezcla de reacción en cada una de las cubetas que se van a usar
- Añadir 2 ml del reactivo HRP/cromógeno en cada cubeta (añadir 1 volumen de HRP a 1000 volúmenes de reactivo cromógeno)
- Mezclar por inversión
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Leer la absorbancia a 520 nm

Las diluciones estándar se prepararon por la combinación de los volúmenes indicados:

| | | | | | | |
|----------------------|-----|------|------|------|-----|-----|
| Standard, µL | 0 | 13.3 | 28.6 | 66.7 | 120 | 200 |
| Sample Diluent, µL | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Final activity, U/mL | 0 | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 |

4.6.2.4. Cálculos

Utilizando los datos estándar, se realiza la siguiente ecuación con la absorbancia de la CAT (A_{520}) a 520 nm en U/mL:

$$A_{520} = ax^2 + bx + c$$

Donde a, b y c son los coeficientes de la ecuación de segundo grado, A_{520} es la absorbancia de la muestra y X es la actividad de CAT en U/mL.

Calculamos la concentración de CAT en la muestra usando la fórmula:

$$\text{Catalase U/mL} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a(c - A_{520})}}{2a}$$

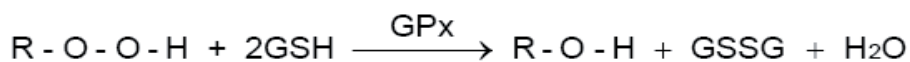
Después multiplicamos por el factor de dilución utilizado (usamos 2 diluciones, dilución 1/4 y 1/10) y normalizamos a la cantidad total de proteína de la muestra (hallada por Método Lowry).

4.6.3. Estudio de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

4.6.3.1. Fundamento

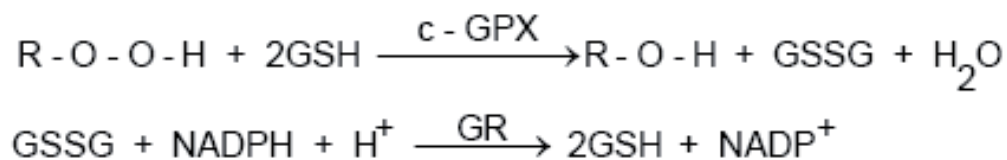
La Glutatión Peroxidasa celular (c-GPx, EC 1.11.1.9) es un miembro de la familia de las enzimas GPx cuya función es detoxificar peróxidos en la célula (F. Ursini, et al. (1995) Meth in Enzymol). Puesto que los peróxidos pueden descomponerse para formar radicales altamente reactivos, la enzima GPx desempeña un papel fundamental en la protección de la célula frente al daño de los RLO, en particular frente a la peroxidación de los lípidos.

Las enzimas GPx catalizan la reducción de H₂O₂ hasta agua y los peróxidos orgánicos (R-O-O-H) hasta su correspondiente alcohol estable (R-O-H) usando glutatión (GSH) como fuente de equivalentes de reducción.



4.6.3.2. Principios del procedimiento

La determinación de la actividad GPx se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico (Bioxytech ® cGPx-340 tm assay, número de catálogo 21017) el cual, es una medida indirecta de la actividad c-GPx (Paglia *et al.*, 1967). El glutatión oxidado (GSSG) produce la reducción de un peróxido orgánico gracias a la acción de la c-GPx y es reciclado al reducir su estado por la enzima glutatión reductasa (GR).



El fundamento de esta técnica es medir la disminución de NADPH a 340 nm durante 2 minutos, producida por la acción de la GR, que según la reacción mostrada arriba, transforma el GSSG producido por la GPx.

La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340 nm, para lo cual necesitamos un espectrofotómetro para que monitorice la actividad de la enzima GPx. El coeficiente de extinción molar del NADPH es 6220 M⁻¹cm⁻¹ a 340 nm y se calcula el descenso de NADPH/minuto.

Para el ensayo de la c-GPx, el homogenado celular es añadido a una solución que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH. La reacción enzimática se inicia por la adición del sustrato, tert-butil hidroperóxido y la absorbancia a 340 nm es registrada. La velocidad de disminución en la A_{340} es directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra.

La actividad GPx se determinó en las células mononucleares y los resultados se expresaron en mU/mg proteínas.

4.6.3.3. Procedimiento

Realizamos el experimento en cubeta y en placa de 96 pocillos.

- Para el procedimiento en **cubeta** los pasos realizados fueron:
 - Primero preparar el espectrofotómetro, ajustar para medir la absorbancia a 340 nm y establecer la temperatura adecuada (recomendada 23-25 °C). Hacer primero el blanco con agua destilada y a 340 nm.
 - Inmediatamente antes de empezar el experimento, diluir la muestra en *Assay Buffer*, por lo general 1/10 (por ejemplo, 30 μ L y 270 μ L de tampón). Estimar la cantidad de tampón que se va a utilizar, alicuotar y llevar a la temperatura recomendada. No es recomendable reutilizar por lo que se debe desechar el tampón que no se use.
 - Pipetear en cada cubeta lo siguiente:
 - 350 μ L de *Assay Buffer*
 - 350 μ L Reactivo NADPH: Añadir 7,5 ml de *Assay Buffer* a cada vial de NADPH (para 20 muestras). Llevar a la temperatura del ensayo recomendada y proteger de la luz. A temperatura ambiente se conserva durante 9 horas, no reutilizar.
 - 70 μ L de muestra
 - Colocar la cubeta en el espectrofotómetro.
 - Añadir a la cubeta: 350 μ L de una solución de tert-butil hidroperóxido (diluir el sustrato a 1:10000 con agua destilada, llevar a la temperatura del ensayo y no reutilizar). Mezclar y evitar aparición de burbujas.

- Registrar el cambio en la A_{340} durante tres minutos.

Hicimos dos blancos, en uno la muestra se sustituye por agua y en el otro la muestra se analiza con agua en lugar de tert-butil hidroperóxido.

Los primeros 15 segundos de la reacción (después de añadir el sustrato) son excluidos del análisis, porque pueden no ser representativos de la actividad enzimática de la muestra debido a la mezcla.

- Para el experimento en **placa** el procedimiento realizado fue el mismo, medimos los cambios de A_{360} durante 3 minutos, usamos una placa de 96 pocillos y los siguientes volúmenes de reactivos y muestras (las mismas que habíamos usado en la medición en cubeta):

- 75 μ L *Assay Buffer*
- 75 μ L Reactivo NADPH
- 15 μ L Muestra
- 75 μ L 0.007% tert-Butil Hidroperóxido

4.6.3.4 Cálculos

- Determinar la tasa de disminución de la A_{340} por minuto o los cambios de A_{360} durante 3 minutos para pocillo y placa respectivamente
- Calcular la absorbancia real de la muestra restando la observada en el blanco de agua en lugar de muestra
- Convertir la A_{340}/min de la muestra a NADPH consumido (nmol/min/ml) utilizando la siguiente relación:
- $1 \text{ mU/mL} = 1 \text{ NADPH nmol/min/mL} = (A_{340}/\text{min})/0,00622$
- Corregir la dilución de la muestra
- Expresar las unidades de actividad en la muestra en relación a la concentración de proteína (determinada por Método Lowry)

4.7) ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO LOWRY

La concentración total de proteínas, tanto para las actividades enzimáticas como para cargar las muestras del western blott, se determinó mediante el clásico Método de Lowry para poder realizar el experimento con todas las muestras a igual concentración y poderlas comparar.

El método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Se usan dos reactivos el Lowry y el Folin.

El reactivo de Lowry contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles, y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. El reactivo de Folin, contiene fenol, que al interactuar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul. A la muestra se le añade el reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad del color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

El protocolo usado fue:

- 490 µl agua bidestilada
- 10 µl de la muestra ya lisada
- 500 µl reactivo Lowry*
- Incubar en la oscuridad 20 minutos
- Añadir 250 µl de Folin**
- Vortear con pipeta
- Incubar en oscuridad 30 minutos

*Reactivo Lowry (Sigma; L3540/25VL): para su preparación a la botella de Lowry (en polvo) se le añaden 40 ml de H₂O.

** Reactivo Folin (Sigma; F9252): preparación con 18 ml de la botella de Folin y 90 ml de H₂O.

En la primera etapa el reactivo Lowry permite que los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unan a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos (color azul claro) y provocando el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina. Y en la segunda, actuando el cobre como catalizador, se produce la reducción del reactivo de Folin por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina. El reactivo de Folin de color amarillo, al ser reducido, da lugar a un complejo de color azul intenso que será medido por espectrofotometría.

Para determinar la concentración de proteínas de las distintas muestras se construyó una curva de calibrado a partir de una solución patrón con seroalbúmina humana (BSA). La concentración que tienen las muestras se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. Se usó un tubo con sólo agua destilada y los reactivos, como blanco para el ajuste del espectrofotómetro al cero de absorbancia.

La curva de calibrado se hizo con concentraciones de BSA comprendidas entre 0-10 mg/ml. Se midió por espectrofotometría a 660 nm la cantidad (concentración) total de proteínas de cada muestra.

Generalmente para nuestras muestras y la concentración de proteínas obtenida en el Lowry (mg/ml) cargamos de forma homogénea la misma cantidad de proteína (unos 15-20 μg) en geles discontinuos. Para ello usamos 30 μl de volumen total: 20 μg de la muestra (ajustada a μl por concentración de proteínas), 6 μl del tampón de carga (5X) y el resto H_2O . Después incubamos cada muestra durante 5 minutos a 95°C.

El tampón de carga permite la desnaturalización de las proteínas con un agente desnaturalizante (dodecilsulfato sódico (SDS)) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) que rompe los puentes disulfuro que mantienen la estructura terciaria de las proteínas. La separación en estas condiciones se produce por el peso molecular de cada proteína.

* Preparación del tampón de carga 10X:

- 0.3 M TRIS Base + HCl (pH 6,8)
- 50% glicerol
- 10% SDS
- 25% B-mercaptoetanol
- 0.05% Bromofenol

4.8) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES POR WESTERN BLOTTING

Los mecanismos antioxidantes también fueron caracterizados por medición de la concentración de las proteínas enzimas CAT, SOD-Cu/Zn y SOD-Mn y GPx.

El western blot es un procedimiento que combina entre sí varias técnicas para conseguir finalmente determinar la cantidad de una determinada proteína en una muestra problema. Las técnicas que se emplean son la electroforesis, la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa y la detección de la proteína deseada mediante el reconocimiento de un anticuerpo específico.

En primer lugar, las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa, donde son visualizadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Como resultado, podemos examinar la cantidad de proteínas en una muestra y comparar los niveles de proteína entre varios grupos, condiciones experimentales o muestras de distinta naturaleza.

4.8.1. Preparación de las muestras

El pellet de células que usamos para esta técnica fue sometido a lisis de eritrocitos (restos que contaminan) y posterior lisis de la serie blanca con el fin de liberar las proteínas del interior de la célula. El protocolo empleado fue el siguiente:

4.8.1.1 Lisis de eritrocitos (destrucción de la membrana celular por shock osmótico)

- 100 µl de agua bidestilada y resuspender el pellet
- Agitamos con el dedo suavemente 20 segundos
- Dejamos que pasen 40 segundos
- Añadimos 1,4 ml de NaCl 0.9%
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos
- El pellet contiene linfos, desechar el sobrenadante

4.8.1.2. Lisis de serie blanca

- Añadir unos 50 μ l (más o menos, en función de la cantidad de pellet) de tampón de lisis total al pellet
- Resuspender el pellet celular y dejar durante 15 minutos en hielo
- Vortear
- Centrifugar a 13000 g/rcf durante 10 minutos a 4°C
- Recoger sobrenadante y congelar 30 minutos (en congelador)

* Tampón de lisis:

Disolución madre:

- 2.38 g de HEPES pH 7,4 + 20 ml de agua bidestilada
- 0.30 g de Na Cl + 10 ml de agua bidestilada
- 0.37 g de NaF + 5 ml de agua bidestilada
- 0.216 g de b-glicerofosfato + 1 ml de agua bidestilada
- 0.087g de PMSF + 5 ml de etanol (en congelador)

Para 10 ml de tampón:

- HEPES 400 μ l
- NaCl 2000 μ l
- NaF 500 μ l
- B-glicerofosfato 100 μ l
- PMSF 100 μ l
- Triton X 100 100 μ l (al 10% poner 1 ml)
- Inhibidor de fosfatasas 100 μ l* (*ortovanadato*)
- Inhibidor de proteasas 30 μ l*
- Agua bidestilada hasta 10 ml (unos 5720 μ l)

*Echar en el momento que se va a usar.

Dado que nos encontramos con muchos problemas para la realización del western blot, que atribuimos que podrían ser producidos por la contaminación

del pellet por los eritrocitos, algunos de los experimentos fueron realizados con otro tampón de lisis denominado “tampón RIPA”.

* Tampón de lisis RIPA:

- 55.6 g/l NaH_2PO_4 : Tampón A
- 53.6 g/l $\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 35.6 g/l $\text{NaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: Tampón B
- TRITON 20%
- 0.5 g SDS
- 0.5 % NaN_3 (azida sódica)
- NaCl 4M

Así pues el tampón con volumen total de 500 ml contiene:

- 4 ml Tampón A
- 21 ml Tampón B
- 25 ml Tritón
- 0.5 g SDS
- 2.5 g azida sódica
- 12.5 ml NaCl 4M
- Enrasar a 500 ml con H_2O

En el momento que se va a usar añadir:

- 10 mg/ml deoxicolato sódico
- 1 mM PMSF (preparado en etanol y guardado a -20°)
- Inhibidor de proteasas

La concentración total de proteínas, al igual que para las actividades enzimáticas, fue calculada mediante el clásico Método de Lowry para poder realizar el experimento con todas las muestras a igual concentración y poderlas comparar.

4.8.2 Técnica de Western Blot

4.8.2.1. Fundamento de la técnica

La técnica de western blot (WB) combina la selectividad de la electroforesis en un gel de poliacrilamida, que permite la separación de las proteínas, con la sensibilidad de una prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados y que, por lo tanto, permite la identificación de una única proteína (la de interés) dentro de una muestra compleja proveniente de un extracto proteico de origen diverso (células, fluidos biológicos o tejidos).

La técnica de electroforesis consiste en la separación de las proteínas de una muestra en función de su peso molecular. Para ello, las proteínas de la muestra disueltas con tampón de carga se desnaturalizan por calentamiento a 95°C durante 5 minutos (se rompen los enlaces de hidrógeno).

4.8.2.1. Metodología

4.8.2.2.1 Preparación del gel de poliacrilamida y separación de las proteínas por electroforesis

Los geles de poliacrilamida se preparan según la tabla (en ml). El tamaño del poro del gel influye notablemente en la capacidad de migración de la proteína y, por lo tanto, debe ser el apropiado al peso molecular de la proteína.

| 10% | 5 ml (1 gel) | 10 ml (2 geles) | 15 ml (3 geles) | 20 ml (4 geles) |
|----------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| H₂O | 2.425 | 4.8 | 5.9 | 7.9 |
| 40% Acrylamida | 1.275 | 2.5 | 5 | 6.7 |
| TRIS 1.5 M (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| 10% APS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| TEMED | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.010 |

Para Catalasa de 60 KDa usamos el gel al 10%

| 12% standard | 5 ml (1 gel) | 10 ml (2 geles) | 15 ml (3 geles) | 20 ml (4 geles) |
|----------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| H₂O | 2.3 | 4.3 | 6.66 | 8.6 |
| 40% Acrylamida | 1.5 | 3 | 4.33 | 6 |
| TRIS 1.5 M (pH 8.8) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 |
| 10% SDS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| 10% APS | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| TEMED | 0.0035 | 0.006 | 0.008 | 0.010 |

SDS (Merck; 822050): 1g se disuelve en 10 ml de H₂O

APS (Sigma; A3678-25G): 1 g en 10 ml de H₂O

Preparación del TRIS 1,5 M pH 8.8:

- A 200 ml de H₂O le añadimos 36,33 g de TRIS base (Roche; 3573826001). Ajustar pH añadiendo HCl.
- Limpiar los cristales con alcohol y montar. Echar el gel rápido y con cuidado (de 1 ml en 1 ml)
- Añadir agua bidestilada por encima y dejar que gelifique (aproximadamente 20 minutos)
- Una vez gelificado eliminar el agua que sobra de arriba y secar con papel de filtro.
- Preparar Stacking gel (cantidades en ml):

| STACKING GEL | 4 ml (2 geles) | 8 ml (4 geles) |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| H₂O | 2.87 | 5.74 |
| 40 % Acrylamida | 0.5 | 1 |
| TRIS 0.5 M (pH 6.8) | 1 | 2 |
| 10% SDS | 0.04 | 0.08 |
| 10% APS | 0.04 | 0.08 |
| TEMED | 0.006 | 0.012 |

TRIS 0,5 M pH 6.8: 66.6 ml de TRIS 1.5 M (preparado para hacer el gel) y 133.3 ml H₂O. Ajustar pH a 6.8 añadiendo HCl.

- Con micropipeta de 1 ml añadimos el stacking por encima del gel hasta cubrirlo. Así, el gel se compone de dos zonas: una zona de apilamiento o staking, de baja concentración de acrilamida, para facilitar la entrada y la compactación de las muestras en el gel y una zona inferior de resolución o running con alta concentración de acrilamida (10-12%) que separa las proteínas por su peso molecular.
- Colocamos los peines (10 pocillos y 1,5 mm) y dejamos polimerizar 20-30 minutos
- Una vez polimerizado y antes de cargar el gel, lavar los pocillos con tampón de electroforesis (*Running Buffer*, ver composición delante).
- Colocar los cristales en la cubeta de electroforesis (BIO RAD Mini-PROTEAN Tetra cell). Quitar los peines y lavar los pocillos con tampón de electroforesis. Añadir dicho tampón hasta que cubra los pocillos.
- Cargar las muestras para hacerlas correr por el gel de electroforesis. Para ello deben haber sido preparadas previamente añadiéndoles el tampón de carga explicado anteriormente. Empezamos a cargar por la derecha y preferiblemente ponemos en la esquina el marcador, unos 4 µl (Protein Ladder de Fermentas, SM0671) y a continuación las muestras. El marcador nos permite tener unas bandas de distintos pesos moleculares que sirven de referencia para poder identificar la proteína.
- El gel se somete a un campo eléctrico de voltaje constante de 100 voltios durante al menos 2 horas en el tampón de electroforesis.

4.8.2.2.2. Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

Una vez separadas, las proteínas por electroforesis fueron transferidas a una membrana para el inmunobloqueo por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). Durante la transferencia, se pone el gel migrado en contacto con una membrana de nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA) en condiciones húmedas y se crea un campo eléctrico que empuje a las proteínas a salir del gel. Así se quedan sobre la membrana siendo susceptibles de unirse a los anticuerpos específicos deseados.

- Cortar para cada gel una membrana de nitrocelulosa y 2 papeles de filtro (Whatman) con medidas de 8.5 x 7 cm, adecuadas al soporte,

- Sumergir en tampón de transferencia a 10X (*Transfer Buffer*, ver composición delante), la membrana, el papel y las esponjas.
- Se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana.
- Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cubeta en la que se encuentra el tampón de transferencia y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+).
- El proceso se desarrolla a una intensidad constante de 120 mA, a 4°C, durante toda la noche (*overnight*) y en tampón de transferencia. Según los tiempos del experimento, en ocasiones la transferencia se realizó durante 50 minutos a 120 voltios o 90 minutos a 60 voltios a 4°C y cubierto de tampón de transferencia.

4.8.2.2.3. Bloqueo o incubación con el/los anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés

- Tras la transferencia se separa el gel de la membrana con cuidado. El gel se tiñe con azul de Coomassie.
- Posteriormente las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo para impedir las uniones inespecíficas de los anticuerpos, con leche desnatada al 5% y TBS-Tween (50 ml de TBS 10 X, 450 ml de H₂O y 250 µl de Tween).
- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 15 ml de TBS-T.
- Se incubaron las membranas con agitación en el anticuerpo primario, a la dilución que le corresponda que varía en función del anticuerpo (ver tabla) y con el tampón de leche al 1%, durante 2 h (a T^a ambiente) o durante toda la noche (a 4°C).
- Se realizaron 3 lavados de 5 min leche 1% TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo que haya podido quedar en la membrana.

4.8.2.2.4. Bloqueo o incubación con anticuerpos secundarios que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores

- Añadir anticuerpo secundario (anti-mouse o anti-rabbit) con tampón de leche 1% durante 1 hora (ver composición delante) a temperatura ambiente y agitación constante. Varía la cantidad según el anticuerpo (ver tabla).
- Añadir 0.7 µl de antipatrón (precisión strep)
- Hacer 3 lavados de TBS-T de 5 minutos

Lista de anticuerpos utilizados:

- CAT 505 (Sigma; C 0979)
- Cu/Zn SOD pAb (SOD 101) (Stressgen; SOD 100 E)
- SOD-Mn (Stressgen; SOD 110)
- GPx 1 (Abcam; ab22604)
- Anti-Mouse IgG (goat) horseradish Peroxidase conjugated (Calbiochem; 401215)
- Anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated (cell signaling; 7074)

| Ac Primario | Peso molecular | Concentración | Ac secundario | Concentración |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| GPx | 22 KDa | 1:500 | Anti-Rabbit | 1:4000 |
| SOD Mn | 18 KDa | 1:5000 | Anti-Rabbit | 1:4000 |
| SOD Cu/Zn | 20 KDa | 1:1000 | Anti-Rabbit | 1:4000 |
| CAT | 66 KDa | 1:7000 | Anti-Mouse | 1:7500 |
| Controles de carga | | | | |
| Actina | 43 KDa | 1:250 | Anti-Mouse | 1:7500 |
| Tubulina | 50 KDa | 1:1000 | Anti-Mouse | 1:7500 |

4.8.2.2.5. Revelado de la membrana

La membrana se incubó 1 minuto con reactivos para el revelado. Para ello añadimos el sustrato (luminol: ECL Western Blotting Detection Reagents; GE Healthcare Life Sciences, UK) en cantidad de 1 mL/membrana.

Inmediatamente después las imágenes se capturaron mediante un digitalizador de imagen (Fujifilm LAS-1000 plus).

4.8.2.2.6. Densitometrado

Las señales fueron cuantificadas con el programa de análisis ImageGauge, versión 4.0, que permite evaluar la intensidad de la señal para cada una de las bandas estudiadas (Fuji Photo Film Co., Ltd).

4.8.2.2.7. Preparación de tampones

* Tampón de electroforesis 10X:

- TRIS 0.25 M: 30 g
- Glicina 2M: 144 g
- SDS 1%: 10 g
- Enrasar hasta 1 litro con H₂O bidestilada

* Diluir a 1 X para usar: 100 ml de la preparación con 900 ml de H₂O.

* Tampón de transferencia 1X:

Para preparar 1 litro:

- Tris 25 mM: 3.03 g
- Glicina 192 mM: 14.4 g
- Metanol 20% v/v: 200 ml
- Enrasar con H₂O hasta 1 litro

Lo usamos diluido a 10X. Para ello, cogemos 80 ml del tampón de transferencia 1X, hasta 800 de H₂O y añadimos 200 ml de metanol en el momento en que se usa, ya que es muy neurotóxico y se evapora con facilidad.

* Preparación de TBS (10X):

- TRIS 24,2 g
- NaCl 80 g
- Disolver en 1 litro de H₂O
- Ajustar pH a 7.6 con HCl

* Preparación leche al 5%:

- 5 g de leche en polvo
- 100 ml de TBS-Tween 1X

* Preparación leche al 1%:

- 1g de leche en polvo
- 100 ml de TBS-T 1X

También se puede hacer a partir de 20 ml de leche al 5% y hasta 100 ml de TBS-T.

4.9) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se han introducido en bases de datos SPSS (versión 11.5) y se realizaron análisis estadísticos según fuera necesario con los diferentes test estadísticos (Man-Witney, T-Student pareados).

Las diferencias estadísticas se han analizado utilizando el test no paramétrico de Mann-Witney. Los resultados se expresan en las tablas y figuras como la media \pm error estándar de la media. Se ha usado la correlación de Pearson en los casos necesarios.

Para los estudios genéticos se han usado test estadísticos específicos que se detallan en sus correspondientes apartados.

4.10) EXTRACCIÓN ARN DE LEUCOCITOS EN FRESCO

La sangre fue extraída a las 8 de la mañana y en ayunas y recogida en tubos heparinizados para su inmediato procesamiento.

La extracción total de ARN se llevó a cabo con el Kit *Leukolock™ Total ARN Isolation System* (Ambion; Ref. AM 1923, AM 1933, AM 1934) según las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones que se exponen a continuación:

- Aislamiento y estabilización de leucocitos: 9-10 ml de sangre anticoagulada (en 3 tubos de EDTA) se pasan a través de un filtro del kit LeukoLOCK que captura los leucocitos y está conectado a un tubo de vacío donde el plasma, plaquetas y eritrocitos son eliminados.
- El filtro se lava con 3 ml solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar los eritrocitos residuales, y después con 3 ml de ARN later para estabilizar el ARN de leucocitos.
- Eliminar ARN later residual del filtro haciendo vacío en otro tubo
- Lisis de leucocitos: preparar en el momento el Lysis/Binding Sol añadiendo el pH Adjustment Solution. Preparar en función del número de muestras (2.5 ml de Lysis/Binding y 70 microl de pH Adj). Pasar el contenido por el filtro y recoger el producto del lisado en un tubo de 15 ml. El filtro lo podemos desechar.
- Agitar el tubo para facilitar la lisis.
- Añadir 25 µL de Proteínasa K, que captura el ARN y agitar durante 5 minutos.
- Añadir 50 µL de ARN Binding Beads y 2.5 ml de 100% isopropanol para purificar el ARN. Agitar manualmente 5 minutos.
- Para recuperar el ARN, centrifugar a 3200 rpm durante 3 minutos y desechar sobrenadante. Nos quedamos con el ARN Binding Beads.
- Lavar con 1200 µL de Wash Solution 1 (primero 600 µL para recuperar las Beads y luego otros 600 µL para recoger restos de las paredes del tubo) y pasar a un eppendorf.
- Centrifugar a máximo 15-30 segundos.

- Recuperar por captura magnética (imán) las Beads y desechar con mucho cuidado el sobrenadante.
- Lavar con 750 μ L de Wash Solution 2/3, vortear 30 segundos y centrifugar a máximo 15-30 segundos, para facilitar el lavado. Recuperar por captura magnética (imán) las Beads y desechar con mucho cuidado el sobrenadante. Hacer 2 lavados.
- Dejar reposar con tapa de eppendorf abierta 2 minutos para secar bien las Beads.
- Para eluir el ARN añadir 50 μ L de Elution Solution y vortear durante 30 segundos
- Centrifugar a 16000 rpm durante 2 minutos
- El ARN que contiene el sobrenadante se lleva a un nuevo contenedor adecuado para su conservación.
- Previo a la congelación el ARN se eluye con 1 μ l de agua libre de ARNasas para cuantificarlo y comprobar su integridad. El resto se congela a - 80°C hasta su uso. La concentración de ARN se estima midiendo la absorbancia a 260 nm y su pureza con el ratio A260/A280. El ARN se considera puro cuando el ratio es cercano a 2.

4.11) CUANTIFICACIÓN DE ARNm POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS SEQUENOM

Se analizaron un total de 18 muestras de controles, 20 de pacientes con EC activa al debut de la enfermedad y 10 de pacientes con EC inactivos (sólo 5 de ellos coincidieron con los debuts).

4.11.1. Fundamento

La expresión de ARNm de las diferentes enzimas antioxidantes (CAT, SOD1 y SOD2) se midió por la aplicación “SEQUENOM MassARRAY® quantitative gene expression (QGE) analysis (Sequenom TM)”. Puesto que esta técnica permite analizar la expresión de hasta 20 genes diferentes, analizamos la expresión de otras moléculas implicadas también en el estrés oxidativo, la apoptosis, la señalización intracelular y la telomerasa. Así los genes analizados fueron:

- Genes relacionados con el estrés oxidativo: CAT, SOD-Cu/Zn (SOD 1), SOD-Mn (SOD2), NOS2A, PKCgamma, PKCzeta
- Genes relacionados con la apoptosis: FASR, FASLG, STAT1, NFKB1, ASK
- Genes de moléculas de señalización intracelular: PSKH1, PPID, ABCB1, IL-2, IL23R.
- Genes de telomerasa: TERT

El método MassARRAY® QGE combina PCR (rcPCR) con la espectrometría de masas de desorción/ionización láser según tiempo de vuelo asistida por matriz (MALDI-TOF MS: matrix -assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ya descrita previamente (Vandesompele *et al.*, 2002).

En esta técnica, tras el aislamiento del ARN, se continúa con la obtención del cDNA correspondiente por medio de una transcripción inversa. Posteriormente, el cDNA así obtenido es sometido a una PCR en tiempo real en la que cada cDNA de interés compete en la amplificación con un competidor. Este competidor consiste en una molécula sintética de ADN cuya secuencia es

idéntica en todas las posiciones a la de cada uno de los cDNAs que se pretende cuantificar, excepto en una sola base. La determinación de cada muestra se hizo 8 veces usando 8 concentraciones distintas de los competidores. Con el uso de estos competidores se obtuvo, para cada gen a analizar, una recta patrón, de donde se extrajo la cantidad de ARN m de nuestro gen en esa muestra en concreto. Posteriormente a la PCR competitiva, los productos de reacción son purificados y llevados al espectrómetro para su cuantificación.

4.11.2. Transcripción Reversa (RT-PCR)

Para la transcripción inversa se utilizaron 1000 ng de ARN total. La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit "High Capacity ARN -to-cDNA Kit" (Applied Biosystems Pty Ltd, VIC 3179, Australia) y una combinación de cebadores aleatorios y oligo(dT) siguiendo los protocolos del proveedor.

4.11.3. PCR en tiempo real y preparación de los productos obtenidos

Tras la transcripción reversa, el cDNA obtenido fue diluido 1/10 en agua. Un μ l de esta dilución fue suplementado con 1 μ l de una mezcla de competidores para realizar la primera PCR competitiva que ocurre en el protocolo MassARRAY Quantitative Gene Expression (QGE). Los productos de la PCR fueron lavados con fosfatasa alcalina para eliminar el exceso de dNTPs y posteriormente se realizó una reacción de extensión con un cóctel de cebadores y la mezcla "ACT termination mix", que contiene ThermoSequenaseTM, los dideoxinucleótido trifosfatos ddATP, ddCTP y ddTTP, y el trifosfato de desoxinucleótido Dgtp, incluida en el kit "IPLEX GOLD".

Los productos de la amplificación fueron tratados con resina SpectroCLEAN (SequenomTM) para eliminar las sales presentes en el tampón de reacción.

4.11.4. Obtención del espectro de masas y normalización estadística de las medidas

Se depositaron 25 nl de solución de cada una de las reacciones obtenidas sobre un Spectrochip (Sequenom TM) en formato de 384 pocillos, en la que se

realiza la cuantificación del ARN m. Los productos fueron resueltos en un espectrómetro lineal de masas MALDI TOF (MassARRAY Compact, Sequenom, San Diego, CA.). La señal de adquisición, la asignación del alelo y la integración por área de los picos del espectro se realizaron con el aparato MassARRAY RT Workstation v3.4 (Sequenom, San Diego, CA). Los datos fueron analizados utilizando MassARRAY QGE Analyzer v3.4 (Sequenom, San Diego, CA.) Este análisis permite la cuantificación de cada uno de los ARN m de interés por medio de la interpolación del pico obtenido en el espectro para un ARN m concreto en la recta patrón generada con su competidor correspondiente a distintas concentraciones. Todos los picos fueron identificados y analizados por MassARRAY Quantitative Gene Expression 3,4 software (Sequenom™).

La normalización del número de copias entre las muestras de diferentes experimentos se llevó a cabo incluyendo entre los genes analizados 3 genes *housekeeping* (ACTB-6, GAPDH-6 y HMBS-7) y el software geNorm. Los factores de normalización por muestra se calcularon mediante la media geométrica de la combinación más estable de estos ensayos normalizados, determinado por la medida de la variación en pares según los cálculos de geNorm (Gentleman *et al.*, 2004). Los resultados se presentan como la media y desviación típica de 4 determinaciones idénticas para cada muestra.

4.11.5. Diseño de las sondas Mass ARRAY

Todos los cebadores y competidores de la PCR fueron diseñados usando el QGE Assay Design – Multiplexed QGE Assay Design software (Sequenom™) y contienen idénticas secuencias en sus extremos 5' para conseguir la masa atómica adecuada. El panel de genes analizados para este estudio fue diseñado como una reacción de PCR múltiple única que ya incluye los genes ACTB-6, GAPDH-6 y HMBS-7 como controles internos. En el protocolo establecido por Sequenom se establece una primera reacción de PCR donde un par de oligos (llamados Up y Down) se usan para amplificar la región correspondiente a cada uno de los genes a estudiar. Posteriormente, cada uno de estos productos de amplificación es sometido a una segunda reacción de

PCR (reacción de extensión) en la que el producto final tendrá una secuencia distinta según la mutación concreta que tiene.

Primers para la amplificación

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| FAS R DOWN | ACGTTGGATGCTGCATGTTTTCTGTA CTTC |
| STAT1 DOWN | ACGTTGGATGCCATCAAGTTCATTGGCTC |
| TERT DOWN | ACGTTGGATGATCCTGAAAGCCAAGAACGC |
| PKC zeta DOWN | ACGTTGGATGTGCCATGTCCGGGAGAAGAC |
| SOD2 DOWN | ACGTTGGATGAGAAGTACCAGGAGGCGTTG |
| SOD1 DOWN | ACGTTGGATGACATTGCCCAAGTCTCCAAC |
| CAT DOWN | ACGTTGGATGCTGCACAAAGGTGTGAATCG |
| ASK DOWN | ACGTTGGATGGTAGAGAACATCCAATAGTG |
| IL-23R DOWN | ACGTTGGATGCCAATGTCTCCTCTGTTGTC |
| NOS2A DOWN | ACGTTGGATGAGGTGGAAGCCGCTGGCATT |
| PKC gamma DOWN | ACGTTGGATGTCCTTCACAATCAGGGCATC |
| NFKB1 DOWN | ACGTTGGATGACCAGCTCTCTGACTGTACC |
| IL-2 DOWN | ACGTTGGATGCCAGGATGCTCACATTTAAG |
| ABCB1 DOWN | ACGTTGGATGTTTGGATGAAGCCACGTCAG |
| PSKH-1 DOWN | ACGTTGGATGTCAATGAAGTCCTTGGCCAG |
| FASLG DOWN | ACGTTGGATGTCTTCCACCTACAGAAGGAG |
| PPID DOWN | ACGTTGGATGATTGGCAGGGAGCAATTGAC |
| | |
| FAS R UP | ACGTTGGATGGGGTGGCTTTGTCTTCTTCT |
| STAT1 UP | ACGTTGGATGGCCTTTGGAAAGTATTACTCC |
| TERT UP | ACGTTGGATGACTGCACGGCCTCGGAGGG |
| PKC zeta UP | ACGTTGGATGCTGGAACACACTCGGTGGG |
| SOD2 UP | ACGTTGGATGCATTGAACTTCAGTGCAGGC |
| SOD1 UP | ACGTTGGATGCCTCTATCCAGAAAACACGG |
| CAT UP | ACGTTGGATGAGGCTCTTCTGGACAAGTAC |
| ASK UP | ACGTTGGATGGAGAGTGAATGGAGCTGATG |
| IL-23R UP | ACGTTGGATGGGCTAACAGTTGCTTCCATC |
| NOS2A UP | ACGTTGGATGATGGCTCAACAGCCTGAAGC |
| PKC gamma UP | ACGTTGGATGCATCCAGCATCACATTGTCC |
| NFKB1 UP | ACGTTGGATGTCCTGCTCCTTCCAAAACAC |
| IL-2 UP | ACGTTGGATGTCTTCTAGACACTGAAGATG |
| ABCB1 UP | ACGTTGGATGCTTCTCTGGCTTTGTCCAGG |
| PSKH-1 UP | ACGTTGGATGAGATCCTCAGGGGCAAGTAC |
| FASLG UP | ACGTTGGATGCCAAAGATGATGCTGTGTGC |
| PPID UP | ACGTTGGATGTCTGCGGTACAATGCTTTGG |

Primers para la extensión

| | |
|----------------------|----------------------------|
| FAS R EXT | CCTTTCTCTTCACCCAA |
| STAT1 EXT | GGCTCTGGTGCTTCCTT |
| TERT EXT | CCAAGAACGCAGGGATG |
| PKC zeta EXT | GGGAGAAGACAGGAGGG |
| SOD2 EXT | gTGGCCAAGGGAGATGTT |
| SOD1 EXT | caatTCTCCAACATGCCTCTC |
| CAT EXT | TGTGAATCGCATTCTTAGGCT |
| ASK EXT | tccTCAGCCAAAAACCGGCTTA |
| IL-23R EXT | ggagCCTCTGTTGTCAGAAGTA |
| NOS2A EXT | ccccGCCGCTGGCATTCCGCAC |
| PKC gamma EXT | tccGGGCATCATCTACAGGGACC |
| NFKB1 EXT | ctacgGTACCCCAGAGACCTCAT |
| IL-2 EXT | ggttgACATGCCCAAGAAGGCCAC |
| ABCB1 EXT | agACAGAAAGTGAAAAGGTTGTCC |
| PSKH-1 EXT | ctcccCACTAGGCCAGGGCTCCCCAG |
| FASLG EXT | agattGCAGAACTCCGAGAGTCTACC |
| PPID EXT | agTGACAGTTGTTTAGAGGCTCTTGA |

Primers para la amplificación y extensión de los controles internos

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| ACTB-6 UP | ACGTTGGATGTGAACCCCAAGGCCAACCG |
| ACTB-6 DOWN | ACGTTGGATGGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC |
| ACTB-6 EXT | CTCAAACATGATCTGGGTC |
| GAPDH-6 UP | ACGTTGGATGCCCTGTTGCTGTAGCCAAAT |
| GAPDH-6 DOWN | ACGTTGGATGCAACGACCACTTTGTCAAGC |
| GAPDH-6 EXT | ttttTCAAGCTCATTTCCTGGTATG |
| HMBS-7 UP | ACGTTGGATGAGAGAAAGTTCCCGCATCTG |
| HMBS-7 DOWN | ACGTTGGATGAAGCCGGGTGTTGAGGTTTC |
| HMBS-7 EXT | gatGTTTCCCGAATACTCC |

Secuencias del competidor**FAS R comp**

CTGCATGTTTTCTGTACTTCCTTTCTCTTCACCCAAICAATTAGTGGAATTGGCAAAAAGAAGAAGACAAAGCCACCC

STAT1 comp

CCATCAAGTTCATTGGCTCTGGTCTTCCTTaGGCCTGGAGTAATACTTTCCAAAGGC

TERT comp

ACTGCACGGCCTCGGAGGGCAGAGGGCCGGCGGCCCTTGCCCCCAGCGiCATCCCTGCGTTCTTGGCTTTC
AGGAT

PKC zeta comp

CTGGAACACACTCGGTGGGGCCGCTCTCTTCCCACTTGtCCCTCTGTCTTCTCCCGGACATGGCA

SOD2 comp

CATTGAACCTCAGTGCAGGCTGAAGAGCTATCTGGGCTGaAACATCTCCCTTGGCCAACGCCTCCTGGTACTTCT

SOD1 comp

ACATTGCCCAAGTCTCCAACATGCCTCTCaTCATCCTTTGGCCACCGTGTTTTCTGGATAGAGG

CAT comp

CTGCACAAAGGTGTGAATCGCATTCTTAGGCTaCTCAGCATTGTACTTGTCCAGAAGAGCCT

ASK comp

GTAGAGAACATCCAATAGTGTATAATCTTCAGCCAAAAACCGGCTTaaAGTGTCTTCATCAGCTCCATTCACTCTC

IL23R comp

CCAATGTCTCCTCTGTTGTCCAGAAGTAiGGTGCCCTGTAGAGATGGAAGCAACTGTTAGCC

NOS2A comp

AGGTGGAAGCCGCTGGCATTCCGCACiAAGCAGGGCACTGGGTCTTGGGGCTCAGGCTGTTGAGCCAT

PKC gamma comp

CATCCAGCATCACATTGTCCAGCTTCiGGTCCCTGTAGATGATGCCCTGATTGTGAAGGA

NFKB1 comp

ACCAGCTCTCTGACTGTACCCCCAGAGACCTCATiGTTGTCCATAAGTGTTCGGAAGGAGCAGGA

IL-2 comp

TCTTCTAGACACTGAAGATGTTTCAGTTCaGTGGCCTTCTTGGGCATGTAAACTTAAATGTGAGCATCCTGG

ABCB1 comp

CTTCTCTGGCTTTGTCCAGGGCTTCTaGGACAACCTTTTCACTTTCTGTATCCAGAGCTGACGTGGCTTCATCCAAA

PSKH1 comp

TCAATGAAGTCCTTGGCCAGGTTGGACACACTAGGCCAGGGCTCCCCAGiGTAAGTGTACTTGGCCCTGAGGATCT

FASLG comp

CCAAAGATGATGCTGTGTGCATCTGGCaGGTAGACTCTCGGAGTTCTGCCAGCTCCTTCTGTAGGTGGAAGA

PPID comp

TCTGCGGTACAATGCTTTGGTATTTGATGGGTCTAGaTCAAGAGCCTCTAAACAAGTGTCAATTGCTCCCTGCCAAT

Secuencias del competidor de los controles internos**ACTB-6 comp**

GGGTGTTGAAGTCTCAAACATGATCTGGGTCTCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGTTCA

GAPDH-6 comp

CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGaCATACCAGGAAATGAGCTTGACAAAGTGGTCGTTG

HMBS-7 comp

AAGCCGGGTGTTGAGGTTTCCCGAATACTCCaGAACTCCAGATGCGGGAACTTTCTCT

4.11.6. Análisis estadístico

Los datos se introdujeron en bases de datos Excel y se realizaron análisis estadísticos según fuera necesario con los diferentes test estadísticos (ANOVA y t-Student).

Las diferencias estadísticas se han analizado utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los resultados se expresan en las tablas y figuras como la media \pm error estándar de la media. Una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

4.12) MAPEADO FINO

El análisis genético de las enzimas antioxidantes CAT y SOD se llevó a cabo mediante la determinación de la existencia de polimorfismos simples en la secuencia que pudieran estar en correlación con la limitación de la actividad de la enzima en los pacientes con EC.

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma.

4.12.1. SNPs escogidos

Los SNPs elegidos y que se analizaron fueron aquellos encontrados en la bibliografía y ya descritos en otras enfermedades de tipo autoinmune o en patologías en las que existe una inhibición de la enzima CAT y SOD

- Para SOD se escogieron:

| | | |
|-----------|-----------|-----------|
| RS2758346 | RS5746096 | RS2758339 |
| RS4880 | RS5746136 | |

- Para CAT se escogieron:

| | | |
|-----------|------------|------------|
| RS525938 | RS769217 | RS2300182 |
| RS3758730 | RS704724 | RS2284365 |
| RS494024 | RS1001179 | RS7943316 |
| RS564250 | RS12273124 | RS17886155 |
| RS475043 | RS1049982 | |

4.12.2. Extracción del ADN de los linfocitos

Se analizaron un total de muestras de 77 pacientes con EC y de 49 controles sanos. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Extraer sangre periférica en 2 tubos con EDTA (6 ml)
- Pasar la sangre a tubos de Filcoll con pipeta Pasteur
- Centrifugar a 3500 rpm durante 30 minutos (sin freno)
- Pasar la nube obtenida (serie blanca) a otro tubo nuevo
- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos
- Desechar el sobrenadante
- Anadir 3 ml de PBS al pellet
- Centrifugar 1500 rpm durante 5 min
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta poco a poco para dejar el pellet seco

Posteriormente a la obtención de las células nucleadas de la sangre, se realizó la extracción de ADN genómico gracias a la utilización del robot Chemagic Magnetic Separador Module1 (Chemagen, Baesweiler, Germany) que permite la extracción automatizada de ADN genómico a partir de 1-10 ml de sangre total o de un pellet de células. El robot utiliza un sistema de partículas magnéticas que permite obtener gran cantidad de ADN y de elevada pureza. Típicamente, a partir de 1 ml de pellet de células se obtienen unos 200 µg de DNA.

4.12.3. Genotipado

El genotipado de los polimorfismos mencionados se llevó a cabo utilizando la plataforma Sequenom MassARRAY. Todos estos SNPs fueron genotipados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sequenom, San Diego, CA, EE.UU.).

Los ensayos de SNPs fueron diseñados utilizando un software específico *Assay Design software* (www.mysequenom.com/tools). Las reacciones en cadena de polimerasa se realizaron partiendo de un volumen de 5 µl en una placa de 384 pocillos y de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por Sequenom. El producto amplificado fue lavado con fosfatasa alcalina para neutralizar cualquier dNTPs no incorporado. Las reacciones de la prueba Alelo la discriminación se llevaron a cabo mediante la adición de cebadores de extensión, la ADN polimerasa y una mezcla de dNTPs y ddNTPs en cada

pocillo. Se añadió una resina de limpieza *MassExtend* a la mezcla para eliminar las sales extrañas que puedan interferir con el análisis de MALDI-TOF. La reacción fue después depositada en un SpectroCHIP II microarray y sometida a un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Todas las muestras se realizaron por triplicado y los controles negativos se incluyeron para control de la contaminación.

4.12.4. Análisis estadístico

Se consideraron sólo aquellos ensayos para los que se obtuvo un resultado para al menos el 90% de las muestras. Al final se analizaron un total de 25 SNPs. La significatividad estadística fue evaluada por un test ANOVA usando el programa informático Golden Helix SVS (www.goldenhelix.com/). Una $p < 0,05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

4.13) MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ENZIMA CATALASA Y MEDIDA DE LA APOPTOSIS

Los estudios de apoptosis se realizaron a partir de muestras de sangre periférica de pacientes al debut de la EC y controles sanos extraída en tubos heparinizados (17 UI/mL). Se desarrolló un protocolo que permitiera la obtención de los linfocitos lo más puros e intactos posibles, mediante un kit de purificación negativa que elimina a través de bolas magnéticas el resto de células mononucleares dejando intactos los linfocitos.

4.13.1. Purificación y activación de linfocitos

El protocolo completo para la purificación de linfocitos comprende los siguientes pasos:

- Dilución de la sangre (1:1) con PBS (w/o Ca, Mg) y centrifugación en gradiente con Histopaque-1077.
- La interfase superior correspondiente a las células mononucleares es separada y el resto se elimina.
- A partir de una alícuota de la suspensión de células se realiza el recuento utilizando azul tripam para visualizar la viabilidad celular. Esta suspensión se lava una vez con RPMI-1640.
- La purificación de los linfocitos CD3+ no activados se realiza mediante el kit Dynal® de aislamiento de células T de forma negativa, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante con algunas modificaciones técnicas que mostraron mejorar el protocolo de purificación. Estas modificaciones incluyen la utilización del propio plasma del sujeto para la preparación de las soluciones y el aumento del tiempo de incubación de las células con los anticuerpos.

Una vez que las células estaban aisladas y previa comprobación de la correcta purificación mediante citometría flujo, los linfocitos fueron cultivados a una densidad de 10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Estas placas de cultivo celular están tratadas para la adherencia de anticuerpos, por lo que previo a la incorporación de los linfocitos, se añade el anticuerpo CD3 (5 µg/ml)

que queda fijado al fondo de la placa. Mediante este anticuerpo y el CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) que va en suspensión en el medio de cultivo, se consigue la activación de los linfocitos.

Esta activación *in vitro* es necesaria para sensibilizar las células a la proliferación y a los estímulos apoptóticos, aunque también es necesario utilizar un medio de cultivo como el que hemos empleado el X-Vivo 15 que contiene todos los elementos necesarios para que la célula se pueda activar (entre ellos la IL-2).

4.13.2. Inducción de la apoptosis en linfocitos

Los linfocitos son cultivados durante 5 días, que es el tiempo que hemos visto necesario para su correcta activación y sensibilización a los estímulos apoptóticos, siendo el anticuerpo Fas agonista (1 $\mu\text{g/mL}$) el que seleccionamos para realizar los experimentos, tras comprobar en varias pruebas que era el que mejor inducía la apoptosis en los linfocitos de nuestro estudio.

El nivel de apoptosis de las células fue analizado mediante citometría de flujo utilizando el anti-CD4-PC5 para seleccionar la población de CD4+ y el kit de Anexina/IP para el marcaje de la fosfatidilserina (PS). El citómetro de flujo utilizado es el EPICS-XLMCL (Beckman-Coulter) y los datos son obtenidos con el software System II (Beckman-Coulter). Se han analizado un mínimo de 10.000 eventos de cada variante experimental.

Además, las alícuotas de células y el sobrenadante de cultivo celular se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análisis.

4.13.3. Inhibición farmacológica de la catalasa

Para confirmar la relación detectada entre la inhibición de la catalasa y la resistencia a la apoptosis en los linfocitos de pacientes con EC, usamos linfocitos purificados de sujetos control e inhibimos la actividad catalasa previamente a la incorporación del estímulo apoptótico al medio de cultivo.

Para la inhibición de la catalasa en los linfocitos de sujetos control, se utilizó el inhibidor 3-amino-1, 2, 4-triazole (AMT) a diferentes concentraciones (0, 1, 5 y

10 mM) y se añadió al medio de cultivo el mismo día de la siembra de los linfocitos. Para el cultivo, activación y la inducción de la apoptosis se siguió el mismo protocolo descrito previamente.

5. RESULTADOS

5.1) CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y VOLUNTARIOS SANOS

Grupo experimental de la primera parte del estudio:

Un total de 25 pacientes con EC al diagnóstico de la enfermedad (debut) y 25 sujetos sanos se incluyeron en la primera parte del estudio. Sus datos demográficos y de enfermedad se registran en la tabla 5.1. Las características de los pacientes con EC inactiva se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.1: Características demográficas y de enfermedad de controles sanos y EC al debut (pacientes activos, EC-A) y tras alcanzar la remisión (EC-R).

| | Control (n=25) | EC-A (n=25) | EC-R (n=19) |
|---|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Edad Media (DT) | 32,3 (12.5) | 34,42 (10.73) | 34,9 (8) |
| Sexo (hombre/mujer) | 11 / 9 | 11 / 14 | 10 / 9 |
| Índice Harvey Media (DT) | -- | 8,72 (2,22) | 1 (1,2) |
| PCR Media (DT) | 1,26 (1,01) | 77,6 (73) | 6,2 (6,6) |
| Fibrinógeno Media (DT) | 262 (71) | 503 (132) | 336,5 (56,8) |
| VSG Media (DT) | 12,2 (7) | 52,1 (27,8) | 24 (12) |
| F/NF/EF * | 13 / 7 / 0 | 13 / 10 / 2 | 10 / 8 / 1 |
| Localización Enfermedad (Clasificación Montreal) | | | |
| A | | | |
| A1: | - | 0 | 0 |
| A2: | - | 19 | 15 |
| A3: | - | 6 | 4 |
| L | | | |
| L1: | - | 9 | 6 |
| L2: | - | 8 | 7 |
| L3: | - | 7 | 5 |
| L4: | - | 1 | 1 |
| B | | | |
| B1: | - | 17 | 14 |
| B2: | - | 7 | 4 |
| B3: | - | 1 | 1 |
| p | | | |
| Si: | - | 10 | 6 |
| No: | - | 15 | 13 |
| Tiempo hasta alcanzar remisión (meses) Media (DT) | | | 8,7 (7) |

F/NF/EF*: Fumador/No fumador/Ex-fumador

Tabla 5.2. Características demográficas y de enfermedad de los pacientes con EC inactivos (EC-I).

| | EC-I (n=20) |
|---|--------------------|
| Edad Media (DT) | 32,5 (9,6) |
| Sexo (hombre/mujer) | 12 / 8 |
| Indice Harvey Media (DT) | 0,65 (1,2) |
| PCR Media (DT) | 3,3 (3) |
| Fibrinógeno Media (DT) | 317 (82) |
| VSG Media (DT) | 17,6 (18) |
| F/NF/EF * | 10 / 8 / 2 |
| Localización Enfermedad (Clasificación Montreal) | |
| A | |
| A1: | 3 |
| A2: | 12 |
| A3: | 5 |
| L | |
| L1: | 9 |
| L2: | 5 |
| L3: | 5 |
| L4: | 1 |
| B | |
| B1: | 12 |
| B2: | 3 |
| B3: | 5 |
| p | |
| Si: | 6 |
| No: | 14 |
| Tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad Media (DT) | 8,35 (2,7) |

F/NF/EF *: Fumador/No fumador/Ex-fumador.

Grupo experimental de la segunda parte del estudio:

Un total de 20 pacientes al debut de la enfermedad, 18 controles sanos y 10 pacientes inactivos fueron incluidos en la segunda parte del estudio. Sus datos demográficos y de enfermedad se registran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Características demográficas y de enfermedad del segundo grupo experimental de controles sanos, EC al debut (EC-A) y al alcanzar inactividad (EC-I).

| | Control (n=18) | EC-A (n=20) | EC-I (n=10) |
|---|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Edad Media (DT) | 27,83 (5,24) | 32,04 (9,14) | 32,1 (10,1) |
| Sexo (hombre/mujer) | 4 / 14 | 7 / 13 | 6/4 |
| Índice Harvey Media (DT) | -- | 7,31 (2,86) | <4 |
| PCR Media (DT) | 2,8 (2) | 70,31 (95,24) | 3 (3,97) |
| Fibrinógeno Media (DT) | 287 (69) | 531,42 (129,18) | 349 (81,4) |
| VSG Media (DT) | 11,8 (12) | 57,87 (31,6) | 10,25 (10,27) |
| F/NF/EF * | 0 / 14 / 2 | 11/ 8 / 1 | 2/7/1 |
| Localización Enfermedad (Clasificación Montreal) | | | |
| A | | | |
| A1: | - | | |
| A2: | - | 20 | 10 |
| A3: | - | | |
| L | | | |
| L1: | - | 13 | 6 |
| L2: | - | 3 | 4 |
| L3: | - | 4 | 0 |
| L4: | - | 0 | 0 |
| B | | | |
| B1: | - | 18 | 7 |
| B2: | - | 2 | 3 |
| B3: | - | 0 | 0 |
| p | | | |
| Si: | - | 4 | 0 |
| No: | - | 16 | 10 |
| Tiempo hasta alcanzar remisión (meses) Media (DT) | | | 14,87 (10,9) |

F/NF/EF *: Fumador/No fumador/Ex-fumador

5.2) PRODUCCIÓN DEL O_2^-

La concentración basal de O_2^- no fue significativamente diferente entre los sujetos control y los pacientes con EC tanto activos como en remisión, en cualquiera de los tres tipos de células analizadas (linfocitos, monocitos y granulocitos (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Producción basal de O_2^- en los tres tipos de células analizadas en controles y en pacientes con EC. Los resultados se expresan en media \pm DE y como HE Unidades de Fluorescencia.

| O_2^- basal | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos |
|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Control | 0.4995 \pm 0.097 | 1.027 \pm 0.1924 | 0.8095 \pm 0.1594 |
| EC-A | 0.5593 \pm 0.089 | 0.964 \pm 0.0988 | 1.009 \pm 0.1359 |
| EC-R | 0.5042 \pm 0.093 | 1.106 \pm 0.1520 | 0.9872 \pm 0.1472 |
| [*] p | 0.505 | 0.75 | 0.286 |
| [†] p | 0.487 | 0.841 | 0.247 |

* p: Control vs EC activo

[†]p: Control vs EC remisión

Cuando las células fueron estimuladas con plumbagina para producir O_2^- , los linfocitos de los pacientes control presentaron un aumento dosis-respuesta en la concentración de O_2^- , sin embargo los linfocitos de los pacientes con EC no aumentaron la producción de O_2^- (Figura 5.1).

La misma dificultad para estimular la producción de O_2^- se observó en los monocitos. Los granulocitos presentaron un aumento dosis-respuesta en la producción de O_2^- , sin embargo este incremento fue significativamente menor que el mostrado por los granulocitos de control (Tabla 5.5).

Figura 5.1. Producción estimulada de O_2^- con plumbagina en linfocitos de sujetos controles y con EC activa.

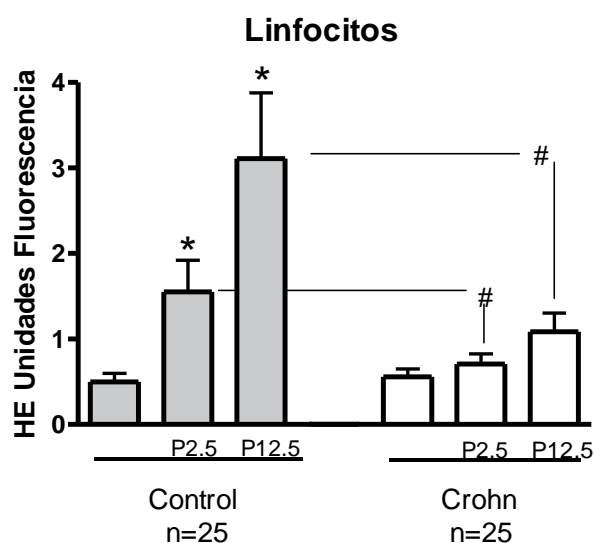


Tabla 5.5. Producción de O_2^- en monocitos y granulocitos en condiciones basales y tras estimulación con plumbagina ($2.5 \mu\text{M}$). Los resultados se expresan en media \pm DE y como HE Unidades de Fluorescencia.

| | Monocitos | | | Granulocitos | | |
|------------------|--------------------|-----------------------|-------|--------------------|-----------------------|---------|
| | $[O_2^-]$ | $[O_2^- + \text{Pb}]$ | p^* | $[O_2^-]$ | $[O_2^- + \text{Pb}]$ | p^* |
| Control | 1.027 ± 0.1924 | 7.15 ± 1.27 | 0.003 | 0.8095 ± 0.159 | 11.92 ± 2.2 | < 0.001 |
| EC activa | 0.964 ± 0.098 | 2.35 ± 0.47 | 0.052 | 1.009 ± 0.135 | 5.75 ± 1.02 | < 0.001 |
| p^\dagger | 0.75 | 0.037 | | 0.286 | 0.025 | |

* p: $[O_2^-]$ vs $[O_2^- + \text{Pb}]$

† p: Control vs EC

Cuando se añadió dietiltiocarbamato (DETC), un inhibidor de la SOD, a las células de los pacientes con EC activa, hubo un aumento significativo en la detección de O_2^- (tabla 5.6). Sin embargo, las células de los sujetos control no presentaron un aumento significativo en la producción de O_2^- en presencia de DETC.

Tabla 5.6. Producción de O_2^- en los tres tipos de células tras adición de DETC. Los resultados se expresan en media \pm DE y como HE Unidades de Fluorescencia.

| Producción O_2^- | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Con DETC | 1,271 \pm 0.102 | 2,325 \pm 0.094 | 3,745 \pm 0.128 |
| Sin DETC | 0,559 \pm 0,089 | 0.964 \pm 0.0988 | 1.009 \pm 0.1359 |
| <i>p</i> | 0.505 | 0.75 | 0.286 |

5.3) PRODUCCIÓN DEL H₂O₂

Los diferentes tipos celulares tanto en EC como en controles sanos, mostraron una producción basal de H₂O₂ diferente. Los linfocitos fueron las células que menor concentración basal de H₂O₂ presentaron, seguido de los monocitos y granulocitos por orden creciente (Tabla 5.7).

En los pacientes con EC activa, los tres tipos de células tienen una concentración basal de H₂O₂ mucho mayor que las células de los controles. Este aumento se mantuvo siempre independientemente de la localización y la gravedad de la enfermedad (según la clasificación de Montreal). Sin embargo, cuando los pacientes alcanzaron la remisión de la enfermedad, la concentración de H₂O₂ volvió a los niveles controles (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Producción basal de H₂O₂ en linfocitos, monocitos y granulocitos de sujetos control y pacientes con EC en actividad (EC-A) y remisión (EC-R). Los resultados se expresan en media \pm DE y como HE Unidades de Fluorescencia.

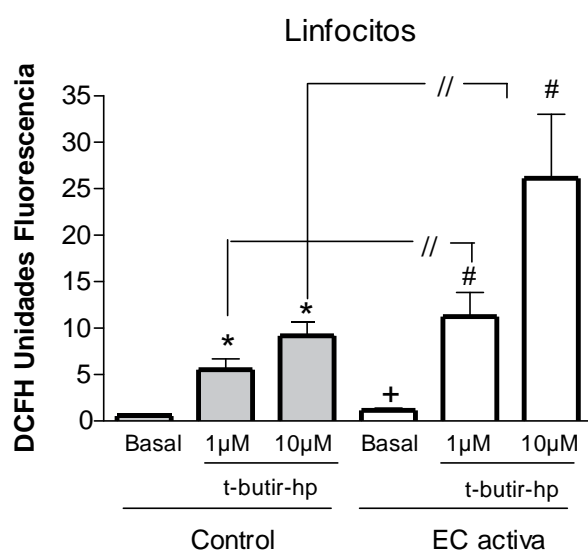
| H ₂ O ₂ | Controles | EC-A | p * | EC-R | p † |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| Linfocitos | 0.53 \pm 0.14 | 1.14 \pm 0.24 | 0.0298 | 0.87 \pm 0.39 | 0.92 |
| Monocitos | 1.47 \pm 0.2 | 3.03 \pm 0.35 | 0.0002 | 1.41 \pm 0.26 | 0.5587 |
| Granulocitos | 2.86 \pm 0.35 | 5.23 \pm 0.56 | 0.0018 | 2.51 \pm 0.79 | 0.1321 |

* p: control vs EC activa

† p: control vs EC en remisión

El efecto tras la estimulación con T-butir-hidroperóxido (TBH) tanto en controles como en EC activa se muestra en la figura 5.2. Los linfocitos de los pacientes con EC presentaron una mayor capacidad de formación de H₂O₂ que los linfocitos de los controles.

Figura 5.2. Producción estimulada de H₂O₂ por TBH (t-butir-hp) en linfocitos de sujetos control y con EC activa.



Sin embargo, el efecto tras la estimulación con TBH en monocitos y granulocitos no fue diferente entre las células de los controles y las células de EC activa (tabla 5.8). Aunque se observó una curva dosis-respuesta con la administración de TBH, sólo se muestran los datos obtenidos con 10 μM.

Tabla 5.8. Producción de H₂O₂ en monocitos y granulocitos en condiciones basales y tras estimulación con TBH (10 μM). Los resultados se expresan en media ± DE y como HE Unidades de Fluorescencia.

| | Monocitos | | | Granulocitos | | |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------|----------------------------------|---------------------------------------|---------|
| | [H ₂ O ₂] | [H ₂ O ₂ + TBH] | p* | [H ₂ O ₂] | [H ₂ O ₂ + TBH] | p* |
| Control | 1.47 ± 0.19 | 67.02 ± 8.73 | < 0.001 | 2.86 ± 0.35 | 140 ± 13.65 | < 0.001 |
| EC Activa | 3.02 ± 0.35 | 81.62 ± 10.19 | < 0.001 | 5.23 ± 0.65 | 189 ± 35.6 | < 0.001 |
| p [†] | 0.002 | 0.419 | | 0.0018 | 0.74 | |

* p: [H₂O₂] vs [H₂O₂ + t-but]

† p: Control vs EC activa

La concentración de H_2O_2 detectada en los linfocitos y monocitos se correlacionó positivamente con los niveles de PCR de los pacientes. Aplicando el test estadístico no paramétrico de Pearson 0,454** en los linfocitos y 0,455** en monocitos, $p < 0,01$.

5.4) PRODUCCIÓN DE NO

En los tres tipos celulares estudiados la producción de óxido nítrico no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes con EC activa (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Producción de NO en los tres tipos de células en pacientes con EC activa (EC-A) y controles. Los resultados se expresan en media \pm DE y como DAF-2 Unidades de Fluorescencia.

| | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos |
|------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Controles | 82.2 \pm 11.22 | 128 \pm 1.5 | 113.6 \pm 16.9 |
| EC-A | 71,4 \pm 8.59 | 108.2 \pm 17 | 87.08 \pm 12.3 |
| <i>p</i> | 0.334 | 0.12 | 0.2904 |

5.5) POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)

Las células de los pacientes con EC activa mostraron una inhibición del $\Delta\psi_m$ con respecto a las células de los controles. La tasa de inhibición fue del 34% en los linfocitos, 36,6% en los monocitos y 43% en los granulocitos (figura 3). Las mitocondrias seguían funcionando, a pesar de que estaban inhibidas, ya que mediante el desacoplador FCCP se mostraban aún más despolarizadas (Chovolou *et al.*, 2003).

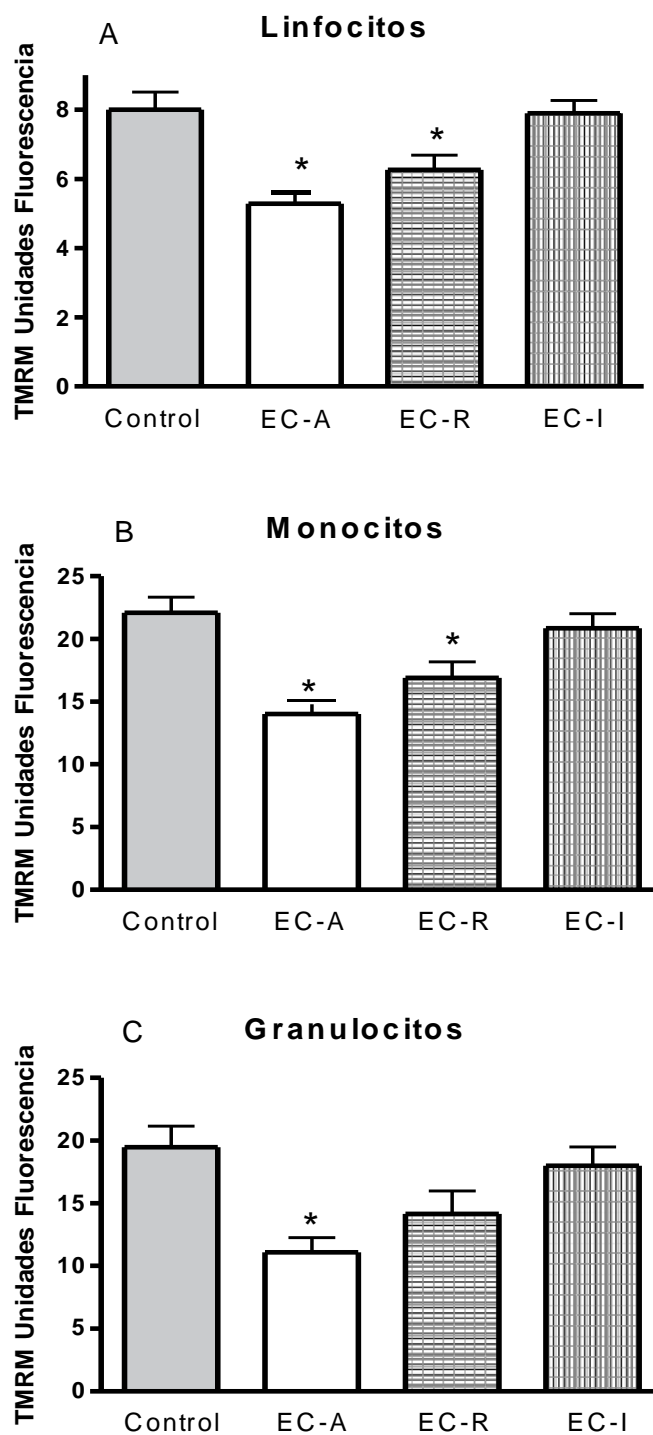
Cuando los pacientes con EC entraban en reciente remisión, sin curación mucosa, el $\Delta\psi_m$ permaneció significativamente inhibido, a pesar de una cierta tendencia a la recuperación. Por último, en los pacientes con EC inactiva, el $\Delta\psi_m$ parecía recuperarse por completo, volviendo a casi los valores normales (Figura 5.3).

El $\Delta\psi_m$ se encontró inhibido independientemente de la localización y severidad de la enfermedad. La inhibición del $\Delta\psi_m$ se correlacionó negativamente con los niveles en sangre de PCR y fibrinógeno (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Correlación de Pearson para el $\Delta\psi_m$ y PCR/fibrinógeno en los tres tipos celulares.

| $\Delta\psi_m$ | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos | p |
|----------------|------------|-----------|--------------|--------|
| PCR | -0.406** | -0.380** | -0.338** | p<0.01 |
| Fibrinógeno | -0.323* | -0.465* | -0,411* | p<0.05 |

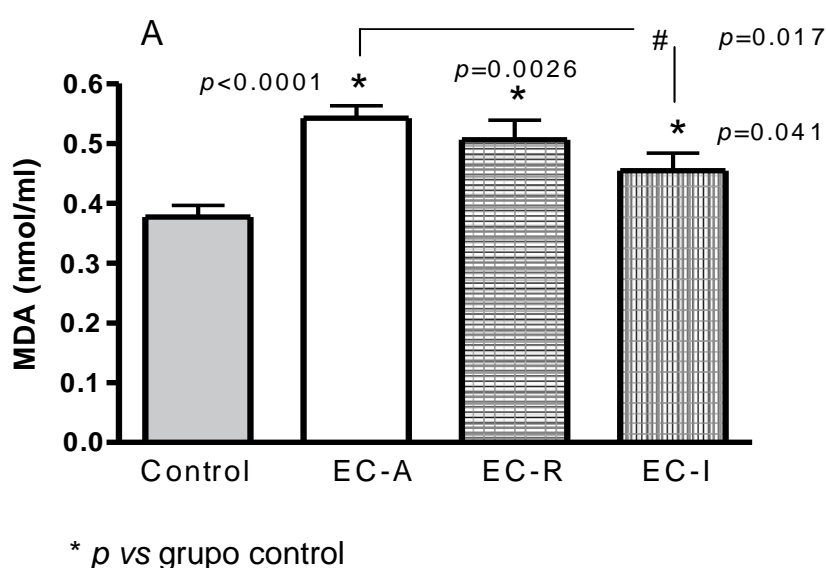
Figura 5.3. $\Delta\Psi_m$ en los tres tipos celulares y en diferentes estadios de la enfermedad (EC-A, EC-R, EC-I).



5.6) CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO (MDA)

Los pacientes con EC activa presentaron niveles de MDA significativamente superiores a los controles. Los pacientes en remisión también presentaron niveles de MDA en plasma elevados. Los pacientes inactivos presentaron un incremento de los niveles de MDA respecto a los controles, aunque este incremento fue significativamente menor que el observado en pacientes activos (Figura 5.4).

Figura 5.4. Daño oxidativo: Niveles de MDA en pacientes con EC en diferentes grupos de la enfermedad comparado con controles sanos.



No se observaron diferencias en las concentraciones de MDA entre los pacientes con EC activa fumadores y no fumadores (tabla 5.11).

Tabla 5.11. Comparación de los niveles de MDA entre los pacientes con EC activa fumadores y no fumadores.

| Niveles MDA | EC-A | EC-A |
|-------------|---------------|---------------|
| Media (DE) | Fumadores | No fumadores |
| nmol/ml | 0.548 (0.116) | 0.538 (0.122) |

5.7) CONCENTRACIÓN DE 8- HIDROXI-2'-DESOXIGUANOSINA (8-OXO-DG)

El daño oxidativo al ADN fue investigado midiendo la incorporación del 8-oxo-dG en la cadena de DNA. Los pacientes con EC activa presentaron niveles de 8-oxo-dG significativamente superiores a los sujetos sanos. Este incremento significativo se detectó también en los pacientes en remisión y los inactivos (Figura 5.5). El daño al ADN se mostró permanentemente presente en los pacientes con EC y fue independiente a la actividad de la enfermedad. Tampoco se observaron diferencias entre los pacientes con EC activa fumadores y no fumadores (Tabla 5.12).

Figura 5.5. Daño oxidativo: Niveles de 8-oxo-DG en pacientes con EC en diferentes estadios de la enfermedad comparado con controles sanos.

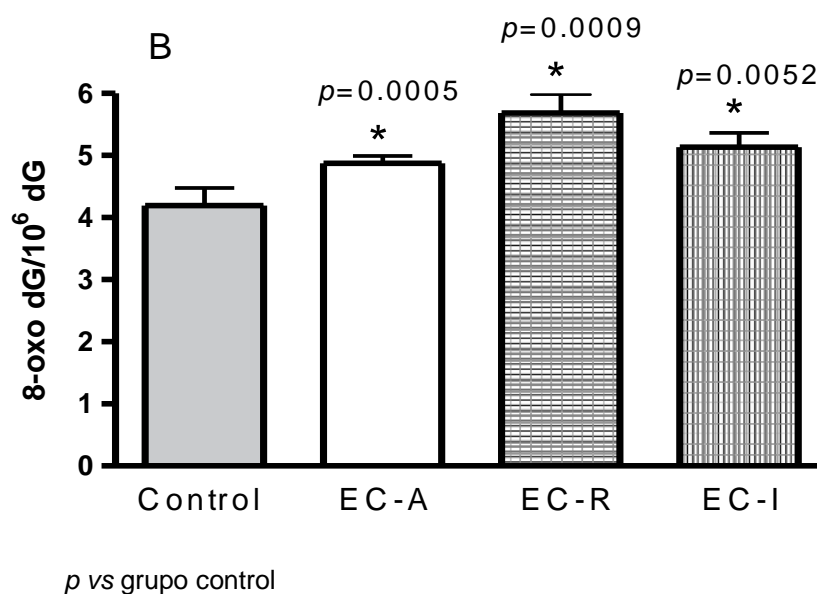


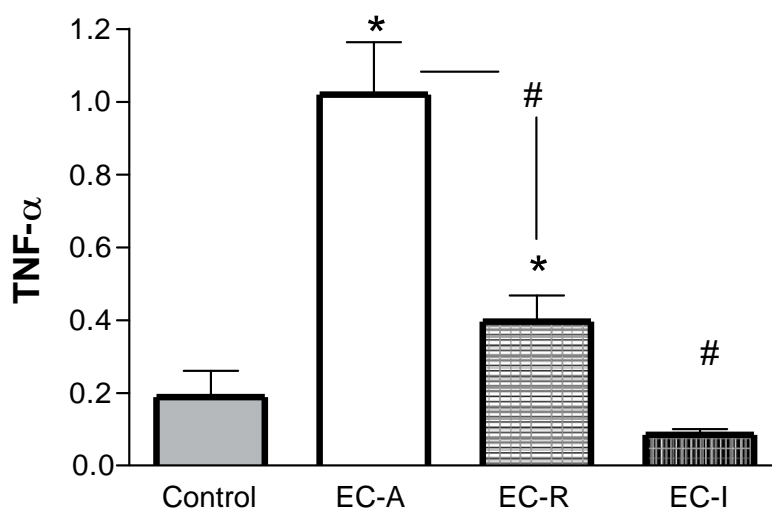
Tabla 5.12. Comparación de niveles de 8-oxo-dG entre los pacientes con EC activa fumadores y no fumadores.

| 8-oxo-dG | EC-A | EC-A |
|----------------------------|--------------|--------------|
| Media (DE) | Fumadores | No fumadores |
| 8-oxodG/10 ⁶ dG | 4,92 (0,729) | 4,83 (0,823) |

5.8) DETERMINACIÓN DEL TNF- α

La expresión de TNF- α fue mayor en los pacientes con EC activa que en los sujetos sanos (Figura 5.6). Cuando estos pacientes alcanzaron remisión de la enfermedad, la expresión de TNF- α fue significativamente menor que cuando la enfermedad estaba activa, pero significativamente superior a los controles sanos. La expresión de TNF- α en pacientes inactivos disminuyó hasta alcanzar los niveles de los controles sanos.

Figura 5.6. Producción de TNF- α en pacientes con EC en diferentes estadios de la enfermedad comparado con controles sanos.



* p < 0.05 vs Control; # p < 0.05 vs EC-A

Se detectó una correlación negativa entre la expresión de TNF- α y el $\Delta\psi_m$ (Correlación de Pearson: -0,525**, p<0.01). Sin embargo, se observó una correlación positiva con la actividad de SOD (Correlación de Pearson: 0.304*, p<0.05)

5.9) ANÁLISIS DEL ENZIMA SOD: ACTIVIDAD, CUANTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA

5.9.1 Actividad

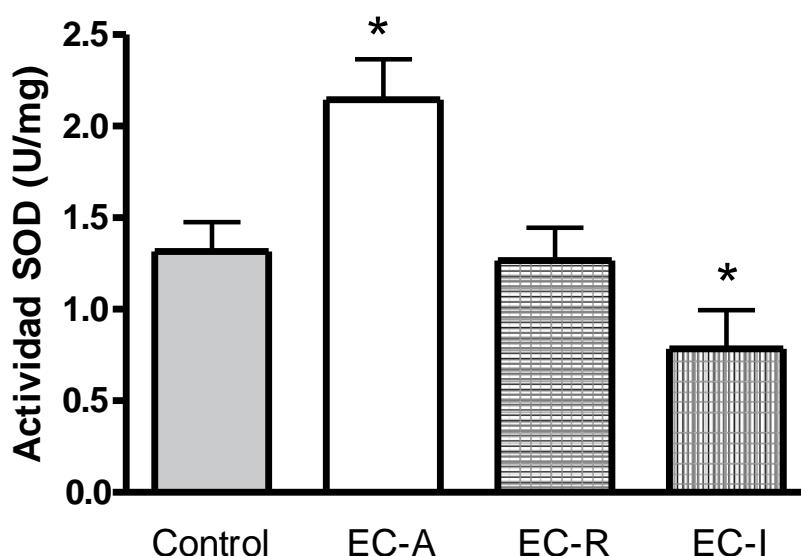
Los pacientes con EC activa presentaron una actividad SOD significativamente mayor que los sujetos sanos. Sin embargo, cuando los mismos pacientes alcanzaron remisión de la enfermedad, la actividad de la enzima volvió a los niveles de controles (Figura 5.7). Del mismo modo, los pacientes inactivos no presentaron diferencias significativas en la actividad SOD en comparación con los sujetos control y los pacientes la remisión de EC.

Puesto que conocemos que los sujetos fumadores tienen un estrés oxidativo persistente, los datos fueron analizados comparando la actividad de SOD en los pacientes con EC activa fumadores frente a los no fumadores y no se detectaron diferencias (Tabla 5.13).

Tabla 5.13. Comparación de la actividad SOD entre pacientes con EC activa fumadores y no fumadores.

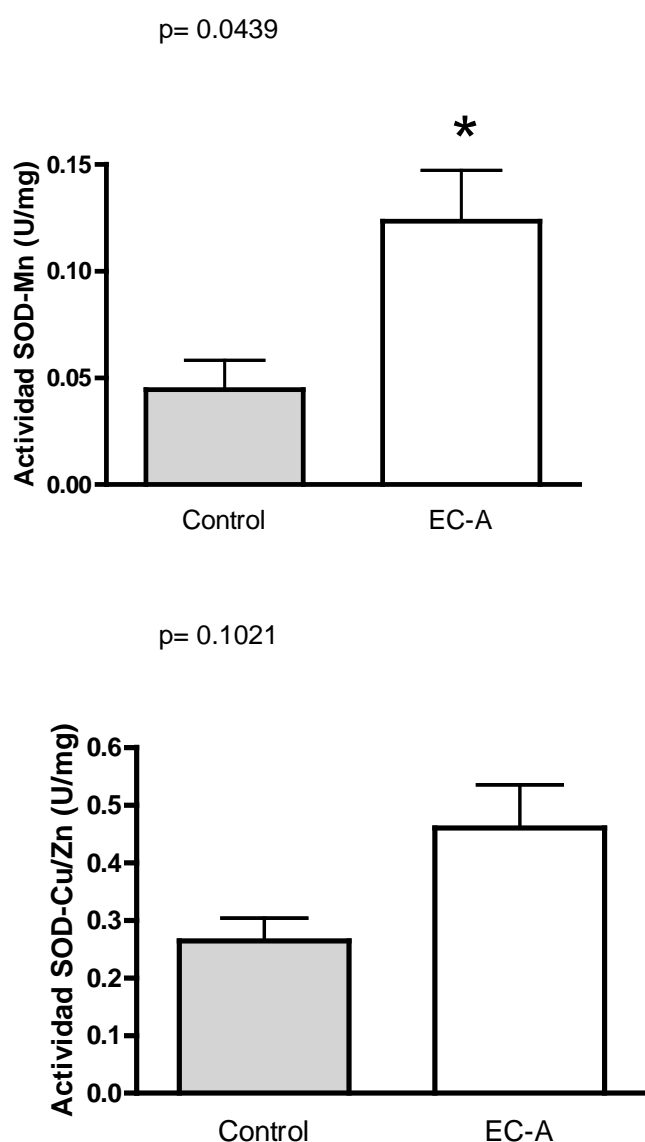
| Actividad SOD | EC-A | EC-A |
|---------------|-------------|--------------|
| Media (DE) | Fumadores | No fumadores |
| U/mg | 2,02 (1,01) | 2,22 (1,5) |

Figura 5.7. Actividad SOD global en pacientes con EC en diferentes estadios de la enfermedad comparado con controles sanos.



Posteriormente, con el fin de caracterizar si los dos tipos de enzimas de interés en nuestro estudio (SOD-Mn mitocondrial o SOD-Cu/Zn citosólica) o sólo una de ellas, estaban aumentadas en los pacientes con EC activos, analizamos por separado la actividad de las diferentes isoenzimas con los pacientes de la segunda cohorte. Observamos que, aunque la actividad de las enzimas SOD-Cu/Zn y SOD-Mn estaban aumentadas en los pacientes con EC activa respecto de los sujetos sanos, sólo en el caso de la SOD-Mn estaba incrementada de forma significativa (SOD-Mn $p= 0.0439$ vs SOD-Cu/Zn $p= 0.1021$) (Figura 5.8).

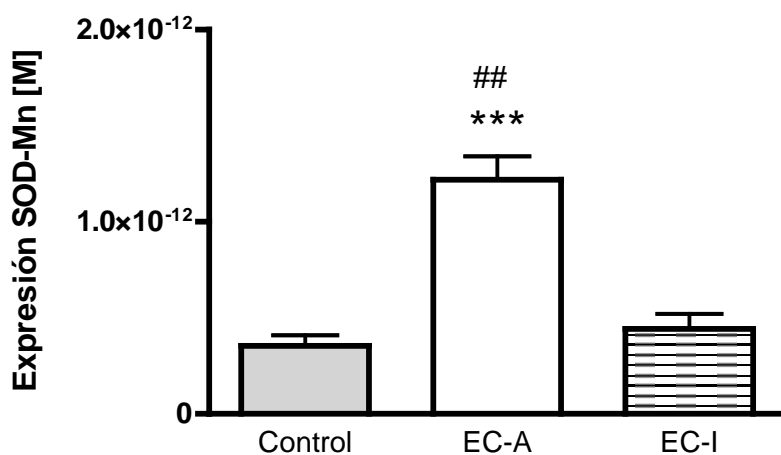
Figura 5.8. Actividad SOD-Mn y SOD-Cu/Zn en sujetos sanos y pacientes con EC activa (EC-A) del segundo grupo experimental.



5.9.2 Expresión Génica

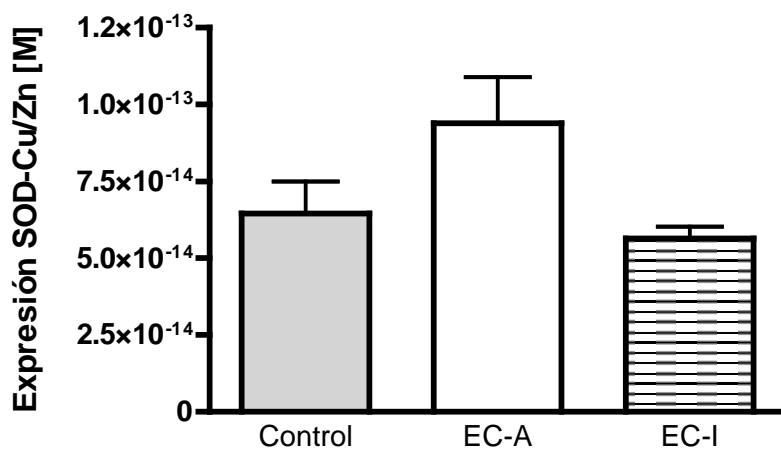
De igual forma que en la actividad SOD, la expresión génica de ambas enzimas, SOD-Mn y SOD- Cu/Zn, estaba aumentada en los pacientes con EC activa respecto de los sujetos sanos, pero sólo en el caso de la SOD-Mn el incremento fue significativo ($p < 0.0001$). En los pacientes con EC inactiva la expresión de ambas enzimas SOD se recupera hasta los valores control (Figura 5.9).

Figura 5.9. Expresión génica de SOD-Mn y SOD-Cu/Zn en sujetos sanos (control), pacientes con EC activa e inactiva (EC-A y EC-I).



* EC-A vs Control

EC-A vs EC-I



5.9.3 Cuantificación

La concentración de ambas enzimas, SOD-Mn y SOD-Cu/Zn, está incrementada en los pacientes con EC activa respecto de los sujetos sanos (Figuras 5.10 y 5.11). Se ha utilizado como control de carga el gel de poliacrilamida escaneado.

Figura 5.10. Niveles de proteína SOD-Mn en controles sanos y pacientes con EC activa al debut de la enfermedad (EC) (gel como control de carga).

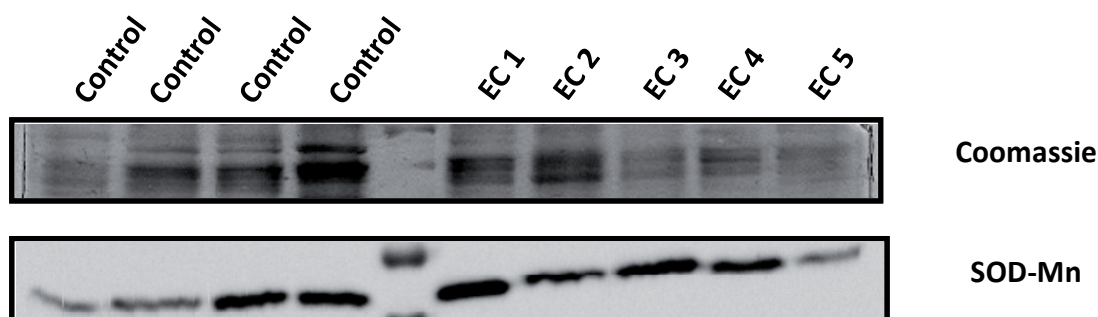
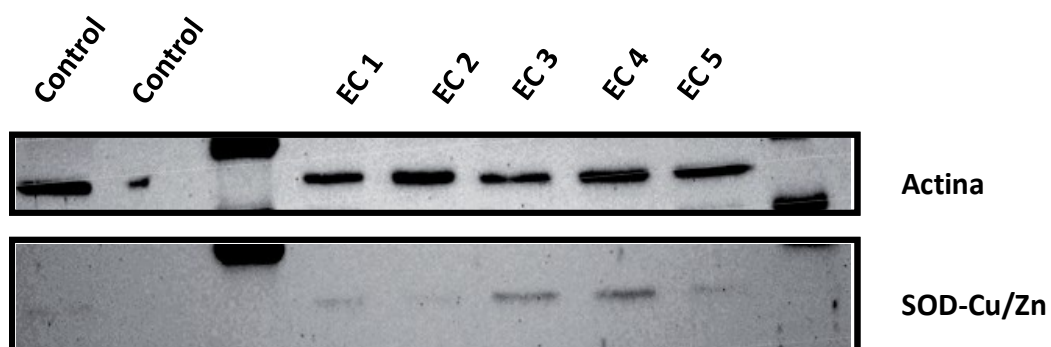


Figura 5.11. Niveles de proteína SOD-Cu/Zn en controles sanos y pacientes con EC activa al debut de la enfermedad (EC) (actina como control de carga).



5.9.4 SNPs de SOD

Ninguno de los SNPs de SOD-Mn seleccionados en este estudio mostró una correlación estadística con la EC (Tabla 5.14).

Tabla 5.14. SNPs de SOD-Mn.

| SNPs | ANOVA P |
|-------------|----------------|
| rs2758346 | 0,4575 |
| rs5746136 | 0,4934 |
| rs4880 | 0,5843 |
| rs5746096 | 0,7483 |
| rs2758339 | 0,7603 |

Controles (n=49); EC (n=77)

5.10) ANÁLISIS DEL ENZIMA CAT: ACTIVIDAD, CUANTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA

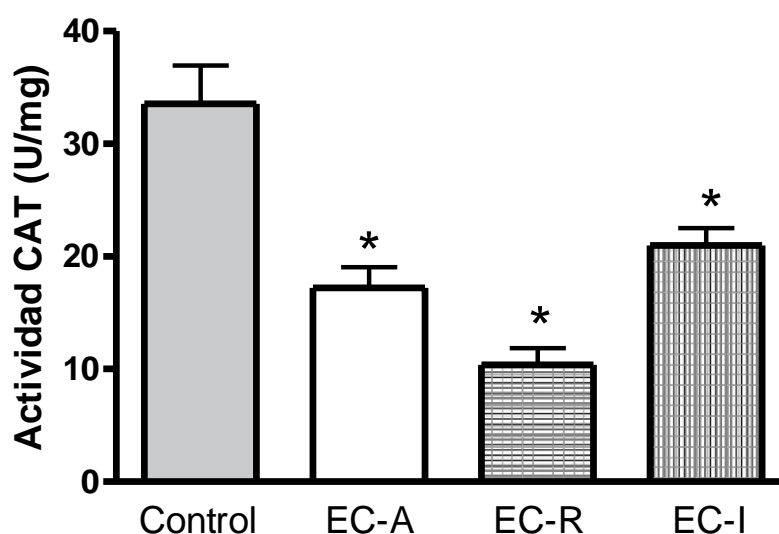
5.10.1 Actividad

Los pacientes con EC activa mostraron una disminución significativa en la actividad de la catalasa respecto de los controles sanos. La inhibición se mantuvo en los mismos pacientes cuando lograron la remisión. De igual forma, los pacientes inactivos también fueron analizados y la enzima permaneció significativamente inhibida (Figura 5.12). No se encontraron diferencias en la actividad de la CAT entre los pacientes con EC activa fumadores y los no fumadores (Tabla 5.15).

Tabla 5.15. Comparación de actividad CAT entre los pacientes con EC activa fumadores y no fumadores

| Actividad CAT | EC-A | EC-A |
|---------------|-------------|--------------|
| Media (DE) | Fumadores | No fumadores |
| U/mg | 15,9 (7,26) | 16,6 (7,7) |

Figura 5.12. Actividad CAT en pacientes con EC en diferentes estadios de la enfermedad comparado con controles sanos.

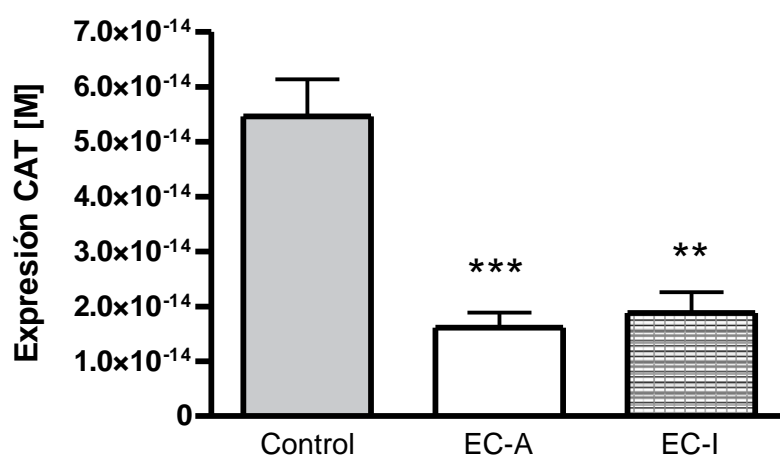


* $p < 0.05$ Control vs EC-A / EC-R / EC-I

5.10.2 Expresión Génica

De igual forma, los pacientes con EC activa mostraron una disminución significativa ($p < 0.0001$) en la expresión génica de la catalasa (niveles de ARN m) respecto de los controles sanos (Figura 5.13). Los pacientes con EC inactiva mantuvieron una disminución significativa de la expresión de CAT respecto de los controles ($p = 0.0017$).

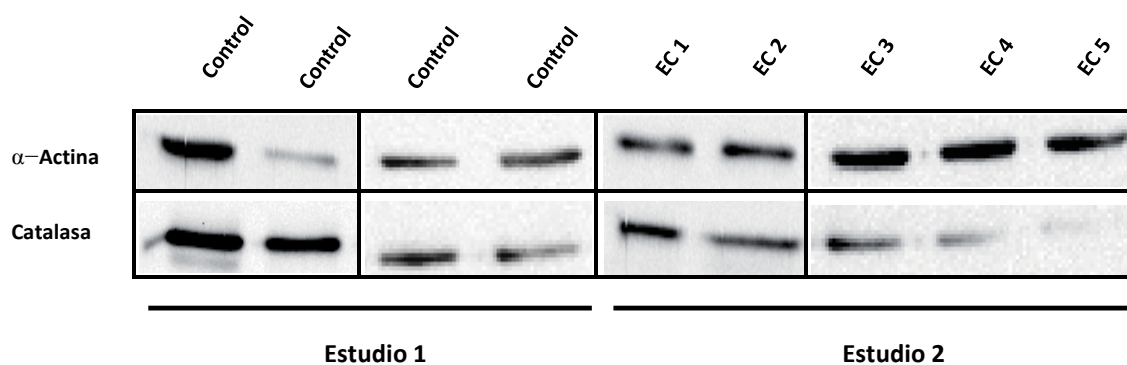
Figura 5.13. Expresión génica de la enzima CAT en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



5.10.3 Cuantificación

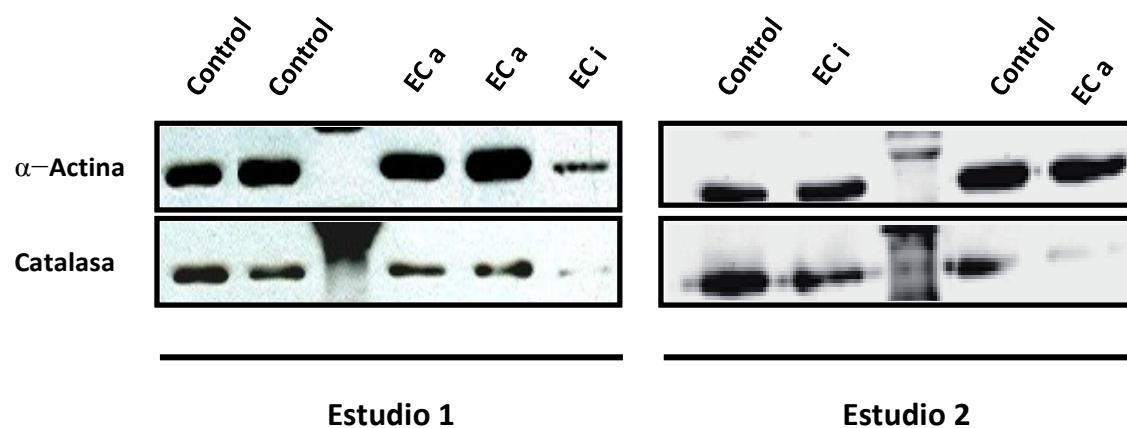
Los pacientes con EC activa mostraron una disminución significativa de los niveles de proteína CAT respecto de los controles sanos (Figura 5.14).

Figura 5.14. Niveles de proteína CAT en controles sanos y pacientes con EC activa al debut de la enfermedad (EC).



También los pacientes con EC inactiva mostraron una disminución de los niveles de proteína CAT respecto de los controles sanos (figura 5.15).

Figura 5.15. Niveles de proteína CAT en controles sanos y pacientes con EC activa (ECa) e inactiva (ECi).



5.10.4 SNPs de CAT

El SNP rs1001179 (-262 C>T) para CAT presenta una correlación estadística con el desarrollo de EC ($p= 0.036$). El genotipo homocigoto -262 CC fue el que se asoció de forma preferente con la EC.

Además el SNP rs475043 de CAT también se correlaciona con la EC aunque no significativamente ($p= 0.054$).

Tabla 5.16. SNPs de CAT

| SNPs | ANOVA P |
|------------------|----------------|
| rs1001179 | 0,0364 |
| rs475043 | 0,0546 |
| rs494024 | 0,1711 |
| rs704724 | 0,1582 |
| rs2300182 | 0,2124 |
| rs564250 | 0,2798 |
| rs17886155 | 0,3197 |
| rs12273124 | 0,4137 |
| rs1049982 | 0,5273 |
| rs525938 | 0,5329 |
| rs7943316 | 0,6065 |
| rs3758730 | 0,6110 |
| rs769217 | 0,7664 |
| rs2284365 | 0,8865 |

Controles (n=49); EC (n=77)

Tabla 5.17. Distribución por genotipos rs1001179 (-262 C>T) en 77 pacientes con EC y en 49 controles sanos.

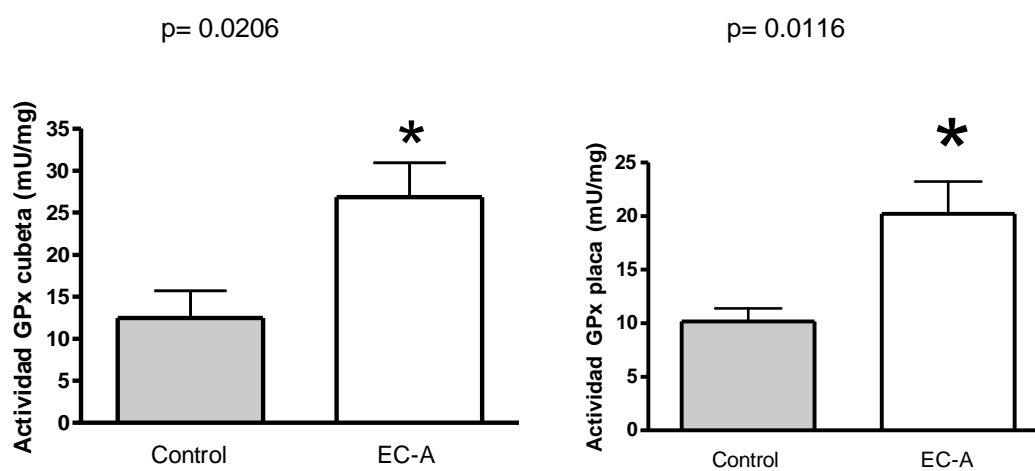
| Genotipo | Controles N absoluto (%) | EC N absoluto (%) |
|-----------------|---|------------------------------|
| TT | 3 (6,1%) | 5 (6,5%) |
| CT | 29 (59,2%) | 28 (36,4%) |
| CC | 17 (34,7%) | 44 57,1%) |

5.11) ANÁLISIS DEL ENZIMA GPX: ACTIVIDAD Y CUANTIFICACIÓN

5.11.1 Actividad

Los pacientes con EC activa mostraron un aumento significativo de la actividad de la enzima GPx respecto de los controles sanos (Figura 5.16).

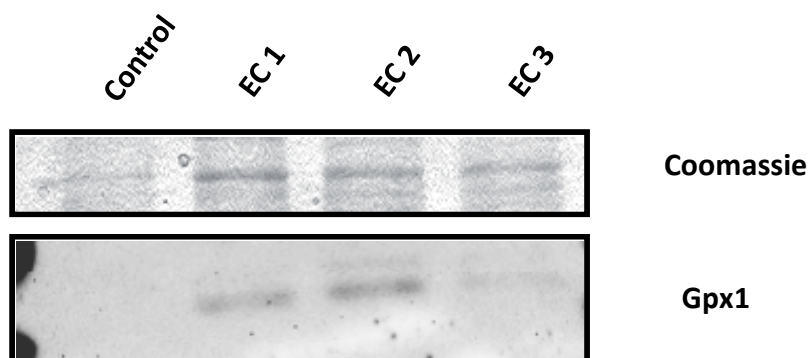
Figura 5.16. Actividad GPX en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A), determinada en placa (derecha) y en cubeta (izquierda)



5.11.2 Cuantificación

Los pacientes con EC activa mostraron un aumento de la concentración de la enzima GPx respecto de los controles sanos (Figura 5.17).

Figura 5.17. Niveles de GPX en controles sanos y pacientes con EC activa (EC)



5.12) EXPRESIÓN GÉNICA DE OTRAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO, APOPTOSIS, MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y TELOMERASA

Se analizó la expresión génica (niveles de ARNm) de un total de 20 pacientes con EC activa, 10 con EC inactiva y 18 controles sanos.

5.12.1 Genes relacionados con el estrés oxidativo: NOS2A, PKCgamma, PKCzeta

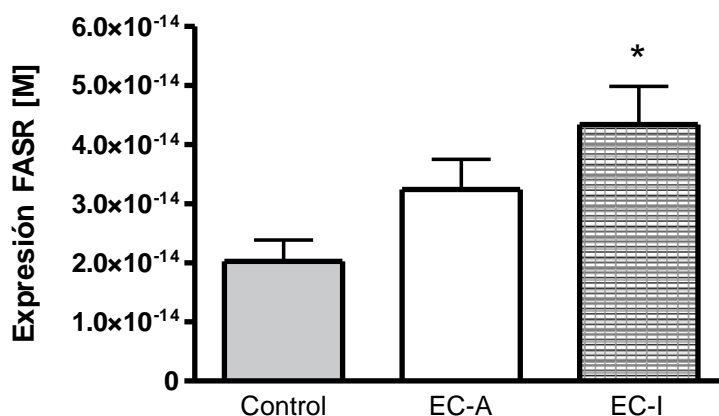
Los niveles detectados de ARN m de estos 3 genes fueron demasiado bajos en las muestras analizadas y quedaron fuera de la zona de detección fiable del sistema de medida.

5.12.2 Genes relacionados con la apoptosis: FASR, FASLG, STAT1, NFKB1, ASK

- FAS-Receptor (FASR):

Los pacientes con EC activa mostraron un aumento en la expresión génica del FASR (niveles de ARN m) respecto de los controles sanos, aunque no de forma significativa ($p=0.0722$) (Figura 5.18). Sin embargo, los niveles de FASR en los pacientes con EC inactiva se encontraron aumentados significativamente respecto a los controles sanos ($p=0.0017$) (Figura 5.18).

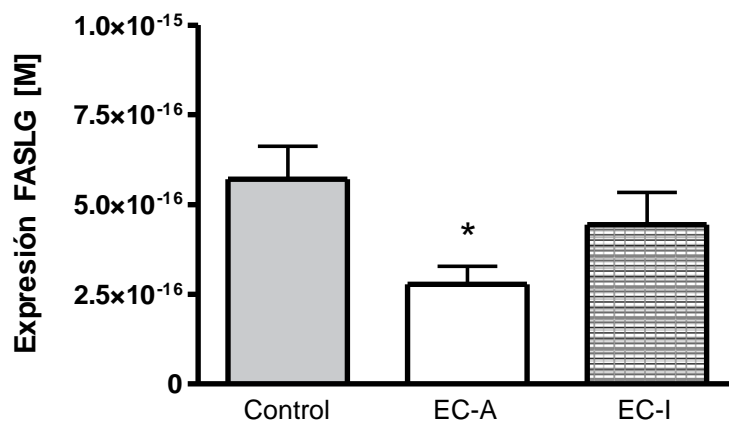
Figura 5.18. Niveles de expresión de FASR en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I)



- FAS-Ligando (FASLG):

Los pacientes con EC activa mostraron una disminución significativa ($p=0.0113$) en la expresión génica del FASLG (niveles de ARNm) respecto de los controles sanos (Figura 5.19). Los pacientes inactivos recuperaron los niveles de FASLG hasta casi alcanzar a los controles.

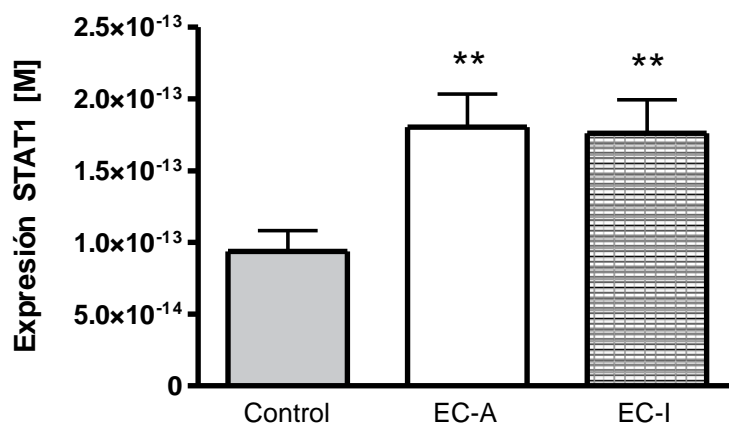
Figura 5.19. Niveles de expresión de FASLG en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



- STAT1

Los pacientes con EC activa mostraron un aumento significativo ($p=0.005$) en la expresión génica de STAT1 respecto de los controles sanos. Los pacientes con EC inactiva mantuvieron niveles aumentados de forma significativa de STAT1 ($p=0.0044$; Control vs ECi) (Figura 5.20).

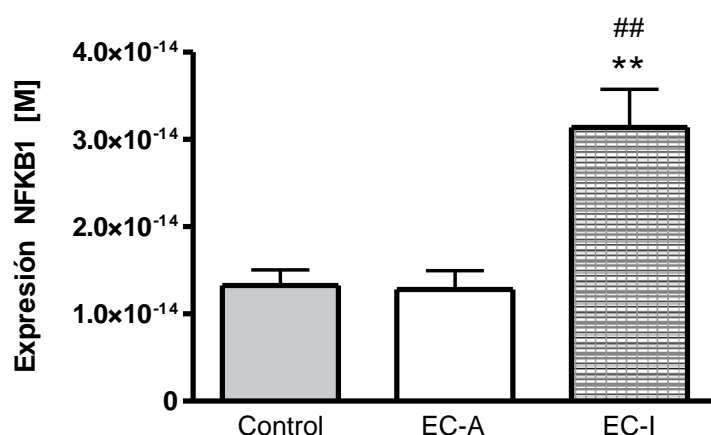
Figura 5.20. Niveles de expresión de STAT1 en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I)



- NFKB1

Los pacientes con EC activa y controles no mostraron diferencias en los niveles de NF- κ B1. Sin embargo, en los pacientes con EC inactiva los niveles de NF- κ B1 fueron significativamente superiores a los niveles de los controles ($p=0.0012$) (Figura 5.21).

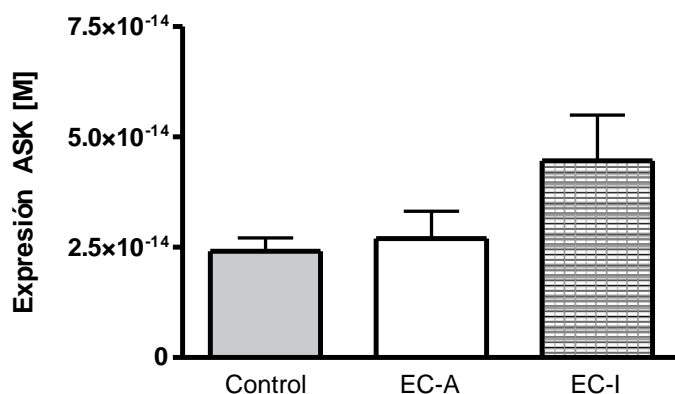
Figura 5.21. Niveles de expresión de NF- κ B1 en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



- ASK

Los pacientes con EC activa y controles no mostraron diferencias en los niveles de ASK ($p=0.59$). Sin embargo, en los pacientes con EC inactiva los niveles de ASK fueron superiores a los niveles de los controles pero sin alcanzar la significatividad ($p=1083$) (Figura 5.22).

Figura 5.22. Niveles de expresión de ASK en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I)



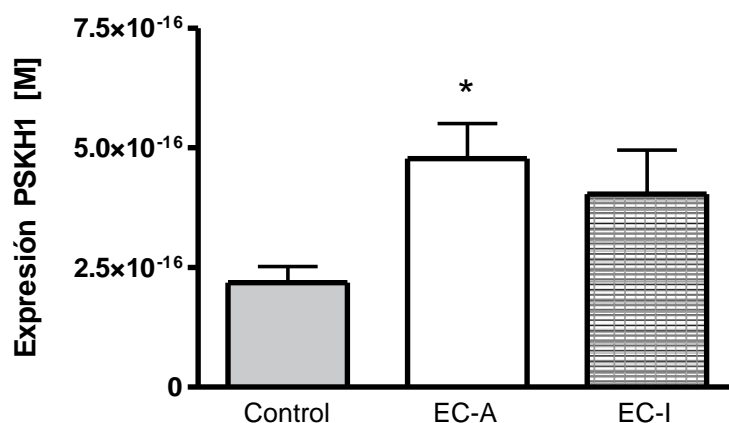
5.12.3 Genes de moléculas de señalización intracelular: PSKH1, PPID, ABCB1, IL-2, IL23R

Los niveles detectados de ARNm de los genes de IL-2, IL23R fueron demasiado bajos en las muestras analizadas y quedaron fuera de la zona de detección fiable del sistema de medida.

- PSKH1

Los niveles de PSKH1 (Serina/treonina proteína kinasa H1) fueron significativamente superiores en los pacientes con EC activa respecto de los controles ($p=0.0106$). En los pacientes inactivos se mantuvieron los niveles elevados respecto a los controles ($p=0.15$) (Figura 5.23).

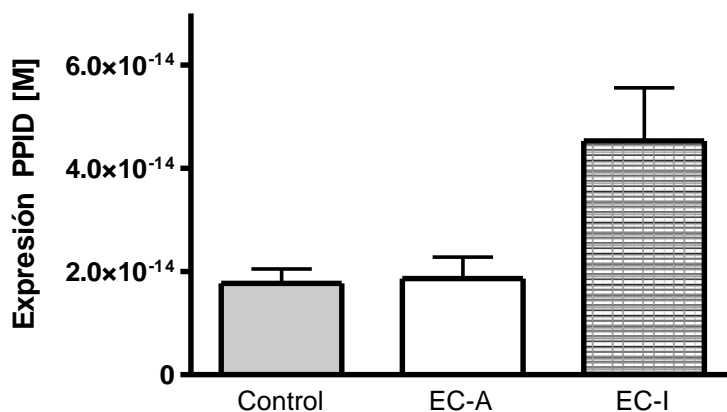
Figura 5.23. Niveles de expresión de PSKH1 en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



- PPID

Los niveles de PPID (Peptidylprolyl isomerasa D (ciclofilina D)) en los pacientes con EC activa y controles no mostraron diferencias. Sin embargo, en los pacientes con EC inactiva los niveles de PPID fueron mayores a los controles ($p=0.10$) (Figura 5.24).

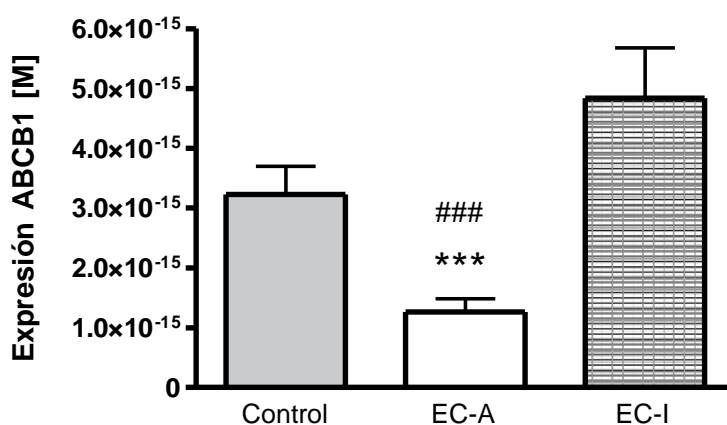
Figura 5.24. Niveles de expresión de PPID en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



- ABCB1

Los pacientes con EC activa presentaron niveles de ABCB1 significativamente inferiores a los controles sanos ($p=0.002$). Los pacientes inactivos aumentaron los niveles de ABCB1 hasta alcanzar a controles sanos (Figura 5.25).

Figura 5.25. Niveles de expresión de ABCB1 en controles sanos y pacientes con EC activa (EC-A) e inactiva (EC-I).



5.12.4 Genes de telomerasa: TERT

Los niveles detectados de ARNm de este gen fueron demasiado bajos en las muestras analizadas y quedaron fuera de la zona de detección fiable del sistema de medida. Por tanto, no se detectaron niveles de ARNm para este gen.

5.13) IMPACTO DE LA MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA CATALASA SOBRE LA APOPTOSIS

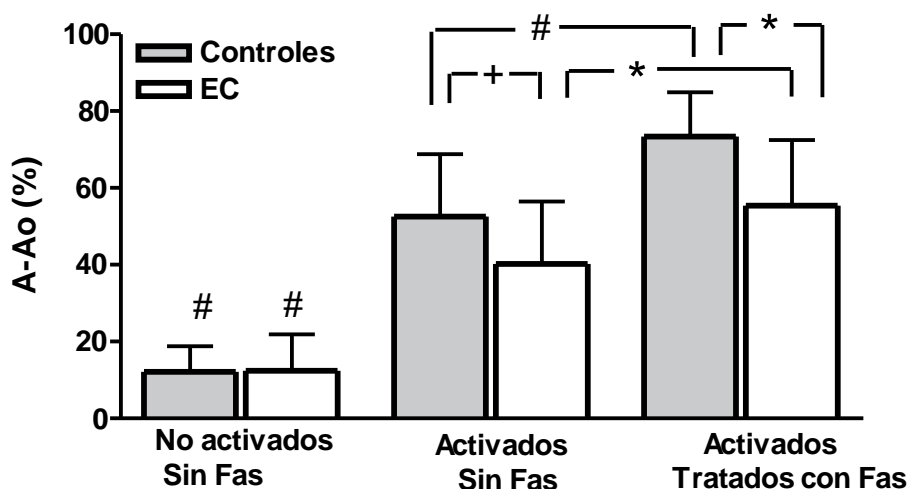
Sólo la activación de los linfocitos (a través de los anticuerpos CD3/CD28) produjo un incremento significativo de la apoptosis tanto en los sujetos control ($12,4 \pm 9,5$ vs $40,2 \pm 16,3$) como en los pacientes con EC ($12,1 \pm 6,7$ vs $52,6 \pm 16,2$). Sin embargo, este incremento fue significativamente mayor en los controles que en los pacientes con EC ($p < 0,05$) (Figura 5.26).

En presencia del anticuerpo Fas (AcFas) la apoptosis aumentó en ambos grupos ($55,4 \pm 17,1$ en EC vs $73,4 \pm 11,4$ en controles), siendo el incremento significativamente mayor en los controles que en los pacientes con EC ($p < 0,005$) (Figura 5.26).

Aunque la mayoría de los pacientes pertenecían a los grupos L1 y L3 de la clasificación de Montreal, no se observaron diferencias en su comportamiento frente a la apoptosis.

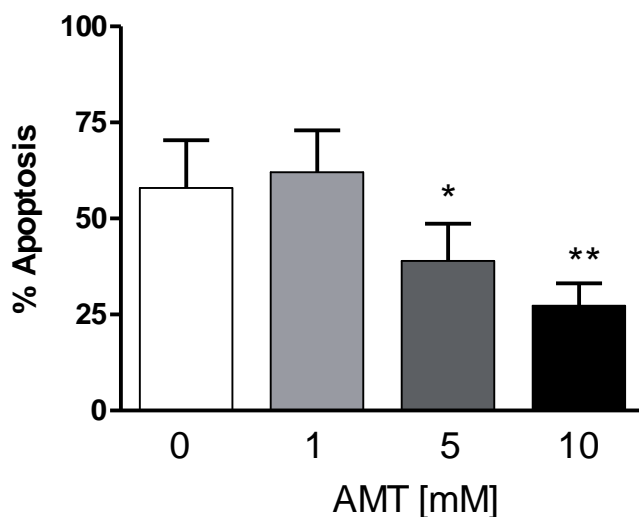
Después de 6 días de cultivo, los linfocitos no activados y no tratados con AcFas siguieron vivos y no mostraron incremento en la apoptosis respecto al valor basal del día 0. El tratamiento con AcFas en linfocitos no activados no indujo ningún cambio en la apoptosis.

Figura 5.26. Medida de la apoptosis en linfocitos de pacientes con EC y sujetos sanos controles.



Al inhibir la actividad catalasa en células control éstas mostraron una menor capacidad para iniciar el proceso de apoptosis, comparándolo con los resultados obtenidos en las mismas células con la actividad CAT no inhibida. Este efecto fue dosis-dependiente de la concentración de inhibidor empleada (AMT) (figura 5.27).

Figura 5.27. Modificación de la capacidad apoptótica al inhibir la actividad CAT.



6. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos demostrado que en la EC activa se produce un aumento significativo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los diferentes tipos de células inmunes de sangre periférica, que retorna a los niveles de control cuando la enfermedad está inactiva. En el caso de los linfocitos y monocitos, este aumento de H_2O_2 se correlaciona significativamente con algunos marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno, lo que indica que la inflamación es más acusada a medida que aumenta de concentración de H_2O_2 en estas células. Cuando las células son estimuladas para generar H_2O_2 se produce un aumento significativo de su concentración, el cual es más intenso en las células inmunes, especialmente los linfocitos, de los pacientes con EC activa que en los controles. Así pues, parece que los linfocitos de los pacientes con EC activa están selectivamente predisuestos para la producción de H_2O_2 . Nuestros resultados apoyan los hallazgos previamente descritos en la literatura de que en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedades relacionadas con la inmunidad presentan una predisposición para generar estrés oxidativo (Bashir *et al.*, 1993). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) no siempre son responsables del daño oxidativo y actualmente se intenta clarificar su función en la regulación de procesos celulares (Adler *et al.*, 1999; Herrlich *et al.*, 2000).

Otras ERO que han sido analizadas en este estudio, como el superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO), no parecen estar elevadas cuando la enfermedad está activa, ya que sus concentraciones no difieren entre los controles y los pacientes activos. De hecho, hemos detectado una aparente incapacidad de las células de los pacientes con EC activa para producir O_2^- después de la estimulación externa con plumbagina, un generador de este radical que actúa en la mitocondria (Hassan *et al.*, 1979; Wang *et al.*, 2008). Este hecho estaría en concordancia, tanto con los estudios clásicos como con publicaciones más recientes, las cuales han sugerido que las células inmunes periféricas, en concreto los granulocitos (Biagioni *et al.*, 2006; Curnutte *et al.*, 1974) y linfocitos (Kitahora *et al.*, 1988), de los pacientes con EC presentan una producción defectuosa de O_2^- . Sin embargo, estos trabajos no han analizado el estado de las enzimas antioxidantes. Nosotros, hemos detectado un aumento significativo en la actividad de la enzima SOD, una defensa primaria frente a las ERO que

actúa en las células cuando existe una excesiva producción de O_2^- . Esta actividad se recupera a niveles controles cuando el paciente está inactivo. Los experimentos realizados con EDTC, un inhibidor de la actividad de la SOD, han demostrado que cuando la actividad de SOD se inhibe, la generación de ERO en las células de los sujetos con EC activa aumenta considerablemente, lo que confirma que las células sí mantienen su capacidad de generación de O_2^- . Así, la actividad SOD de las células parece ser muy potente, consiguiendo que el O_2^- se metabolice de forma inmediata de modo que se detecten concentraciones similares a controles. Al metabolizarse producirá H_2O_2 ($O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$), radical que, como hemos dicho previamente, sí se encuentra en concentraciones elevadas en las células de pacientes con EC. Queda por clarificar si el origen del H_2O_2 procede sólo de la producción de O_2^- y posterior dismutación por la SOD o bien si existe una producción adicional directa de H_2O_2 por otros sistemas celulares (Chance *et al.*, 1979).

Nuestros resultados demuestran un aumento significativo tanto de la actividad SOD-Mn como de su expresión génica (niveles de ARNm) y por tanto de su concentración proteica. La isoforma SOD-Cu/Zn presenta una tendencia al alza que no llega a alcanzar significatividad estadística. Este dato tiende a ser congruente con estudios previos que reportan niveles bajos tanto de la actividad como de la proteína SOD-Cu/Zn en los granulocitos de sangre periférica (Verspaget *et al.*, 1988) y en la mucosa de pacientes con EII activa (Lih-Brody *et al.*, 1996; Mulder *et al.*, 1991). Trabajos más recientes (Barbosa *et al.*, 2003; Kruidenier *et al.*, 2003b) han demostrado un marcado aumento selectivo en los niveles de la SOD-Mn mitocondrial en la mucosa de los pacientes con EC. Nuestro resultado confirma dicho hallazgo y demuestra que la reacción inflamatoria en la EC se proyecta más allá de la mucosa generando una reacción sistémica.

Diferentes estudios han demostrado que las mitocondrias, importantes generadores de O_2^- , están implicadas en la regulación de procesos celulares tales como la apoptosis. Alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial, que pueden ser detectadas a través de modificaciones del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), inducen a la generación inmediata de O_2^-

(Kakkar *et al.*, 2007). El hecho de que la SOD-Mn mitocondrial esté sobreexpresada en pacientes con EII sugiere que existe una generación mitocondrial de ERO (Barbosa *et al.*, 2003; Kruidenier *et al.*, 2003b). No obstante, el $\Delta\psi_m$ no había sido nunca caracterizado en los pacientes con EII. En este trabajo se ha demostrado que, en las células inmunes periféricas de estos pacientes, el $\Delta\psi_m$ está inhibido significativamente (un 40%), lo cual podría ser un posible mecanismo iniciador de la formación de las ERO que participan en el estrés oxidativo existente en la EII (Kruidenier *et al.*, 2003a; Lih-Brody *et al.*, 1996). No se puede descartar, sin embargo, que la inhibición del $\Delta\psi_m$ sea un efecto directo del H_2O_2 sobre la mitocondria. Esta inhibición se correlaciona negativamente con marcadores séricos de inflamación, como la PCR y el fibrinógeno, sin embargo, su retorno a los valores de control es más lento que la recuperación clínica y analítica de los pacientes. Así, aunque los pacientes pueden mostrar una mejoría significativa de los síntomas del brote, con una tendencia hacia la recuperación, el $\Delta\psi_m$ sigue estando inhibido significativamente. Solamente los pacientes inactivos, es decir, que estaban en remisión clínica persistente (Harvey <4 por más de 6 meses) y que no tenían lesiones morfológicas confirmadas por endoscopia, presentaban una recuperación completa del $\Delta\psi_m$ a los valores de control. Esto indica que el $\Delta\psi_m$ varía con la actividad de la enfermedad, a pesar de un retraso en su recuperación con respecto a la mejoría clínica y analítica detectada.

En este trabajo hemos demostrado que los leucocitos de los pacientes con EC activa presentan un incremento significativo del TNF- α , el cual se correlaciona positivamente con los niveles de PCR y negativamente con el $\Delta\psi_m$. Además, se relaciona de forma positiva con el mencionado aumento de la actividad de la SOD. De manera similar a lo que hemos descrito para el $\Delta\psi_m$, la concentración de TNF- α también vuelve a los valores control en los pacientes inactivos. Por otra parte, a pesar de que los pacientes diagnosticados recientemente presenten una mejoría clínica y analítica de la actividad de la enfermedad, la concentración de TNF- α sigue siendo significativamente alta, en paralelo a lo descrito para el $\Delta\psi_m$. Así pues, parece que la mejoría de los síntomas en la EC no depende de la recuperación de parámetros como el aumento en los niveles

de citoquinas, la alteración de la función mitocondrial y la generación de ERO, pero éstos sí que regresan a la normalidad cuando la remisión es persistente, coincidiendo con la curación mucosa. No obstante, se precisa indagar más para averiguar si el deterioro de estos parámetros precede al brote y cuál es el mecanismo responsable del desencadenamiento de toda la cascada.

El NO es una molécula que está implicada de forma importante en los procesos inflamatorios (Dugas *et al.*, 1995). Investigaciones previas han descrito aumento de la producción de NO (Rachmilewitz, 2008), niveles altos de sus metabolitos e incremento de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) en la mucosa gastrointestinal (Kolios *et al.*, 2004; Kruidenier *et al.*, 2003a). Sin embargo, sólo existe un estudio que ha tratado de caracterizar el papel del NO en el estrés oxidativo detectado en las células inmunes periféricas de estos pacientes (Dijkstra *et al.*, 2002), el cual describe un incremento en la expresión de la enzima NOS en los monocitos circulantes de los pacientes con EII activa. Nosotros hemos medido el NO de forma directa sin encontrar diferencias entre los pacientes con EC activa y los controles, por lo que o bien no está aumentado o su metabolización por la enzima NOS inducible sobre-expresada sería suficiente para evitar su acumulación. El NO puede actuar en el complejo IV de la cadena respiratoria de la mitocondria y regular su actividad (Beltran *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1994). Puesto que habíamos detectado una inhibición del $\Delta\psi_m$ era lógico evaluar la concentración de NO, cuyo aumento podría explicar la inhibición detectada. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que esta inhibición no depende de la acción del NO sobre la cadena respiratoria y, por lo tanto, parece muy poco probable que el NO y sus metabolitos contribuyan al estrés oxidativo detectado en las células inmunes periféricas de la EC.

Hemos tratado de evaluar, por primera vez, los radicales que están directamente implicados en el estrés oxidativo de la EII, ya que previamente sólo se había hecho de forma indirecta mediante la evaluación de los niveles de las moléculas dañadas por oxidación (Rezaie *et al.*, 2006; Tuzun *et al.*, 2002). Encontramos que el H_2O_2 está significativamente elevado, indicando que no es suficiente la capacidad anti-oxidante de las enzimas y que su

producción causa, al menos en parte, el estrés oxidativo de estos pacientes. Además, también hemos evaluado si el estrés oxidativo genera daño celular. El MDA, reflejo del daño por estrés oxidativo a lípidos, se encontró significativamente aumentado en los pacientes con EC activos e inactivos respecto a controles sanos, aunque en el grupo de inactivos el MDA mostró un aumento significativamente inferior al de activos. Un estudio reciente también ha reportado este aumento de MDA en eritrocitos de pacientes con EC activa e inactiva (Akman *et al.*, 2012). Los niveles de 8-oxo-dG, reflejo de daño en ADN por estrés oxidativo, estaban permanentemente elevados en pacientes con EC, independientemente de la actividad de la enfermedad, indicando un daño persistente al DNA. Se ha reportado que los fumadores muestran un aumento del daño por estrés oxidativo (Yanbaeva *et al.*, 2007), lo cual podría afectar los parámetros estudiados. Sin embargo, al analizar el estrés oxidativo en los pacientes con EC activa, no se detectaron diferencias en las concentraciones de MDA y 8-oxo-dG entre fumadores y no fumadores. Así pues, aun cuando la producción de H₂O₂ se recupera a los niveles normales en los pacientes inactivos, el daño oxidativo sigue siendo detectado en las células inmunes de los pacientes con EC. Otras ERO no medidas en nuestro estudio podrían estar implicadas en la perpetuación del daño oxidativo en los pacientes con EC o bien podría tratarse de un daño irreversible. Basándose en los experimentos realizados, no podemos dar una explicación razonable de este daño permanente por estrés oxidativo en la EC, ni tampoco podemos confirmar si es parte de la patogenia de la enfermedad o una consecuencia de ella. Sin embargo, nuestros resultados son consecuentes con estudios previos, que también han detectado el daño oxidativo persistente (Rezaie *et al.*, 2006; Yanbaeva *et al.*, 2007) o el constante aumento de glutatión peroxidasa (GPx) en los pacientes con EC (Tuzun *et al.*, 2002; Yanbaeva *et al.*, 2007). Algunos estudios publicados no han dado mucha importancia al hecho de que sus resultados muestran un daño oxidativo continuado. Sin embargo, nosotros así como otros estudios (Dincer *et al.*, 2007) hemos creído conveniente resaltar que el daño oxidativo persistente del ADN puede tener implicaciones en la predisposición y progresión al cáncer. De esta manera, el daño oxidativo persistente detectado en la EII podría estar relacionado con el aumento del riesgo de cáncer ya reportado en estos pacientes (Xie *et al.*, 2008) y ayudaría a

explicar las dificultades de cambiar la historia natural de la enfermedad, a pesar de la disponibilidad de nuevas drogas terapéuticas.

Nuestros resultados, revelan por primera vez el estado de la enzima GPx medida en leucocitos de sangre periférica en pacientes con EC al debut de la enfermedad, previo a tomar cualquier tipo de medicación que interfiera. Hemos observado un incremento tanto de la actividad como de la concentración de la enzima GPx en los pacientes con EC activa respecto a controles sanos. En la literatura se ha reportado que la enzima GPx está aumentada tanto en las biopsias de colon (Kruidenier *et al.*, 2003c) como en el plasma (Hoffenberg *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1994; Tuzun *et al.*, 2002) y en el suero (Maor *et al.*, 2008) de los pacientes con EC activa. No obstante, un estudio reciente no ha encontrado diferencias en los niveles de GPx en plasma de pacientes con EC activa, inactiva y controles sanos (Akman *et al.*, 2012). Sin embargo, respecto a los niveles de GPx medidos en eritrocitos, todos los estudios apuntan a una disminución en la actividad de la GPx en los pacientes con EC comparado con los controles sanos (Reimund *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1994). Los hallazgos contradictorios respecto al estado de esta enzima en la EC podrían deberse a que en cada estudio se ha medido la actividad en diferentes ambientes (eritrocitos, plasma, suero) y en diferentes poblaciones de pacientes, con distintas evoluciones de su enfermedad así como con distintos tratamientos. El aumento de esta enzima parece ser que no consigue eliminar por completo el H_2O_2 , lo cual podría explicarse porque la enzima, en células inflamatorias de humanos, se encuentra preferentemente en monocitos (Hata *et al.*, 1997; Masaki *et al.*, 1998), con lo cual, no actuaría a niveles suficientes para conseguir la depuración. El aumento de GPx en leucocitos podría considerarse una respuesta de la célula activada frente a los radicales libres y por ello ser un indicador de estrés oxidativo. Nuestros hallazgos apoyan el aumento de radicales libres en los pacientes con EC y el papel de la GPx como respuesta adicional contra el estrés oxidativo y como ayuda en la detoxificación del H_2O_2 . Llama la atención que dicho incremento de GPx no consigue una normalización completa de la concentración de H_2O_2 .

Otra enzima celular con capacidad teórica de depurar el H_2O_2 sería la enzima CAT. A pesar de que las células de los pacientes con EC presentan una

concentración aumentada de H_2O_2 , detectamos que la actividad de CAT se encontraba significativamente inhibida en las células inmunes de los pacientes con EC activa. Además dicha inhibición se detectó igualmente en los pacientes con EC inactiva, de modo que parece tratarse de una inhibición persistente independientemente de la actividad de la enfermedad. A este respecto, existen estudios que parecen indicar que la función primordial de la enzima CAT no sería tanto la de detoxificar el H_2O_2 , sino la de la regulación de procesos celulares mediante el control de los niveles de H_2O_2 (Nenoi *et al.*, 2001). El gen de la CAT parece ser insensible al estrés oxidativo de forma que no se expresa cuando aumentan las ERO y, por tanto, se considera un gen “housekeeper” no regulado (Yoo *et al.*, 1994). Uno de los procesos celulares regulados por la CAT parece ser el proceso de muerte celular programada o apoptosis, proceso que también está alterado en la EC, ya que los linfocitos presentan una resistencia a la misma, cuyo origen también ha sido abordado parcialmente en este estudio (ver más adelante).

El status de la enzima CAT nunca ha sido valorado previamente en la EC y el conocimiento generado sobre la misma procede principalmente de estudios farmacológicos realizados con líneas celulares tumorales (Chovolou *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 1998; Nenoi *et al.*, 2001). Algunos datos de la literatura científica centraron nuestro interés en intentar dilucidar las consecuencias de esta inhibición permanente de la CAT en los pacientes.

En la literatura existen descritas varias mutaciones de la enzima CAT (Goth *et al.*, 2004) las cuales tienen relación con el desarrollo de diferentes enfermedades de tipo autoinmune (Casp *et al.*, 2002; Chistiakov *et al.*, 2000; Schallreuter *et al.*, 1991). Además se han descrito situaciones de acatalasemia, cuya manifestación clínica es la ulceración y gangrena oral (enfermedad de Takahara) (Gross *et al.*, 1977; Matsunaga *et al.*, 1985), así como las alteraciones genéticas que las determinan (Ogata *et al.*, 2008). También se han descrito, en células tumorales, alteraciones de la actividad CAT producidas por una disminución de la expresión del gen (Goth *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1992) o por mecanismos reguladores post transcripcionales tales como proteínas que degradan el ARNm de CAT (Clerch *et al.*, 1992) y moléculas de señalización (proteínquinas y proteínfosfatasas), que pueden modificar su actividad (Yano

et al., 2002). Finalmente, se ha descrito un mecanismo que relaciona la regulación de la CAT con la respuesta inflamatoria, lo cual demuestra que la CAT tiene un impacto funcional más allá de la simple defensa antioxidante (Perez-Rivero *et al.*, 2008).

Por todo lo expuesto, el siguiente objetivo de nuestro estudio fue caracterizar el origen de la inhibición persistente de CAT, intentando esclarecer si la CAT presentaba una actividad disminuida por tratarse de una proteína anómala o de una disminución de su concentración consecuentemente con una menor expresión génica o a una regulación post-transcripcional alterada.

Los resultados de nuestro estudio indican que la inhibición de la actividad CAT depende de una baja expresión del ARNm del gen CAT, que se correlaciona a su vez con una baja concentración de proteína CAT, siendo la primera vez que se describe esta inhibición *in vivo* en humanos y en células no tumorales.

En nuestro estudio intentamos esclarecer otros posibles mecanismos de regulación post-transcripcional de la enzima CAT mediante la medida de los niveles de expresión (cantidad ARNm) de ciertas proteinquinasas (PKC γ y PKC ζ) y de la enzima telomerasa. Dichos niveles de expresión no pudieron ser detectados por quedar fuera de la zona de detección fiable del sistema de medida. Nuestro interés en estos mecanismos de regulación proceden de estudios "*in vitro*" que han demostrado que una deficiencia de la enzima telomerasa, induce una disminución de la actividad CAT con la consecuente producción de radicales libres, los cuales a su vez promueven la síntesis de citoquinas profibróticas (como el TGF- β 1) y de proteínas de la matriz extracelular (tales como fibronectina) (Perez-Rivero *et al.*, 2008), de forma que se relaciona a la enzima CAT con la respuesta inflamatoria.

Puesto que detectamos una inhibición de la expresión y que se han descrito SNPs relacionados con la actividad CAT en otras enfermedades autoinmunes, procedimos a profundizar en el estudio de polimorfismos de CAT. De los 15 que escogimos, sólo el SNP rs1001179 (-262 C>T) para CAT, mostró una correlación estadística con el desarrollo de EC. El genotipo homocigoto -262CC fue el más frecuentemente asociado a nuestro grupo de pacientes. El

polimorfismo -262C>T está localizado en la región promotora del gen de la CAT en humanos, en el cromosoma 11p13. Este SNP, también conocido como CAT -330C>T, genera tres genotipos, de los cuales el homocigoto -330CC/-262CC se ha asociado predominantemente con una disminución de los niveles de CAT en sangre en comparación con los genotipos -330TT/-262TT y -330CT/-262CT (Bohanec Grabar *et al.*, 2009; Forsberg *et al.*, 2001). Sin embargo, existen estudios que muestran resultados opuestos y describen una actividad CAT más baja en los portadores del alelo -262T que en los -262C (Ahn *et al.*, 2006; Bastaki *et al.*, 2006).

Un estudio reciente realizado en linfocitos de sangre periférica de pacientes afectados de lupus eritematoso sistémico, enfermedad donde se había reportado previamente una disminución de la actividad CAT (Taysi *et al.*, 2002), encuentra una asociación significativa de esta enfermedad con el genotipo CAT -330CC (Warchol *et al.*, 2008) coincidiendo con nuestros resultados. Existen estudios que correlacionan el SNP CAT-262 con enfermedades o situaciones en las que existe una disminución de la actividad CAT y un aumento de estrés oxidativo (Ahsan *et al.*, 2003; Goth *et al.*, 2000; Nadif *et al.*, 2005). En contraposición, se ha visto que este SNP también puede actuar protegiendo frente al desarrollo de ciertas enfermedades como el Alzheimer (Goulas *et al.*, 2002), la neuropatía asociada a la diabetes tipo 1 (Chistiakov *et al.*, 2006) y otras patologías que también están mediadas por estrés oxidativo (Christiansen *et al.*, 2004). Estas discrepancias podrían ser explicadas por los distintos mecanismos biológicos que actúan en la patogenia de estas enfermedades e indican la importancia del SNP CAT-262 como factor de variabilidad que actúa sobre genes de enzimas antioxidantes.

Respecto al SNP rs475043 para CAT mostró una correlación estadística con el desarrollo de EC pero sin alcanzar significatividad, probablemente por ser un estudio con un número limitado de pacientes. Este SNP ya ha sido estudiado previamente por el grupo de Van Camp (Carlsson *et al.*, 2005; Konings *et al.*, 2007) el cual estudió la influencia de diferentes SNPs del gen CAT, gen involucrado en el estrés oxidativo (entre ellos el rs475043), sobre la susceptibilidad a la pérdida de audición condicionada por la exposición al ruido.

El resto de SNPs para CAT no mostraron correlación estadística con el desarrollo de EC.

En definitiva, nuestros hallazgos sugieren que los SNPs para el gen de CAT podrían explicar la inhibición de la expresión de dicha enzima. El SNP rs1001179 ya había sido descrito previamente en la literatura como posible responsable de reducir la expresión de la enzima CAT. Es necesario que nuestros hallazgos sean confirmados aumentando el número de muestras, con estudios multicéntricos y poblacionales en la EC. Del mismo modo la implicación que la presencia de los SNPs suponga a la actividad enzimática debería ser caracterizada.

De todos los SNPs escogidos para SOD-Mn en nuestro estudio (rs4880, rs5746096, rs2758346, rs2758339 y rs5746136), ninguno de ellos mostró correlacionarse con el desarrollo de EC. Sin embargo, en la literatura existe un trabajo que asocia al SNP de SOD-Mn SOD2 Ala-9Val (rs4880) con la CU (Kosaka *et al.*, 2009) y con el desarrollo de cáncer colorrectal (Stoehlmacher *et al.*, 2002). Con todo lo expuesto, consideramos que se debe profundizar en el estudio de polimorfismos de SOD-Mn en la EII, puesto que es una enfermedad donde existe un aumento del estrés oxidativo y del riesgo de degeneración neoplásica.

Nuestros hallazgos, junto con las pruebas mencionadas en la literatura, sugieren que, cuando medimos las ERO y la capacidad antioxidante de la célula, no sólo estamos evaluando el estrés oxidativo, sino también los procesos de regulación de la célula, los cuales nunca han sido adecuadamente caracterizados. De hecho, existe evidencia en la literatura, coincidiendo con nuestros resultados, de que si bien las células que sobre-expresan la enzima SOD-Mn presentan un aumento compensatorio de la actividad GPx como respuesta al aumento de H₂O₂, este aumento compensatorio parece no implicar a la actividad CAT (Keller *et al.*, 1998) e incluso, contrariamente a las expectativas, se ha visto que en células resistentes a la apoptosis la expresión de la proteína CAT así como su actividad se encuentran disminuidas (Chovolou *et al.*, 2003). Sin embargo, existen otros estudios que evidencian que la sobre-

expresión de la CAT conlleva una disminución del radical H_2O_2 , lo que también parece tener un impacto sobre la capacidad apoptótica celular.

Por tanto, los estudios respecto a la CAT podrían agruparse en torno a dos teorías distintas e incluso casi contrarias que se resumen en:

1) Algunos estudios indican que la sobre-expresión de CAT, con la consecuente disminución de H_2O_2 , conlleva una protección frente a la apoptosis (Lin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2003; Tome *et al.*, 2001).

2) Varios estudios indican que una actividad CAT baja confiere a las células un fenotipo resistente a la apoptosis (Chovolou *et al.*, 2003; Iwai *et al.*, 2003; Kaimori *et al.*, 2003).

En este segundo grupo podemos reseñar como ejemplo que las células tumorales (resistentes a la apoptosis por definición) suelen presentar una actividad CAT inhibida y, por tanto, las ERO crónicamente aumentadas, lo cual se cree que contribuye al fenotipo maligno y a la capacidad de crecimiento celular aumentada. Los resultados de nuestro trabajo detectan, por primera vez *in vivo* y en células no tumorales, una inhibición persistente de la enzima CAT cuyo significado e implicación en la regulación de procesos celulares pretendemos clarificar.

Se ha reportado previamente en la literatura que en la EII existe una alteración de la apoptosis y de la respuesta inmune en las células. Nuestros resultados se han realizado con linfocitos CD4+ no activados aislados desde sangre periférica de pacientes con EC y se han comparado con células de sujetos sanos. La resistencia que los linfocitos no activados de los pacientes con EC han mostrado al ser activados empíricamente *in vitro*, apoya la idea de que dicha resistencia o bien es intrínseca a los linfocitos o bien está dirigida por algún elemento regulador que excede el ámbito de la mucosa intestinal y condiciona una alteración permanente de la capacidad apoptótica celular. Si la resistencia a la apoptosis afecta a todas las subpoblaciones celulares o afecta en un subtipo celular concreto se está investigando en el momento actual.

Al igual que el efecto citotóxico del TNF- α parece estar regulado por la concentración de H₂O₂ (Bai *et al.*, 2000), experimentos realizados con células resistentes al efecto del TNF- α demostraron que en ellas había dos enzimas antioxidantes disminuidas: la CAT y la SOD-Cu/Zn (Chovolou *et al.*, 2003). Por ello está aceptada la idea de que tanto la CAT como el H₂O₂ son reguladores clave de la sensibilidad que las células presenten al TNF- α (Bai *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2001b). Es lógico pensar que la inhibición permanente de la CAT encontrada en los linfocitos de nuestros pacientes debe tener un impacto en la regulación de la capacidad apoptótica de las células. Este aspecto lo hemos evidenciado por primera vez de forma directa al demostrar que la inhibición farmacológica de la CAT de linfocitos de sujetos sanos conlleva el desarrollo de resistencia a la apoptosis de los mismos. Con esto hemos ratificado hallazgos previos experimentales de que la resistencia al efecto citotóxico del TNF- α puede obtenerse si se expone a las células a un inhibidor de la CAT (el 3-aminotriazole-AZT) (Bai *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2001b), sólo que la trascendencia de nuestros resultados es importante por haber realizado los estudios ex-vivo, con células directamente obtenidas de sangre periférica.

El mecanismo por el que la actividad CAT influencia la capacidad apoptótica celular no está bien caracterizado, pero podría depender de una modificación de la conformación o de la actividad de quinasas, fosfatasas u otras proteínas sensibles a los ERO (Adler *et al.*, 1999; Bauer, 2002; Finkel, 2000; Herrlich *et al.*, 2000) y se regularía según la actividad de la CAT permitiese una mayor o menor concentración de H₂O₂ en la célula.

Por ello, en el estudio de expresión génica que hemos realizado para caracterizar la expresión de los genes de los enzimas antioxidantes, hemos incluido también genes implicados en la regulación del estrés oxidativo y de la capacidad apoptótica, así como algún gen ya reportado en la literatura como diferencialmente regulado en la EC, para tener un control interno y comparativo de nuestros resultados con los existentes en la literatura. Entre los distintos genes, en nuestro estudio hemos analizado otros genes relacionados con el estrés oxidativo y la apoptosis (FASR, FASLG, STAT1, NFKB1 y ASK), así como genes de moléculas de señalización intracelular (PSKH1, PPID y ABCB1).

Probablemente los mecanismos que regulen la capacidad apoptótica de los linfocitos sean múltiples, con mayor o menor interrelación entre ellos. En nuestro estudio hemos analizado desde el punto de vista genético (ARNm) el receptor del Fas (FasR) y su ligando (FasLG) en pacientes de EC al debut de la enfermedad y cuando están inactivos, así como en controles sanos. La expresión FasLG disminuida significativamente en los pacientes activos de EC contribuye a la resistencia apoptótica. Esta disminución no se acompaña de un incremento de expresión del receptor (FasR) como mecanismo compensatorio sino que los pacientes activos y de debut mantienen una expresión igual que los sujetos sanos. El hecho de que cuando los pacientes alcanzan la remisión tras instaurar tratamiento presentan un incremento de la expresión del FasR apoya que el efecto de los fármacos es inductor de la apoptosis, al menos parcialmente, induciendo el receptor Fas. De hecho, de todos es conocido que el efecto de los fármacos biológicos depende, al menos en parte, de su capacidad de inducir apoptosis en células de la inmunidad.

Respecto al NF- κ B, intermediario de muchos procesos celulares con funciones anti-apoptóticas (Visekruna *et al.*, 2006), nosotros sólo hemos observado un incremento significativo de los niveles de expresión génica de NF- κ B en el grupo de pacientes inactivos, no existiendo diferencias entre controles y pacientes al debut. Una posible explicación al respecto sería que en el grupo de pacientes inactivos el proceso apoptótico está en marcha, por lo que la célula tendería a compensarlo mediante el incremento de los niveles de NF- κ B.

En nuestro estudio los pacientes con EC activa y controles sanos no mostraron diferencias en los niveles de ASK, proteína Pro-apoptótica. Sin embargo, cuando la EC está inactiva los niveles de ASK tienden a aumentar sugiriendo de nuevo la posibilidad de un aumento del proceso apoptótico farmacológicamente inducido (por el tratamiento con inmunosupresores y fármacos anti-TNF- α) en este grupo de pacientes.

Los niveles de PPID, proteína de la matriz mitocondrial implicada en la supresión de la apoptosis (Linard *et al.*, 2009), en los pacientes con EC activa y controles no mostraron diferencias, por lo que la resistencia a la apoptosis tampoco parece depender del Bcl2. En los pacientes con EC inactiva, los

niveles de expresión del PPID están más altos. Este incremento de PPID encontrado en los pacientes con EC inactiva podría estar relacionado con la influencia de los tratamientos inmunosupresores y biológicos recibidos. Los bajos niveles de PPID en los pacientes con EC activa podrían explicar también la demostrada falta de eficacia de la ciclosporina A en estos pacientes y que no sea útil como tratamiento (Travis *et al.*, 2006). En la literatura hay descrito, en contra de nuestros hallazgos, que la mucosa tanto inflamada como no inflamada de pacientes los pacientes con EC y CU tenía una expresión aumentada de PPID respecto a los controles sanos, pudiendo ser éste un evento local y limitado a la mucosa, cuyo papel en la patogenia de la EII queda por clarificar (Wu *et al.*, 2007).

Los pacientes con EC activa e inactiva presentan un aumento significativo en la expresión génica de STAT1, gen incluido dentro de los genes inducibles por IFN γ , respecto de los controles sanos. La sobreexpresión de STAT1 encontrada en los pacientes con EC, independientemente del estado de actividad, podría ser indicativa de la activación de la vía TH1 mediada por IFN γ , IL12 e IL23 y destaca la importancia del IFN γ en la patogenia de la EC (Niessner *et al.*, 1995) y su posible implicación en la regulación del estrés oxidativo. Existen dos estudios realizados en biopsias de mucosa de pacientes con EC donde también se evidencia que la expresión del gen STAT1 está elevada (Schreiber *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, los pacientes con EC activa al debut de la enfermedad presentaron niveles de ABCB1 significativamente inferiores a los controles sanos. Sin embargo, cuando los pacientes con EC alcanzaron la inactividad aumentaron los niveles de ABCB1. Estos resultados podrían explicar la alteración de la resistencia a determinados fármacos o más bien la pérdida de respuesta que puede aparecer durante el curso de la enfermedad en algunos pacientes. A este respecto ya se ha reportado una disminución de la expresión de ABCB1 en la mucosa de pacientes con CU (Langmann *et al.*, 2004) y con EC (Wu *et al.*, 2007), así como una correlación entre diferentes variantes de este gen y la susceptibilidad y el fenotipo de CU (Ho *et al.*, 2006). Por tanto, ABCB1 es una molécula a estudiar en la patogenia de la EII, siendo de gran

interés para estos pacientes que van a ser sometidos a numerosos fármacos durante la evolución de su enfermedad.

Nosotros encontramos que los niveles de PSKH1 eran superiores en los pacientes con EC respecto de los controles, lo cual nos apunta al transporte y procesado del pre-ARNm como un posible objetivo en la patogenia de la EC, además de procesos de fosforilación similares a los que regulan la CAT. Estos resultados coinciden también con los encontrados en un estudio realizado en biopsias de pacientes con EII, donde la expresión génica de PSKH1 estaba aumentada en la mucosa de estos pacientes respecto a controles sanos (Wu *et al.*, 2007). No obstante, las implicaciones biológicas de esta sobreexpresión todavía no están bien definidas.

En definitiva, nuestros resultados muestran una resistencia intrínseca y/o permanente de los linfocitos CD4+ de los pacientes con EC que parece ser consecuente a una disminución de la actividad CAT y un incremento de la concentración H₂O₂, probablemente de origen mitocondrial, así como de la probable regulación/interacción que estos factores tengan con la expresión de elementos de la vía Fas y la vía mitocondrial.

El daño oxidativo detectado constantemente, independientemente de la actividad de la enfermedad, apunta hacia elementos patogénicos permanentes que podrían condicionar alteraciones en la capacidades inmunes de las células de la serie blanca. Los genes clásicamente relacionados con la apoptosis parecen expresarse y participar en la enfermedad ya inactiva, por lo que su inducción podría ser secundaria a los tratamientos administrados para controlar la EC. De los genes estudiados, sólo los relacionados con la fosforilación proteica y consecuentemente con la regulación de proteínas como podría ser la CAT, y los que inducen citoquinas de la respuesta Th1 tipo IFN, que está también elevado en la enfermedad permanentemente, podrían estar jugando un papel en la alteración de la capacidad apoptótica detectada.

Todos estos hallazgos ayudan a clarificar algunos de los mecanismos patogénicos implicados en al EC y nos abren nuevas líneas de investigación y posibles dianas terapéuticas.

7. CONCLUSIONES

- 1 Los pacientes con EC presentan un estrés oxidativo permanente en sangre periférica, que depende de un exceso de producción de H_2O_2 , el cual sobrepasa las capacidades antioxidantes. Este estrés oxidativo se refleja en un daño permanente detectado sobre los lípidos y sobre el ADN de las células de sangre periférica.
- 2 Los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con EC presentan mayor sensibilidad para la formación de H_2O_2 .
- 3 La elevación significativa de la enzima SOD-Mn sitúa a la mitocondria como organela participante en la génesis del estrés oxidativo detectado, de modo que una elevación significativa de O_2 debe derivar de la disminución del potencial de membrana que se detecta en estos pacientes, especialmente cuando están en brote.
- 4 El aumento de TNF- α detectado en el plasma de los pacientes podría contribuir a la inhibición del potencial de membrana mitocondrial tal y como demuestran estudios experimentales y, además, apoya el hecho demostrado en este estudio de que existe una correlación negativa entre el potencial de membrana mitocondrial y la concentración de TNF- α . Además, el NO no participa en el mecanismo responsable de esta inhibición.
- 5 Tanto el potencial de membrana mitocondrial como la concentración de TNF- α recuperan valores control cuando los pacientes consiguen una remisión completa y mantenida de la actividad inflamatoria. Este hecho orienta a considerar otros orígenes responsables de formar radicales que expliquen el estrés oxidativo permanente detectado.
- 6 El incremento de GPx en estos pacientes es insuficiente para mantener las concentraciones de H_2O_2 a niveles control. La enzima CAT, implicada en procesos de detoxificación sólo cuando hay una formación excesiva de H_2O_2 , no se activa en este sentido en estos pacientes sino que permanece significativa y permanentemente inhibida.

- 7 La enzima CAT ha mostrado estar implicada en la regulación de variados procesos celulares. La inhibición permanente de la enzima CAT en los pacientes con EC podría estar condicionando las capacidades apoptóticas de las células inmunes de estos pacientes, al igual que la inhibición de CAT en controles condiciona una disminución de las capacidades apoptóticas celulares.
- 8 La inhibición de la actividad CAT es secundaria a una disminución de la concentración de proteína que depende de una menor expresión génica del gen correspondiente. Los polimorfismos descritos previamente para la CAT se han caracterizado en estos pacientes, evidenciando que el polimorfismo rs1001179 se asocia significativamente con la enfermedad.
- 9 El análisis de expresión de genes previamente reportados como asociados a la EC evidencia que los genes implicados en la regulación de la vía FAS dependiente del factor de transcripción NF- κ B están diferencialmente expresados en estos pacientes. La disminución de la proteína CAT debe ser explorada como elemento regulador de la apoptosis, así como su implicación en la vía FAS-NF- κ B. Otras proteínas reguladoras de apoptosis (ASK, PPID) no parecen tener una implicación en este contexto.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, *et al.* (2002). Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**(3): 679-688.

Abuja PM, Albertini R (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **306**(1-2): 1-17.

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**(45): 6104-6111.

Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology* **105**: 121-126.

Aghdassi E, Allard JP (2000). Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* **28**(6): 880-886.

Aghdassi E, Wendland BE, Steinhart AH, Wolman SL, Jeejeebhoy K, Allard JP (2003). Antioxidant vitamin supplementation in Crohn's disease decreases oxidative stress. a randomized controlled trial. *The American journal of gastroenterology* **98**(2): 348-353.

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, *et al.* (2002). The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**(4): 854-866.

Ahn J, Nowell S, McCann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, *et al.* (2006). Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(6): 1217-1222.

Ahsan H, Chen Y, Kibriya MG, Islam MN, Slavkovich VN, Graziano JH, *et al.* (2003). Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. *Cancer letters* **201**(1): 57-65.

Aimone-Gastin I, Cable S, Keller JM, Bigard MA, Champigneulle B, Gaucher P, *et al.* (1994). Studies on peroxisomes of colonic mucosa in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* **39**(10): 2177-2185.

Akman T, Akarsu M, Akpınar H, Resmi H, Sezer E Erythrocyte Deformability and Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease. *Digestive diseases and sciences*.

Akman T, Akarsu M, Akpınar H, Resmi H, Taylan E (2012). Erythrocyte deformability and oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* **57**(2): 458-464.

Almenier HA, Al Menshawy HH, Maher MM, Al Gamal S (2012). Oxidative stress and inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**: 1335-1344.

Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, *et al.* (2005). Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Annals of surgery* **242**(5): 693-700.

- Allen RG, Tresini M (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* **28**(3): 463-499.
- Ames BN (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science (New York, N.Y)* **221**(4617): 1256-1264.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(11): 6858-6862.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(17): 7915-7922.
- Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjønneland A, Vogel U (2012). Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* **44**(3): 185-194.
- Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**(1): 40-46.
- Annese V, Andreoli A, Astegiano M, Campieri M, Caprilli R, Cucchiara S, *et al.* (2001). Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC study. Italian Study Group for the Disease of Colon and Rectum. *The American journal of gastroenterology* **96**(10): 2939-2945.
- Armstrong JS, Steinauer KK, Hornung B, Irish JM, Lecane P, Birrell GW, *et al.* (2002). Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* **9**(3): 252-263.
- Armstrong JS, Whiteman M (2007). Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods in cell biology* **80**: 355-377.
- Arnott ID, Kingstone K, Ghosh S (2000). Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **35**(11): 1163-1169.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, *et al.* (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine* **6**(5): 583-588.
- Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP (1993). Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* **120**(2): 168-178.
- Aw TY (1998). Determinants of intestinal detoxication of lipid hydroperoxides. *Free radical research* **28**(6): 637-646.

- Babior BM (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *The New England journal of medicine* **298**(12): 659-668.
- Bag A, Bag N (2008). Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(12): 3298-3305.
- Bai J, Cederbaum AI (2000). Overexpression of catalase in the mitochondrial or cytosolic compartment increases sensitivity of HepG2 cells to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **275**(25): 19241-19249.
- Barbosa DS, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodriguez MA, Burini RC, Dichi I (2003). Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **19**(10): 837-842.
- Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen CI, Bayless TM, *et al.* (2004). A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflammatory bowel diseases* **10**(1): 15-22.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, *et al.* (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics* **40**(8): 955-962.
- Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Phillips A, *et al.* (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nature genetics* **41**(12): 1330-1334.
- Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG (1993). Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases* **52**(9): 659-666.
- Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, Chande N, Chen C, Balmes JR, *et al.* (2006). Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics* **16**(4): 279-286.
- Bauer G (2002). Signaling and proapoptotic functions of transformed cell-derived reactive oxygen species. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **66**(1): 41-56.
- Bauer V, Bauer F (1999). Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury. *Gen Physiol Biophys* **18 Spec No**: 7-14.
- Becker BF (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* **14**(6): 615-631.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* **271**(5 Pt 1): C1424-1437.

Beier K, Volkl A, Fahimi HD (1997). TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS letters* **412**(2): 385-387.

Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S (2000). The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(26): 14602-14607.

Beltran B, Quintero M, Garcia-Zaragoza E, O'Connor E, Esplugues JV, Moncada S (2002). Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(13): 8892-8897.

Benzi G, Moretti A (1995). Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* **19**(1): 77-101.

Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandebunder B, Abbadie C (2001a). Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer research* **61**(6): 2656-2664.

Bernard D, Slomianny C, Vandebunder B, Abbadie C (2001b). cRel induces mitochondrial alterations in correlation with proliferation arrest. *Free Radic Biol Med* **31**(8): 943-953.

Bhaskar L, Ramakrishna BS, Balasubramanian KA (1995). Colonic mucosal antioxidant enzymes and lipid peroxide levels in normal subjects and patients with ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology* **10**(2): 140-143.

Biagioni C, Favilli F, Catarzi S, Marcucci T, Fazi M, Tonelli F, *et al.* (2006). Redox state and O₂⁻ production in neutrophils of Crohn's disease patients. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* **231**(2): 186-195.

Binder V (2004). Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best practice & research* **18**(3): 463-479.

Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS, Fu S, Fisher PJ, Rivera MT, *et al.* (2000). Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* **29**(9): 881-888.

Bohanec Grabar P, Logar D, Tomsic M, Rozman B, Dolzan V (2009). Genetic polymorphisms modifying oxidative stress are associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Dis Markers* **26**(1): 41-48.

Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, *et al.* (1999). Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* **116**(3): 557-565.

- Bondy SC (1992). Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicology* **13**(1): 87-100.
- Bosque A, Pardo J, Martinez-Lorenzo MJ, Iturralde M, Marzo I, Pineiro A, *et al.* (2005). Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *Journal of leukocyte biology* **77**(4): 568-578.
- Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ, *et al.* (1993). Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* **342**(8867): 338-340.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**(3): 707-716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**(3): 617-630.
- Brant SR (2011). Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflammatory bowel diseases* **17**(1): 1-5.
- Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, *et al.* (2003). MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics* **73**(6): 1282-1292.
- Brede G, Solheim J, Stang E, Prydz H (2003). Mutants of the protein serine kinase PSKH1 disassemble the Golgi apparatus. *Exp Cell Res* **291**(2): 299-312.
- Brown GC, Cooper CE (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS letters* **356**(2-3): 295-298.
- Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, *et al.* (1998). [Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease]. *Medicina clinica* **110**(17): 651-656.
- Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J, Le PT, Fisher S, *et al.* (2001). Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* **166**(10): 6399-6403.
- Buning C, Genschel J, Buhner S, Kruger S, Kling K, Dignass A, *et al.* (2004). Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **19**(10): 1073-1078.
- Burt RK, Craig RM, Milanetti F, Quigley K, Gozdzia P, Bucha J, *et al.* (2010). Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in patients with

severe anti-TNF refractory Crohn disease: long-term follow-up. *Blood* **116**(26): 6123-6132.

Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, *et al.* (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* **39**(11): 1329-1337.

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, *et al.* (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**(7219): 259-263.

Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, *et al.* (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* **141**(7): 1135-1145.

Candeias LP, Patel KB, Stratford MR, Wardman P (1993). Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS letters* **333**(1-2): 151-153.

Candeias LP, Stratford MR, Wardman P (1994). Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron(II) complex. *Free radical research* **20**(4): 241-249.

Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA, Estabrook RW (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(9): 5362-5366.

Carlsson PI, Van Laer L, Borg E, Bondeson ML, Thys M, Fransen E, *et al.* (2005). The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res* **202**(1-2): 87-96.

Caronia D, Patino-Garcia A, Perez-Martinez A, Pita G, Moreno LT, Zalacain-Diez M, *et al.* (2011). Effect of ABCB1 and ABCC3 polymorphisms on osteosarcoma survival after chemotherapy: a pharmacogenetic study. *PloS one* **6**(10): e26091.

Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of leukocyte biology* **55**(2): 253-258.

Casp CB, She JX, McCormack WT (2002). Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **15**(1): 62-66.

Cathcart R, Schwiers E, Saul RL, Ames BN (1984). Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**(18): 5633-5637.

- Cerutti PA, Trump BF (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* **3**(1): 1-7.
- Clerch LB, Massaro D (1992). Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *The Journal of biological chemistry* **267**(5): 2853-2855.
- Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evrard JP, Dupas JL, *et al.* (1996). Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* **111**(3): 604-607.
- Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, *et al.* (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine* **16**(1): 90-97.
- Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Gendre JP (1999). Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut* **45**(2): 218-222.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1984). Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *Jama* **251**(1): 73-79.
- Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM (1974). Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *The New England journal of medicine* **290**(11): 593-597.
- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, *et al.* (2002). The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**(4): 867-874.
- Cuzzocrea S, Caputi AP, Zingarelli B (1998). Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly (ADP-ribose) synthetase and causes cellular energy depletion in carrageenan-induced pleurisy. *Immunology* **93**(1): 96-101.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**(3): 527-605.
- Chandel NS, Schumacker PT, Arch RH (2001). Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **276**(46): 42728-42736.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin* **49**(3): 481-493.
- Chen Y, Gibson SB (2008). Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* **4**(2): 246-248.
- Chiarpotto E, Scavazza A, Leonarduzzi G, Camandola S, Biasi F, Teggia PM, *et al.* (1997). Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 expression in

pretumoral and tumoral lesions of human intestine. *Free Radic Biol Med* **22**(5): 889-894.

Chistiakov DA, Savost'ianov KV, Turakulov RI, Shcherbacheva LN, Mamaeva GG, Balabolkin MI, *et al.* (2000). [Nucleotide substitution C1167T in the catalase gene and position of nearby polymorphic markers DS11S907 and D11S2008 are connected with development of diabetes mellitus type 2]. *Molekuliarnaia biologii* **34**(5): 863-867.

Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'ianov KV, Bursa TR, Galeev IV, Stokov IA, *et al.* (2006). The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab* **32**(1): 63-68.

Cho JH, Brant SR (2011). Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**(6): 1704-1712.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, *et al.* (1998). Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(13): 7502-7507.

Chovolou Y, Watjen W, Kampkotter A, Kahl R (2003). Resistance to tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced apoptosis in rat hepatoma cells expressing TNF-alpha is linked to low antioxidant enzyme expression. *The Journal of biological chemistry* **278**(32): 29626-29632.

Christiansen L, Petersen HC, Bathum L, Frederiksen H, McGue M, Christensen K (2004). The catalase -262C/T promoter polymorphism and aging phenotypes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**(9): B886-889.

D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, *et al.* (2001). Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **36**(12): 1289-1294.

Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, *et al.* (1998). Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**(6): 1405-1413.

Dassopoulos T, Nguyen GC, Talor MV, Datta LW, Isaacs KL, Lewis JD, *et al.* NOD2 mutations and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies are risk factors for Crohn's disease in African Americans. *Am J Gastroenterol* **105**(2): 378-386.

Davidson CM, Northrup H, King TM, Fletcher JM, Townsend I, Tyerman GH, *et al.* (2008). Genes in glucose metabolism and association with spina bifida. *Reprod Sci* **15**(1): 51-58.

Davies KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry* **262**(20): 9895-9901.

- Del Maestro RF (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* **492**: 153-168.
- Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, *et al.* (1998). Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology* **186**(4): 416-421.
- Dijkstra G, Zandvoort AJ, Kobold AC, de Jager-Krikken A, Heeringa P, van Goor H, *et al.* (2002). Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with active inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **37**(5): 546-554.
- Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T (2007). Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* **52**(7): 1636-1641.
- Djukic M, Jovanovic MC, Ninkovic M, Vasiljevic I, Jovanovic M (2007). The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum. *Ann Agric Environ Med* **14**(2): 247-252.
- Doering J, Begue B, Lentze MJ, Rieux-Laucat F, Goulet O, Schmitz J, *et al.* (2004). Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut* **53**(11): 1632-1638.
- Dorn SD, Abad JF, Panagopoulos G, Korelitz BI (2004). Clinical characteristics of familial versus sporadic Crohn's disease using the Vienna Classification. *Inflammatory bowel diseases* **10**(3): 201-206.
- Doroshov JH, Davies KJ (1983). Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin. *Biochem Pharmacol* **32**(19): 2935-2939.
- Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE (2000). High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *American journal of human genetics* **66**(6): 1857-1862.
- Dugas B, Debre P, Moncada S (1995). Nitric oxide, a vital poison inside the immune and inflammatory network. *Research in immunology* **146**(9): 664-670.
- Durak I, Yasa MH, Bektas A, Kacmaz M, Cimen MY, Ozturk HS (2000). Mucosal antioxidant defense is not impaired in ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* **47**(34): 1015-1017.
- Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP (2004). Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *The American journal of gastroenterology* **99**(12): 2393-2404.

- Ehrenschwender M, Wajant H (2009). The role of FasL and Fas in health and disease. *Adv Exp Med Biol* **647**: 64-93.
- Eliseev RA, Malecki J, Lester T, Zhang Y, Humphrey J, Gunter TE (2009). Cyclophilin D interacts with Bcl2 and exerts an anti-apoptotic effect. *The Journal of biological chemistry* **284**(15): 9692-9699.
- Ellingson JL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, *et al.* (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot* **68**(5): 966-972.
- Em S, Laddha NC, Chatterjee S, Gani AR, Malek RA, Shah BJ, *et al.* (2007). Association of catalase T/C exon 9 and glutathione peroxidase codon 200 polymorphisms in relation to their activities and oxidative stress with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **20**(5): 405-407.
- Fantone JC, Ward PA (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The American journal of pathology* **107**(3): 395-418.
- Faulkner K, Fridovich I (1993). Luminol and lucigenin as detectors for O₂. *Free Radic Biol Med* **15**(4): 447-451.
- Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Xiol X, Gine JJ, Dolz C, Cabre E, *et al.* (1989). Vitamin status in patients with inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* **84**(7): 744-748.
- Finkel T (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS letters* **476**(1-2): 52-54.
- Fiocchi C (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* **115**(1): 182-205.
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M (2008). Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* **9**: 30.
- Forrest K, Symmons D, Foster P (2004). Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Alimentary pharmacology & therapeutics* **20**(10): 1035-1043.
- Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstern R (2001). A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* **30**(5): 500-505.
- Fossati P, Prencipe L, Berti G (1980). Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical chemistry* **26**(2): 227-231.

Foster C, Snyder AC, Thompson NN, Green MA, Foley M, Schragger M (1993). Effect of pacing strategy on cycle time trial performance. *Medicine and science in sports and exercise* **25**(3): 383-388.

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, *et al.* (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**(7): 987-992.

Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, *et al.* (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics* **42**(12): 1118-1125.

Frei B (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* **97**(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.

Fridovich I (1970). Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry* **245**(16): 4053-4057.

Fridovich I (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of biological chemistry* **272**(30): 18515-18517.

Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology* **23**: 239-257.

Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A (2011). Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut* **60**(11): 1580-1588.

Furuhata M, Takada E, Noguchi T, Ichijo H, Mizuguchi J (2009). Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1 mediates apoptosis through activation of JNK1 following engagement of membrane immunoglobulin. *Exp Cell Res* **315**(20): 3467-3476.

Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez y Baena R, Borasio E, Marzatico F (1998). Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *Journal of neurosurgery* **89**(5): 748-754.

Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *The Journal of biological chemistry* **272**(17): 11369-11377.

Gavalas NG, Akhtar S, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH (2006). Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochemical and biophysical research communications* **345**(4): 1586-1591.

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**(10): R80.

Giordano G, Kavanagh TJ, Costa LG (2008). Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**(2): 161-168.

Godkin AJ, De Belder AJ, Villa L, Wong A, Beesley JE, Kane SP, *et al.* (1996). Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *European journal of clinical investigation* **26**(10): 867-872.

Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF (1998). Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochimica et biophysica acta* **1366**(1-2): 167-175.

Goth L (2000). Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clinical chemistry* **46**(4): 564-566.

Goth L, Eaton JW (2000). Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* **356**(9244): 1820-1821.

Goth L, Rass P, Pay A (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* **8**(3): 141-149.

Goth L, Vitai M (1996). Hypocatalasemia in hospital patients. *Clinical chemistry* **42**(2): 341-342.

Goulas A, Fidani L, Kotsis A, Mirtsou V, Petersen RC, Tangalos E, *et al.* (2002). An association study of a functional catalase gene polymorphism, -262C-->T, and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **330**(2): 210-213.

Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y)* **281**(5381): 1309-1312.

Grisham MB (1994). Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* **344**(8926): 859-861.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *The American journal of physiology* **276**(2 Pt 1): G315-321.

Gross J, Scherz B, Wyss S, Kunzel W, Maiwald HJ, Hartwig A, *et al.* (1977). [Characterization of the catalase of erythrocytes of a patient with the symptoms of Takahara's disease]. *Acta biologica et medica Germanica* **36**(5-6): 793-795.

Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**(8924): 721-724.

Halliwell B (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society transactions* **24**(4): 1023-1027.

- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics* **280**(1): 1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics* **246**(2): 501-514.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, *et al.* (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**(9272): 1925-1928.
- Hanauer SB (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory bowel diseases* **12 Suppl 1**: S3-9.
- Hansen TS, Jess T, Vind I, Elkjaer M, Nielsen MF, Gomborg M, *et al.* (2011). Environmental factors in inflammatory bowel disease: a case-control study based on a Danish inception cohort. *J Crohns Colitis* **5**(6): 577-584.
- Hassan HM, Fridovich I (1979). Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Archives of biochemistry and biophysics* **196**(2): 385-395.
- Hata Y, Kawabe T, Hiraishi H, Ota S, Terano A, Ivey KJ (1997). Antioxidant defenses of cultured colonic epithelial cells against reactive oxygen metabolites. *European journal of pharmacology* **321**(1): 113-119.
- Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H (2006). The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* **8**(4): 1098-1107.
- Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, *et al.* (2003). CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* **52**(4): 558-562.
- Hernandez-Saavedra D, McCord JM (2009). Association of a new intronic polymorphism of the SOD2 gene (G1677T) with cancer. *Cell Biochem Funct* **27**(4): 223-227.
- Herrlich P, Bohmer FD (2000). Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* **59**(1): 35-41.
- Herulf M, Ljung T, Hellstrom PM, Weitzberg E, Lundberg JO (1998). Increased luminal nitric oxide in inflammatory bowel disease as shown with a novel minimally invasive method. *Scandinavian journal of gastroenterology* **33**(2): 164-169.
- Heyman MB, Kirschner BS, Gold BD, Ferry G, Baldassano R, Cohen SA, *et al.* (2005). Children with early-onset inflammatory bowel disease (IBD): analysis of a pediatric IBD consortium registry. *J Pediatr* **146**(1): 35-40.

- Hildeman DA, Mitchell T, Teague TK, Henson P, Day BJ, Kappler J, *et al.* (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* **10**(6): 735-744.
- Hille R (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* **96**(7): 2757-2816.
- Hille R, Nishino T (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J* **9**(11): 995-1003.
- Hirokawa M, Miura S, Yoshida H, Kurose I, Shigematsu T, Hokari R, *et al.* (1998). Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. *Alcoholism, clinical and experimental research* **22**(3 Suppl): 111S-114S.
- Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**(4): 993-1000.
- Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J (2006). ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Human molecular genetics* **15**(5): 797-805.
- Hoffenberg EJ, Deutsch J, Smith S, Sokol RJ (1997). Circulating antioxidant concentrations in children with inflammatory bowel disease. *The American journal of clinical nutrition* **65**(5): 1482-1488.
- Hogg N, Kalyanaraman B (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta* **1411**(2-3): 378-384.
- Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Annals of internal medicine* **105**(6): 883-885.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, *et al.* (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 599-603.
- Iantomasi T, Marraccini P, Favilli F, Vincenzini MT, Ferretti P, Tonelli F (1994). Glutathione metabolism in Crohn's disease. *Biochemical medicine and metabolic biology* **53**(2): 87-91.
- Ikeda I, Kasajima T, Ishiyama S, Shimojo T, Takeo Y, Nishikawa T, *et al.* (1997). Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* **92**(8): 1339-1341.
- Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, *et al.* (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* **163**(2): 1081-1090.

Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, *et al.* (2002). Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**(1): 86-91.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, *et al.* (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of biochemistry and biophysics* **298**(2): 431-437.

Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C (2001). Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* **49**(1): 35-41.

Iwai K, Kondo T, Watanabe M, Yabu T, Kitano T, Taguchi Y, *et al.* (2003). Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**(11): 9813-9822.

Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi AA, Daryani NE, Abdollahi M (2004). Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Digestive diseases and sciences* **49**(11-12): 1752-1757.

Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, *et al.* (2001). A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Human genetics* **109**(1): 95-98.

Jourd'Heuil D, Vaananen P, Meddings JB (1993). Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *The American journal of physiology* **264**(6 Pt 1): G1009-1015.

Kahl R, Kampkotter A, Watjen W, Chovolou Y (2004). Antioxidant enzymes and apoptosis. *Drug metabolism reviews* **36**(3-4): 747-762.

Kaimori JY, Takenaka M, Nakajima H, Hamano T, Horio M, Sugaya T, *et al.* (2003). Induction of glia maturation factor-beta in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through the p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities. *The Journal of biological chemistry* **278**(35): 33519-33527.

Kakkar P, Singh BK (2007). Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Molecular and cellular biochemistry* **305**(1-2): 235-253.

Kaser A, Blumberg RS (2011). Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**(6): 1738-1747.

Kedziora J, Bartosz G (1988). Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **4**(5): 317-330.

Kefalakes H, Stylianides TJ, Amanakis G, Kolios G (2009). Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *European journal of clinical pharmacology* **65**(10): 963-970.

Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(16): 7381-7385.

Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, *et al.* (1998). Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* **18**(2): 687-697.

Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C, *et al.* (1992). Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* **103**(1): 177-185.

Ketterer B (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **16**(10-11): 957-973.

Khalili H, Higuchi LM, Ananthkrishnan AN, Richter JM, Feskanich D, Fuchs CS, *et al.* (2012). Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut*.

Kim H, Kim KH (1998). Effect of nitric oxide on hydrogen peroxide-induced damage in isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology* **57**(6): 323-330.

Kim TH, Hong JM, Oh B, Cho YS, Lee JY, Kim HL, *et al.* (2008). Genetic association study of polymorphisms in the catalase gene with the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthritis Cartilage* **16**(9): 1060-1066.

Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, *et al.* (1998). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* **42**(2): 180-187.

Kinningham KK, Oberley TD, Lin S, Mattingly CA, St Clair DK (1999). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. *Faseb J* **13**(12): 1601-1610.

Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO (1995). Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* **73**(1): 3-19.

Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, *et al.* (1988). Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* **33**(8): 951-955.

Ko S, Kwok TT, Fung KP, Choy YM, Lee CY, Kong SK (2001). Tumour necrosis factor induced an early release of superoxide and a late mitochondrial membrane

depolarization in L929 cells. Increase in the production of superoxide is not sufficient to mimic the action of TNF. *Biological signals and receptors* **10**(5): 326-335.

Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* **43**(1): 56-63.

Kolios G, Valatas V, Ward SG (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* **113**(4): 427-437.

Konings A, Van Laer L, Pawelczyk M, Carlsson PI, Bondeson ML, Rajkowska E, *et al.* (2007). Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Human molecular genetics* **16**(15): 1872-1883.

Kosaka T, Yoshino J, Inui K, Wakabayashi T, Kobayashi T, Watanabe S, *et al.* (2009). Involvement of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and superoxide dismutase polymorphisms in ulcerative colitis. *DNA Cell Biol* **28**(12): 625-631.

Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA (2004). Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* **49**(9): 1433-1437.

Krammer PH (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**(6805): 789-795.

Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**(7): 532-542.

Krech T, Scheuerer E, Geffers R, Kreipe H, Lehmann U, Christgen M (2012). ABCB1/MDR1 contributes to the anticancer drug-resistant phenotype of IPH-926 human lobular breast cancer cells. *Cancer letters* **315**(2): 153-160.

Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, *et al.* (2007). A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* **356**(6): 580-592.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW (2003a). Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *The Journal of pathology* **201**(1): 28-36.

Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, *et al.* (2003b). Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology* **201**(1): 7-16.

Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, *et al.* (2003c). Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology* **201**(1): 17-27.

Kruidenier L, Verspaget HW (2002). Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Alimentary pharmacology & therapeutics* **16**(12): 1997-2015.

Kubes P, McCafferty DM (2000). Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* **109**(2): 150-158.

Kurien BT, Scofield RH (2003). Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. *Life Sci* **73**(13): 1655-1666.

Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol* **13**(46): 6134-6139.

Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebis G, Zahn A, *et al.* (2004). Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* **127**(1): 26-40.

Lashner BA, Evans AA, Kirsner JB, Hanauer SB (1986). Prevalence and incidence of inflammatory bowel disease in family members. *Gastroenterology* **91**(6): 1396-1400.

Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* **20**(1): 205-219.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J (2011). New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* **60**(12): 1739-1753.

Lefer AM, Lefer DJ (1999). Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *The American journal of physiology* **276**(3 Pt 1): G572-575.

Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, Trost LC, Nishimura Y, Herman B, *et al.* (1998). Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *BioFactors (Oxford, England)* **8**(3-4): 283-285.

Lenaz G (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* **942**: 93-136.

Leonard N, Bishop AE, Polak JM, Talbot IC (1998). Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *Journal of clinical pathology* **51**(10): 750-753.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, *et al.* (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics* **70**(4): 845-857.

Leshed A, Somasundaram R, de Haar C, van der Woude CJ, Braat H, Peppelenbosch MP (2010). Role of defective autophagia and the intestinal flora in Crohn disease. *Self/nonsel* **1**(4): 323-327.

Levine B, Deretic V (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**(10): 767-777.

Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, *et al.* (1996). Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* **41**(10): 2078-2086.

Lin SJ, Shyue SK, Liu PL, Chen YH, Ku HH, Chen JW, *et al.* (2004). Adenovirus-mediated overexpression of catalase attenuates oxLDL-induced apoptosis in human aortic endothelial cells via AP-1 and C-Jun N-terminal kinase/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**(1): 129-139.

Linard D, Kandlbinder A, Degand H, Morsomme P, Dietz KJ, Knoop B (2009). Redox characterization of human cyclophilin D: identification of a new mammalian mitochondrial redox sensor? *Archives of biochemistry and biophysics* **491**(1-2): 39-45.

Lindberg E, Soderholm JD, Olaison G, Tysk C, Jarnerot G (1995). Intestinal permeability to polyethylene glycols in monozygotic twins with Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **30**(8): 780-783.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, *et al.* (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**(6438): 626-632.

Lowe AM, Roy PO, M BP, Michel P, Bitton A, St-Onge L, *et al.* (2009). Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflammatory bowel diseases* **15**(3): 429-435.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**(1): 265-275.

Lubec G (1996). The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *J Investig Med* **44**(6): 324-346.

Lugering A, Schmidt M, Lugering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T (2001). Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* **121**(5): 1145-1157.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(21): 11853-11858.

Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings* **81**(11): 1462-1471.

Maianski NA, Roos D, Kuijpers TW (2003). Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood* **101**(5): 1987-1995.

- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *The Journal of biological chemistry* **273**(21): 13245-13254.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, *et al.* (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **351**(20): 2069-2079.
- Maor I, Rainis T, Lanir A, Lavy A (2008). Oxidative stress, inflammation and neutrophil superoxide release in patients with Crohn's disease: distinction between active and non-active disease. *Digestive diseases and sciences* **53**(8): 2208-2214.
- Mariani P, Bachetoni A, D'Alessandro M, Lomanto D, Mazzocchi P, Speranza V (2000). Effector Th-1 cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* **45**(10): 2029-2035.
- Marklund SL (2002). Extracellular superoxide dismutase. *Methods in enzymology* **349**: 74-80.
- Marklund SL (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* **222**(3): 649-655.
- Marklund SL (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24): 7634-7638.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **126**(1): 41-51.
- Martinou JC (1999). Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* **399**(6735): 411-412.
- Masaki H, Okano Y, Sakurai H (1998). Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Archives of dermatological research* **290**(3): 113-118.
- Matsunaga T, Seger R, Hoger P, Tiefenauer L, Hitzig WH (1985). Congenital acatalasemia: a study of neutrophil functions after provocation with hydrogen peroxide. *Pediatric research* **19**(11): 1187-1190.
- Matteucci E, Giampietro O (2008). Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. *Current medicinal chemistry* **15**(6): 596-603.
- Maunder RG (2005). Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. *Inflammatory bowel diseases* **11**(6): 600-608.

- Maunder RG, Levenstein S (2008). The role of stress in the development and clinical course of inflammatory bowel disease: epidemiological evidence. *Curr Mol Med* **8**(4): 247-252.
- Mawdsley JE, Rampton DS (2006). The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. *Neuroimmunomodulation* **13**(5-6): 327-336.
- May GR, Sutherland LR, Meddings JB (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* **104**(6): 1627-1632.
- Mayberry JF, Rhodes J (1984). Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature. *Gut* **25**(8): 886-899.
- Mayer L (2010). Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J Gastroenterol* **45**(1): 9-16.
- McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, *et al.* (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* **40**(9): 1107-1112.
- McCord JM (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical biochemistry* **26**(5): 351-357.
- McCord JM, Fridovich I (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry* **243**(21): 5753-5760.
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *The Journal of biological chemistry* **244**(22): 6049-6055.
- McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, *et al.* (2005). Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Human molecular genetics* **14**(10): 1245-1250.
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* **15**(1): 100-113.
- McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF (1996). Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* **98**(1): 136-141.
- McLaughlan JM, Seth R, Vautier G, Robins RA, Scott BB, Hawkey CJ, *et al.* (1997). Interleukin-8 and inducible nitric oxide synthase mRNA levels in inflammatory bowel disease at first presentation. *The Journal of pathology* **181**(1): 87-92.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**(7182): 1069-1075.

- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, *et al.* (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**(1): 46-54 e42; quiz e30.
- Monteleone I, Monteleone G, Fina D, Caruso R, Petruzzello C, Calabrese E, *et al.* (2006). A functional role of flip in conferring resistance of Crohn's disease lamina propria lymphocytes to FAS-mediated apoptosis. *Gastroenterology* **130**(2): 389-397.
- Moum B, Ekbom A (2002). Epidemiology of inflammatory bowel disease--methodological considerations. *Dig Liver Dis* **34**(5): 364-369.
- Moysan A, Marquis I, Gaboriau F, Santus R, Dubertret L, Morliere P (1993). Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* **100**(5): 692-698.
- Mueller S (2000). Sensitive and nonenzymatic measurement of hydrogen peroxide in biological systems. *Free Radic Biol Med* **29**(5): 410-415.
- Mulder TP, Verspaget HW, Janssens AR, de Bruin PA, Pena AS, Lamers CB (1991). Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* **32**(10): 1146-1150.
- Mulier B, Rahman I, Watchorn T, Donaldson K, MacNee W, Jeffery PK (1998). Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH). *Eur Respir J* **11**(2): 384-391.
- Nadif R, Mintz M, Jedlicka A, Bertrand JP, Kleeberger SR, Kauffmann F (2005). Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free radical research* **39**(12): 1345-1350.
- Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, *et al.* (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* **41**(2): 199-204.
- Nappi AJ, Vass E (1998). Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* **1380**(1): 55-63.
- Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, *et al.* (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol* **18**(5): 412-424.
- Nenoi M, Ichimura S, Mita K, Yukawa O, Cartwright IL (2001). Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer research* **61**(15): 5885-5894.
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(7): 3030-3034.

Niessner M, Volk BA (1995). Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clinical and experimental immunology* **101**(3): 428-435.

Nishino T (1994). The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem* **116**(1): 1-6.

O'Morain C, Smethurst P, Levi AJ, Peters TJ (1984). Organelle pathology in ulcerative and Crohn's colitis with special reference to the lysosomal alterations. *Gut* **25**(5): 455-459.

Ogata M, Wang DH, Ogino K (2008). Mammalian acatalasemia: the perspectives of bioinformatics and genetic toxicology. *Acta medica Okayama* **62**(6): 345-361.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, *et al.* (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**(6837): 603-606.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* **276**(7): 4812-4818.

Olsen I, Tollefsen S, Aagaard C, Reitan LJ, Bannantine JP, Andersen P, *et al.* (2009). Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PloS one* **4**(5): e5641.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* **324**(2): 84-88.

Oshitani N, Watanabe K, Nakamura S, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T (2005). Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *Int J Mol Med* **15**(3): 407-410.

Oury TD, Chang LY, Marklund SL, Day BJ, Crapo JD (1994). Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. *Lab Invest* **70**(6): 889-898.

Oury TD, Day BJ, Crapo JD (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* **75**(5): 617-636.

Packer MA, Porteous CM, Murphy MP (1996). Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochemistry and molecular biology international* **40**(3): 527-534.

Packey CD, Sartor RB (2008). Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Journal of internal medicine* **263**(6): 597-606.

Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **70**(1): 158-169.

Pajares JM, Gisbert JP (2001). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* **93**(1): 9-20.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, *et al.* (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics* **39**(7): 830-832.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, *et al.* (2002). Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* **33**(3): 311-322.

Pearson M, Teahon K, Levi AJ, Bjarnason I (1993). Food intolerance and Crohn's disease. *Gut* **34**(6): 783-787.

Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoois Y, Verbeke G, *et al.* (1997). Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* **113**(3): 802-807.

Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, *et al.* (1996). Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* **111**(3): 597-603.

Pelli MA, Trovarelli G, Capodicasa E, De Medio GE, Bassotti G (1999). Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum* **42**(1): 71-76.

Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, Canela A, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Puyol M, *et al.* (2008). Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic Biol Med* **45**(9): 1243-1251.

Philpot RM (1991). Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Methods in enzymology* **206**: 623-631.

Picardo M, Grammatico P, Roccella F, Roccella M, Grandinetti M, Del Porto G, *et al.* (1996). Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *The Journal of investigative dermatology* **107**(3): 322-326.

Picco MF, Goodman S, Reed J, Bayless TM (2001). Methodologic pitfalls in the determination of genetic anticipation: the case of Crohn disease. *Annals of internal medicine* **134**(12): 1124-1129.

Pierce ES (2009). Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in patients with Crohn's disease? *PLoS pathogens* **5**(3): e1000234.

- Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio KO, Kinnula VL (2000). Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *American journal of physiology* **278**(1): C118-125.
- Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, Lacki JK, Jagodzinski PP (2010). CD24 Ala57Val gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens* **75**(6): 696-700.
- Podolsky DK (2002). Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* **347**(6): 417-429.
- Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Kozhuhov MA, Panfilov VI (2009). Tobacco smoking, fruit and vegetable intake modify association between -21A>T polymorphism of catalase gene and risk of bronchial asthma. *J Asthma* **46**(3): 217-224.
- Porras AG, Olson JS, Palmer G (1981). The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen. Kinetics of peroxide and superoxide formation. *The Journal of biological chemistry* **256**(17): 9006-9103.
- Quinn MT, Gauss KA (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* **76**(4): 760-781.
- Rachmilewitz D (2008). Increased colonic nitric oxide level in active IBD. *Scandinavian journal of gastroenterology* **43**(5): 638.
- Rachmilewitz D, Eliakim R, Ackerman Z, Karmeli F (1998). Direct determination of colonic nitric oxide level--a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* **93**(3): 409-412.
- Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK (1995). Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **36**(5): 718-723.
- Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C (2002). The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**(7): 2091-2092.
- Rampton D (2009). Does stress influence inflammatory bowel disease? The clinical data. *Dig Dis* **27 Suppl 1**: 76-79.
- Reimund JM, Hirth C, Koehl C, Baumann R, Duclos B (2000). Antioxidant and immune status in active Crohn's disease. A possible relationship. *Clin Nutr* **19**(1): 43-48.
- Reinisch W, Miehsler W, Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Lichtenberger C, et al. (2003). An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **17**(11): 1371-1380.

Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS (2000). Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *The Journal of biological chemistry* **275**(42): 32460-32466.

Restivo NL, Srivastava MD, Schafer IA, Hoppel CL (2004). Mitochondrial dysfunction in a patient with crohn disease: possible role in pathogenesis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **38**(5): 534-538.

Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, *et al.* (2006). Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1091**: 110-122.

Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Digestive diseases and sciences* **52**(9): 2015-2021.

Rock CL, Jacob RA, Bowen PE (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* **96**(7): 693-702; quiz 703-694.

Rodriguez AM, Carrico PM, Mazurkiewicz JE, Melendez JA (2000). Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H(2)O(2). *Free Radic Biol Med* **29**(9): 801-813.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, *et al.* (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**(6415): 59-62.

Rowley DA, Halliwell B (1983). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanisms: relevance to the pathology of rheumatoid disease. *Clin Sci (Lond)* **64**(6): 649-653.

Rubin DT, Hanauer SB (2000). Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**(8): 855-862.

Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MR (2004). Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *American journal of surgery* **187**(2): 219-225.

Salim SY, Soderholm JD Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* **17**(1): 362-381.

Sanchez-Alcazar JA, Ruiz-Cabello J, Hernandez-Munoz I, Pobre PS, de la Torre P, Siles-Rivas E, *et al.* (1997). Tumor necrosis factor-alpha increases ATP content in metabolically inhibited L929 cells preceding cell death. *The Journal of biological chemistry* **272**(48): 30167-30177.

Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL (1994). 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *The Journal of biological chemistry* **269**(29): 19163-19166.

Saro Gismera C, Riestra Menendez S, Milla Crespo A, Sanchez Fernandez R, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, *et al.* (2003). [Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease. Asturian study in 5 areas (EIICEA). Spain]. *An Med Interna* **20**(1): 3-9.

Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, *et al.* (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *The American journal of physiology* **263**(5 Pt 2): R992-995.

Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H (1992). Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Molecular and cellular biology* **12**(6): 2525-2533.

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, *et al.* (1996). Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nature genetics* **14**(2): 199-202.

Sawyer DT (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O₂, O₂⁻, HOO[·], HOOH, and HOO⁻) and monooxygen species (O, O⁻, ·OH, and -OH) in water and aprotic solvents. *Basic life sciences* **49**: 11-20.

Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* **76**(1 Pt 1): 469-477.

Scivittaro V, Boggs S, Mohr S, Lapetina EG (1997). Peroxynitrite protects RAW 264.7 macrophage from Lipopolysaccharide/Interferon-gamma-induced cell death. *Biochemical and biophysical research communications* **241**(1): 37-42.

Schallreuter KU, Wood JM, Berger J (1991). Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *The Journal of investigative dermatology* **97**(6): 1081-1085.

Schoultz I, Soderholm JD, McKay DM (2011). Is metabolic stress a common denominator in inflammatory bowel disease? *Inflammatory bowel diseases* **17**(9): 2008-2018.

Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, *et al.* (2002). Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **51**(3): 379-385.

Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *The Journal of biological chemistry* **267**(8): 5317-5323.

- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003). Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annual review of pharmacology and toxicology* **43**: 285-307.
- Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, Urban G, Durkin M, Winship D, *et al.* (1993). Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* **34**(9): 1191-1197.
- Sedghi S, Keshavarzian A, Klamut M, Eiznhamer D, Zarling EJ (1994). Elevated breath ethane levels in active ulcerative colitis: evidence for excessive lipid peroxidation. *The American journal of gastroenterology* **89**(12): 2217-2221.
- Selley ML (1997). Determination of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal in clinical samples by gas chromatography--negative-ion chemical ionisation mass spectrometry of the O-pentafluorobenzyl oxime. *Journal of chromatography* **691**(2): 263-268.
- Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN (2011). Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* **106**(12): 2133-2142.
- Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(24): 9697-9701.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications* **226**(2): 561-565.
- Sicilia B, Lopez Miguel C, Arribas F, Lopez Zaborras J, Sierra E, Gomollon F (2001). Environmental risk factors and Crohn's disease: a population-based, case-control study in Spain. *Dig Liver Dis* **33**(9): 762-767.
- Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, Vayssiere JL (1998). TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* **17**(13): 1639-1651.
- Sies H, Krinsky NI (1995a). The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. *The American journal of clinical nutrition* **62**(6 Suppl): 1299S-1300S.
- Sies H, Stahl W (1995b). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition* **62**(6 Suppl): 1315S-1321S.
- Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RN, Blake DR, Rampton DS (1992). Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **103**(1): 186-196.

Singer, II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, *et al.* (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **111**(4): 871-885.

Skipper L, Li Y, Bonnard C, Pavanni R, Yih Y, Chua E, *et al.* (2005). Comprehensive evaluation of common genetic variation within LRRK2 reveals evidence for association with sporadic Parkinson's disease. *Human molecular genetics* **14**(23): 3549-3556.

Sobkowiak A, Lianeri M, Wudarski M, Lacki JK, Jagodzinski PP (2008). Manganese superoxide dismutase Ala-9Val mitochondrial targeting sequence polymorphism in systemic lupus erythematosus in Poland. *Clin Rheumatol* **27**(7): 827-831.

Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, *et al.* (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* **50**(3): 307-313.

Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, *et al.* (1999). Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* **117**(1): 65-72.

Song JJ, Lee YJ (2003). Catalase, but not MnSOD, inhibits glucose deprivation-activated ASK1-MEK-MAPK signal transduction pathway and prevents relocalization of Daxx: hydrogen peroxide as a major second messenger of metabolic oxidative stress. *Journal of cellular biochemistry* **90**(2): 304-314.

Sprent J, Tough DF (2001). T cell death and memory. *Science (New York, N.Y)* **293**(5528): 245-248.

Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA (1992). Protein modification in aging. *Exs* **62**: 64-72.

Stirpe F, Della Corte E (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *The Journal of biological chemistry* **244**(14): 3855-3863.

Stoehlmacher J, Ingles SA, Park DJ, Zhang W, Lenz HJ (2002). The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* **9**(2): 235-238.

Stohs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**(2): 321-336.

Sturm A, Leite AZ, Danese S, Krivacic KA, West GA, Mohr S, *et al.* (2004). Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**(11): 1624-1631.

Sturniolo GC, Mestriner C, Lecis PE, D'Odorico A, Venturi C, Irato P, *et al.* (1998). Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* **33**(6): 644-649.

Sutton A, Nahon P, Pessayre D, Rufat P, Poire A, Ziol M, *et al.* (2006). Genetic polymorphisms in antioxidant enzymes modulate hepatic iron accumulation and hepatocellular carcinoma development in patients with alcohol-induced cirrhosis. *Cancer research* **66**(5): 2844-2852.

Tamura S, Toriumi S, Saito J, Awano K, Kudo TA, Kobayashi T (2006). PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Sci* **97**(7): 563-567.

Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of cell biology* **141**(6): 1423-1432.

Tatton WG, Olanow CW (1999). Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1410**(2): 195-213.

Taysi S, Gul M, Sari RA, Akcay F, Bakan N (2002). Serum oxidant/antioxidant status of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med* **40**(7): 684-688.

ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**(2): 206-211.

Tham DM, Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ (1998). Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *The American journal of physiology* **275**(6 Pt 1): G1463-1471.

Thomas AG, Miller V, Shenkin A, Fell GS, Taylor F (1994). Selenium and glutathione peroxidase status in paediatric health and gastrointestinal disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **19**(2): 213-219.

Thompson AI, Lees CW (2011). Genetics of ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* **17**(3): 831-848.

Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ (1996). Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ (Clinical research ed)* **312**(7023): 95-96.

Timmer A, Sutherland LR, Martin F (1998). Oral contraceptive use and smoking are risk factors for relapse in Crohn's disease. The Canadian Mesalamine for Remission of Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* **114**(6): 1143-1150.

Togashi H, Shinzawa H, Matsuo T, Takeda Y, Takahashi T, Aoyama M, *et al.* (2000). Analysis of hepatic oxidative stress status by electron spin resonance spectroscopy and imaging. *Free Radic Biol Med* **28**(6): 846-853.

Tolbert NE, Essner E (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *The Journal of cell biology* **91**(3 Pt 2): 271s-283s.

Tome ME, Baker AF, Powis G, Payne CM, Briehl MM (2001). Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth. *Cancer research* **61**(6): 2766-2773.

Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ, 3rd, *et al.* (2010). Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(21): 9879-9884.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, *et al.* (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology* **11**(1): 55-62.

Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, *et al.* (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55 Suppl 1**: i16-35.

Tucker TG, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MW (2012). Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem Pharmacol* **83**(2): 279-285.

Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**(Pt 2): 335-344.

Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports* **17**(1): 3-8.

Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, *et al.* (2002). Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical biochemistry* **35**(7): 569-572.

van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, *et al.* (1995). Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* **109**(1): 129-135.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**(7): RESEARCH0034.

Venkataraman P, Muthuvel R, Krishnamoorthy G, Arunkumar A, Sridhar M, Srinivasan N, *et al.* (2007). PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology* **28**(3): 490-498.

Vermeire S, Rutgeerts P (2005). Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes and immunity* **6**(8): 637-645.

Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, *et al.* (2004). Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* **53**(7): 980-986.

Verspaget HW, Pena AS, Weterman IT, Lamers CB (1988). Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut* **29**(2): 223-228.

Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, *et al.* (2006). Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* **116**(12): 3195-3203.

Wang CC, Chiang YM, Sung SC, Hsu YL, Chang JK, Kuo PL (2008). Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells. *Cancer letters* **259**(1): 82-98.

Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American journal of pathology* **166**(2): 409-419.

Wang L, Yang JK, Kabaleeswaran V, Rice AJ, Cruz AC, Park AY, *et al.* (2010). The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol* **17**(11): 1324-1329.

Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, *et al.* (2009). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer* **45**(16): 2874-2881.

Warchol T, Lianeri M, Wudarski M, Lacki JK, Jagodzinski PP (2008). Catalase - 262C>T polymorphism in systemic lupus erythematosus in Poland. *Rheumatol Int* **28**(10): 1035-1039.

Weiss SJ (1989). Tissue destruction by neutrophils. *The New England journal of medicine* **320**(6): 365-376.

Wendland BE, Aghdassi E, Tam C, Carrrier J, Steinhart AH, Wolman SL, *et al.* (2001). Lipid peroxidation and plasma antioxidant micronutrients in Crohn disease. *The American journal of clinical nutrition* **74**(2): 259-264.

Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, *et al.* (2008). Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* **112**(5): 1037-1042.

White MJ, Heckler FR (1990). Oxygen free radicals and wound healing. *Clinics in plastic surgery* **17**(3): 473-484.

Wiener HW, Perry RT, Chen Z, Harrell LE, Go RC (2007). A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* **6**(8): 770-775.

Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB (1995). Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicology letters* **82-83**: 221-226.

Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, *et al.* (2007). Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflammatory bowel diseases* **13**(7): 807-821.

Xavier RJ, Podolsky DK (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**(7152): 427-434.

Xia Y, Zweier JL (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(13): 6954-6958.

Xie J, Itzkowitz SH (2008). Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**(3): 378-389.

Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF (2007). Systemic effects of smoking. *Chest* **131**(5): 1557-1566.

Yano S, Yano N (2002). Regulation of catalase enzyme activity by cell signaling molecules. *Molecular and cellular biochemistry* **240**(1-2): 119-130.

Yasmineh WG, Parkin JL, Caspers JI, Theologides A (1991). Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer research* **51**(15): 3990-3995.

Ye D, Ma I, Ma TY (2006). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(3): G496-504.

Ye X, Kim WS, Rubakhin SS, Sweedler JV (2004). Measurement of nitric oxide by 4,5-diaminofluorescein without interferences. *The Analyst* **129**(12): 1200-1205.

Yim MB, Chock PB, Stadtman ER (1990). Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(13): 5006-5010.

Yoo JH, Erzurum SC, Hay JG, Lemarchand P, Crystal RG (1994). Vulnerability of the human airway epithelium to hyperoxia. Constitutive expression of the catalase gene in human bronchial epithelial cells despite oxidant stress. *The Journal of clinical investigation* **93**(1): 297-302.

Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, *et al.* (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**(1): 61-72.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**(3): 337-349.

Zhang W, Zheng S, Storz P, Min W (2005). Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H₂O₂ but not tumor necrosis factor. *The Journal of biological chemistry* **280**(19): 19036-19044.

Zhang XJ, Thompson JH, Mannick EE, Correa P, Miller MJ (1998). Localization of inducible nitric oxide synthase mRNA in inflamed gastrointestinal mucosa by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Nitric Oxide* **2**(3): 187-192.

9. DOCUMENTOS ADJUNTOS

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la financiación pública recibida por el Instituto de Salud Carlos III:

- Contrato para formación en Investigación para profesionales post-formación sanitaria especializada “Río Ortega”, por el Instituto de Salud Carlos III (CM07/00133). Caracterización y Manipulación Farmacológica y Genética de la Enzima Catalasa como opción terapéutica en la Enfermedad de Crohn. Disfrutado por la Dra Iborra
- FIS: “Análisis proteico, genético farmacológico de la catalasa y otros enzimas antioxidantes en la enfermedad de crohn: impacto terapéutico”. (PI09/01827): Investigador principal: Dra. Beltrán
- FIS: Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la manipulación de la función mitocondrial, estrés oxidativo y apoptosis celular (FIS 06/0730).

Los resultados del trabajo de la presente Tesis Doctoral se han presentado en forma de comunicaciones a diferentes congresos nacionales e internacionales de Gastroenterología y Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Además parte de los resultados han sido publicados ya en forma de artículos científicos tal y como se muestra a continuación:

Comunicaciones a Congresos Nacionales:

IX Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2006).

- B. Beltrán, P. Nos, F. Dasí, **M. Iborra**, G. Bastida, M. Aguas, V. Ortiz y J. Ponce. Caracterización de radicales libres de oxígeno, óxido nítrico y actividades enzimáticas antioxidantes en las células mononucleares sanguíneas de los pacientes con enfermedad de Crohn en el momento del diagnóstico. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29 (supl.3):153-213.

X Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2007).

- P. Nos, B. Beltrán, F. Dasí, **M. Iborra**, I. Conde, M. Aguas, G. Bastida, V. Garrigues, J. Ponce. Inhibición de la enzima catalasa y daño oxidativo persistentes en las células mononucleares de los pacientes con enfermedad de Crohn: Implicaciones en la fisiopatología. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30 (supl.3):139-206.

XI Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2008).

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Bastida, G., Dasí, F., Moret, I., Ponce, J. Detección cuantitativa de mRNA de citoquinas en la Enfermedad de Crohn (EC) de debut y patrones diferenciales en actividad, remisión clínica y curación mucosa. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 (3):133-205. *Comunicación Oral.*

- Nos, P., Beltrán, B., **Iborra, M.**, Bastida, G., Dasí, F., Aguas, M., Ponce, J. Detección cuantitativa de mRNA de citoquinas en la Colitis ulcerosa (CU) de debut y patrones diferenciales en actividad, remisión clínica y curación mucosa. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 (3):133-205.

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Moret, I., Guillem, P., Bastida, G., Ponce, J. Expresión de TNF-alfa en diferentes estadios de actividad de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII): análisis de subgrupos con diferentes concentraciones de TNF-alfa. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 (3):133-205.

- Beltrán, B., **Iborra, M.**, Nos, P., Bastida, G., Dasí, F., Moret, I., Aguas, M., Ponce, J. Perfil diferencial de las IL-2 e IF- γ entre la Enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) con relación a la actividad de la enfermedad: implicaciones para la eficacia de los fármacos. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 (3):133-205.

XII Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2009).

- B. Beltrán, **M. Iborra**, I. Moret, JL. García, F. Rausell, F. Pallardó, J. Ponce, P. Nos P. Inhibición permanente de la catalasa por menor expresión proteica en células mononucleares de sangre periférica en la enfermedad de Crohn naïve y tratada. *Gastroenterol Hepatol*.2009;32(3):218.

- B. Beltrán, I. Moret, M. **Iborra**, G. Bastida, F. Rausell, J. Ponce, P. Nos P. Resistencia a la apoptosis en linfocitos T en sangre periférica en pacientes con enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol*.2009;32(3):225.

XIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2010).

- Beltrán B, **Iborra M**, Rausell F, Moret I, Busó E, Bastida G, García-Eliz M, Ponce J, Nos P. Disminución de la expresión del gen de la catalasa como responsable de la inhibición permanente de su actividad enzimática en leucocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* 2010;33(3):213. *Comunicación oral.*

XIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2011).

- **M. Iborra**, F. Rausell, E. Buso, I. Moret, G. Bastida, L. Tortosa, M. Aguas, P. Nos, B. Beltrán. El polimorfismo del gen de la catalasa rs1001179 puede explicar la inhibición de la expresión de la CAT en pacientes con Enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* 2011, 34(3); 207-208; P45.

- **Marisa Iborra**, Francesca Bernuzzi, Belén Beltrán, Antonino Spinelli, Pilar Nos, Pietro Invernizzi, Silvio Danese. Identificación de patrones de expresión de micro-RNA en suero y mucosa de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal en diferentes estadios de la enfermedad. *Gastroenterol Hepatol* 2011, 34(3); 183. *Comunicación oral*.

- Moret I, Rausell F, **Iborra M**, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, Nos P and Beltran B. La resistencia a la apoptosis de los linfocitos T de sangre periférica en la enfermedad de Crohn (EC) depende de la inhibición de la actividad catalasa. *Gastroenterol Hepatol* 2011, 34(3); 183. *Comunicación oral*.

XV Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid (Marzo 2012).

- **M. Iborra**, I. Moret, E. Buso, F. Rausell, G. Bastida, M. Aguas, L. Tortosa, E. Cerrillo, P. Nos, B. Beltrán. Regulación diferencial de genes relacionados con el estrés oxidativo y la apoptosis en pacientes activos e inactivos de enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol* 2012, 35(3); 149. *Comunicación oral*.

Comunicaciones a Congresos Internacionales:

107th Meeting of the American Gastroenterology Association. Los Angeles (May 2006).

- Beltrán, B., Nos, P., Dasí, F., **Iborra, M.**, Bastida, G., Aguas, M., Ortíz, V., Ponce, J. Characterization of reactive oxygen species production (ROS) and activity of antioxidant enzymes in peripheral white mononuclear cells (PWMC) from patients with Crohn Disease (CD) at onset. *Gastroenterol* 2006; 130-4 (suppl 2): A 360.

108th Meeting of the American Gastroenterology Association. Washington DC (May 2007).

- Beltrán, B., Nos, P., Dasí, F., **Iborra, M.**, Conde, I., Bastida, G., Garrigues, V., Ponce, J. Persistent oxidative stress damage and inhibition of Catalase (CAT) in peripheral white mononuclear cells (PWMC) of patients with Crohn's Disease (CD): Implications in physiopathology. *Gastroenterol* 2007; 132-4 (suppl 2): A 240.

"3rd Congress of ECCO - The European Crohn's and Colitis Organisation Inflammatory Bowel Disease 2008". Lyon, France (February 2008).

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Bastida, G., Dasí, F., Moret, I., Ponce, J. Quantitative measurement of cytokine mRNA in Crohn's Disease at onset and differential patterns in activity, clinical remission or endoscopic remission. *J Crohns Colitis* 2008; 2 (1); S89, P287.

- Nos, Pilar; Beltran, Belen; **Iborra, Marisa**; Bastida, Guillermo; Dasi, Francisco J.; Aguas, Mariam; Ponce, Julio. Quantitative measurement of cytokine mRNA at onset of Ulcerative Colitis (UC) and differential patterns in activity, clinical remission and mucosa healing. *J Crohns Colitis* 2008; 2 (1); S89-90: P288.

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Bastida, G., Dasí, F., Moret, I., Ponce, J. Differential IL-2 and IF- γ profiles in Crohns disease (CD) and Ulcerative colitis (UC) in relation to disease activity : implications for the efficacy of drugs. *J Crohns Colitis* 2008; 2 (1); S91: P294.

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Moret, I., Guillem, P., Bastida, G., Ponce, J. Profile of TNF- α expression at different stages of inflammatory bowel disease

(IBD) activity: Analysis of subgroups of patients with different TNF- α concentration. J Crohns Colitis 2008; 2 (1); S91-92: P295.

109th Meeting of the American Gastroenterology Association. San Diego California (May 2008).

- Beltrán, B., Nos, P., **Iborra, M.**, Bastida, G., Dasí, F., Moret, I., Ponce, J. Quantitative measurement of cytokine mRNA at onset of Crohn's Disease and differential patterns in activity, clinical remission and mucosa healing. Gastroenterol 2008; 134 (suppl 1): A-649.

"4rd Congress of ECCO - The European Crohn's and Colitis Organisation Inflammatory Bowel Disease 2009". Hamburgo. Alemania (February 2009).

- **Iborra, M.**, Nos, P., Moret, I., García J. L., Bastida, G., Rausell, F., Pallardo, F., Ponce, J., Beltran, B. Permanent catalase activity impairment due to minor expression of catalase protein in peripheral white mononuclear cells of patients with naïve and treated Crohn's Disease. J Crohns Colitis 2009; 3(1); S128: P298.

110th Meeting of the American Gastroenterology Association. Chicago (June 2009).

- Beltran, Belen; Moret, Ines; **Iborra, Marisa**; Bastida, Guillermo; Rausell, Francisco; Ponce, Julio; Nos, Pilar. Resistance to apoptosis in immune cells from Crohns Disease patients is already evident in peripheral non-activated T-Lymphocytes when they are activated and exposed to agonist Fas antibody in vitro. Gastroenterol 2009; 136 (5) (Suppl 1): 147-339 (S1688).

- Beltran, Belen; **Iborra, Marisa**; Moret, Ines; Garcia Gimenez, Jose Luis; Bastida, Guillermo; Rausell, Francisco; Pallardo, Federico; Ponce, Julio; Nos, Pilar. Permanent impairment of catalase activity due to a minor expression of catalase protein in peripheral white mononuclear cells (PWMC) of patients with naïve and treated Crohns Disease (CD). Gastroenterol 2009; 136 (5) (Suppl 1): 147-339 (T1696).

- Beltran, Belen; Moret, Ines; **Iborra, Marisa**; Dasi, Francisco; Bastida, Guillermo; Ponce, Julio; Nos, Pilar. Quantitative measurement of cytokine

mRNA at onset Ulcerative Colitis (UC) and differential patterns in activity, clinical remission and mucosa healing. *Gastroenterol* 2009; 136 (5) (Suppl 1):147-339 (S1744).

- Belen Beltran, Francisco Dasi, Ines Moret, Guillermo Bastida, **Marisa Iborra**, Mariam Aguas, Francisco Rausell, Julio Ponce, Pilar Nos. Differential IL-2 and IF- γ profiles in Crohns disease and Ulcerative Colitis in relation to disease activity: implications for drugs efficacy. *Gastroenterol* 2009; 136 (5) (Suppl 1): 147-339 (S1739).

17th United European Gastroenterology Week. London (November 2009).

20. B. Beltran, I. Moret , **M. Iborra**, G. Bastida, F. Rausell, J. Ponce, P. Nos. Peripheral T-Lymphocytes from naïve Crohn disease patients are resistant to agonist Fas antibody mediated apoptosis.

Inflammation 2010. Inflammatory cell signaling mechanisms as therapeutic targets. Luxembourg (2010).

- Beltran, Belen; **Iborra, Marisa**; Rausell, Francisco; Moret, Ines; Buso, Enrique; Bastida, Guillermo; Garcia-Eliz, Maria; Ponce, Julio; Nos, Pilar. Permanent Inhibition Of Catalase Activity in Peripheral White Mononuclear Cells of naïve Crohn's Disease Patients Depends On A Down Regulation Of Cat-gene Expression. (P: I, 2)

- B. Beltrán, I. Moret, F. Rausell, **M. Iborra**, G. Bastida, Jr.1, J. Ponce, P. Nos. Resistance To Apoptosis Mediated By Agonist Fas Antibody In Peripheral T-lymphocytes From Crohn'S Disease Patients At Onset. (P: VII, 3).

"5th Congress of ECCO - The European Crohn's and Colitis Organisation Inflammatory Bowel Disease 2010". Praga (February 2010).

- **M. Iborra**, P. Nos, F. Rausell, E. Buso, I. Moret, G. Bastida, M. Garcia-Eliz, J. Ponce, B. Beltan. The Inhibition Of Catalase Activity Of Peripheral White Mononuclear Cells In naïve Crohn's Disease Patients Depends On A Down Regulation Of Cat-gene Expression. *J Crohns Colitis* 2010; P034.

- B. Beltrán, I. Moret, F. Rausell, **M. Iborra**, G. Bastida, Jr.1, M. García-Eliz, J. Ponce, P. Nos. Resistance To Apoptosis Mediated By Agonist Fas Antibody In

Peripheral T-lymphocytes From Crohn's Disease Patients At Onset. J Crohns Colitis 2010. P016.

111th Meeting of the American Gastroenterology Association. Digestive Disease Week. New Orleans, Louisiana (may 2010).

- Beltran, Belen; **Iborra, Marisa**; Rausell, Francisco; Moret, Ines; Buso, Enrique; Bastida, Guillermo; Garcia-Eliz, Maria; Ponce, Julio; Nos, Pilar. The permanent inhibition of catalase activity in peripheral white mononuclear cells of naïve Crohn's Disease patients depends on a down regulation of CAT-gene expression. Gastroenterol 2010.

"6th Congress of ECCO - The European Crohn's and Colitis Organisation Inflammatory Bowel Disease 2011". Dublin (February 2011).

- **M. Iborra**, F. Rausell, E. Buso, I. Moret, G. Bastida, L. Tortosa, M. Aguas, P. Nos, B. Beltrán. Rs1001179 CAT gene polymorphism could explain the inhibition of CAT expression in CD patients. J Crohns Colitis 2011. S-415

- Belen Beltran, Ines Moret, Francisco Rausell, **Marisa Iborra**, Guillermo Bastida, Mariam Aguas, Luis Tortosa, Pilar Nos. Resistance to Fas-apoptosis of peripheral T-cells from Crohn's disease patients depends on the regulation that catalase exerts on the apoptotic pathways. J Crohns Colitis 2011. P016.

The Molecular biology of inflammatory bowel diseases. University of Durham, UK. March 2011.

- **Iborra M**, Moret I, Rausell F, Tortosa L, Cerrillo E, Bastida G, Aguas M, Nos P, Beltran B. The permanent inhibition of catalase activity in peripheral white mononuclear cells of naïve Crohn's Disease patients depends on a down regulation of CAT-gene expression. *Comunicación oral.*

XII Congreso Sociedad Ibérica Citometría. Bilbao (May 2011).

- Moret I, Rausell F, **Iborra M**, Cerrillo E, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, Nos P, Beltran B. Reactive oxygen species production and apoptosis resistance depend on catalase inhibition in T lymphocytes from Crohn's disease

112th Meeting of the American Gastroenterology Association. Digestive Disease Week. Chicago (may 2011).

- **Marisa Iborra**, Francesca Bernuzzi, Belen Beltran, Antonino Spinelli, Pietro Invernizzi, Silvio Danese. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of the Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011; 140(5) Suppl 1: S1289.

19th United European Gastroenterology Week. Stockholm (October 2011).

- **Marisa Iborra**, Ines Moret, Francisco Rausell, Luis Tortosa, Elena Cerrillo, Guillermo Bastida, Mariam Aguas, Pilar Nos, Belen Beltran. Permanent inhibition of catalase and altered expression of different genes in Crohn's disease patients at onset and in long lasting remission. *Gut* 2011; 60 (Suppl 3) A 183.

7th Congress of ECCO - The European Crohn's and Colitis Organisation Inflammatory Bowel Disease 2012". Barcelona (Febrero 2012).

- **Iborra M**, Moret I, Rausell F, Buso E, Cerrillo E, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, Nos P, Beltrán B. Different genetic expression profiles of oxidative stress and apoptosis related genes in active and inactive Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2012; 6(1); S187, P449.

113th Meeting of the American Gastroenterology Association. Digestive Disease Week. San Diego (may 2012).

- Moret I, Rausell F, **Iborra M**, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, Nos P, Beltrán B. Apoptosis resistance of Crohn's disease blood T-cells depends on catalase activity inhibition. *Gastroenterology* 2012; 142(5): S885 (Tu1951).

- **Iborra M**, Moret I, Buso E, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Tortosa L, Cerrillo E, Nos P, Beltrán B. Differential regulation of oxidative stress and apoptosis related genes during active and inactive Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2012; 142(5): S877 (Tu1913).

Artículos científicos:

- Beltran, B., Nos, P., Dasí, F., **Iborra M.**, Bastida G., Martinez, M., O'Connor, E., Saez, G., Moret, I., Ponce, J. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage and catalase inhibition in naïve and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Jan;16(1):76-86.
- **Iborra M**, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, Nos P, Beltrán B. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem Soc Trans.* 2011;39 (4):1102-1106.
- **Iborra M**, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev.* 2012;11(5):305-14.
- **Iborra M**, Beltrán B, Nos P New knowledge in genetics and inflammatory bowel disease. Are there any practical applications? *Gastroenterol Hepatol.* 2011;34(9):591-8.

