
Facultat de Medicina



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Efecte i mecanismes d'acció de la superòxid dismutasa en
la malaltia inflamatòria intestinal experimental.**

**Tesi presentada per Joaquim Seguí i Montaner per optar al grau de Doctor en
Farmàcia**

Directors:

Dr. Julián Panés Díaz

Dr. Josep M^a Piqué Badia

Universitat de Barcelona

2006

AUTORITZACIO DEL DIRECTOR DE TESI

Julián Panés Díaz....., director de la Tesi Doctoral de Joaquim Seguí Montaner....., que porta com a títol *Efecte i mecanismes d'acció de la superòxid dismutasa en la malaltia inflamatòria intestinal experimental* , autoritza la seva presentació.

Signatura,

Barcelona, 2 de maig de 2006

AUTORITZACIO DEL DIRECTOR DE TESI

Josep Maria Piqué Badia....., director de la Tesi Doctoral de Joaquim Seguí Montaner....., que porta com a títol *Efecte i mecanismes d'acció de la superòxid dismutasa en la malaltia inflamatòria intestinal experimental* , autoritza la seva presentació.

Signatura,

Barcelona, 2 de maig de 2006

Als meus pares, a Laetitia

AGRAÏMENTS

És molt difícil mirar cap enrere i no trobar gent que t'ha ajudat i amb qui estàs agraït pel seu tracte, bona disposició, dedicació, amabilitat i estima. És molt complicat resumir els agraïments a la gent que t'ha ajudat durant tants anys.

Al Dr. Julià Panès pel temps dedicat a ensenyar-me el món de la ciència, per la seva dedicació, el seu tracte professional i humà. Per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta Tesi Doctoral.

Al Dr. Josep Maria Piqué per haver-me acollit com a membre del Servei de Gastroenterologia i fer possible la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

A tot el personal del Servei de Gastroenterologia: Antonio, Maite, Manuel, Jaime, Micky, Montse, Núria, Olga, Sandra, Maria, Francesc, Virgínia, Ignasi, Francisco, Toni, Salvador, Mercè, Faust. Als meus companys de laboratori durant la realització d'aquesta tesi: a Anna, Mireia, Olga, Meritxell Arenas, Meritxell Mollà, Jenny, Azucena i Ismael. Una menció especial al Sergi, Fèlix i Meritxell Gironella pel recolzament que m'han proporcionat des del principi de la meva estada al Clínic i per l'amistat que espero que ens uneixi sempre.

Al personal de l'estabulari per la seua amabilitat durant tots aquests anys. Al personal de Medicina Nuclear: Nieves i el Dr. Piera, per haver la seva disposició i recolzament en permetre l'ús de les seues instal·lacions.

Als companys de la Fundació: la Sandra, Xavi, Lluís i Efi.

A la gent del CSIC: al Dani, Oriol, Anna, Maria, Emma, Txell i Leticia.

Al Dr. Von Andrian per haver-me permès la fer possible una estada de quatre mesos al seu laboratori a Boston i conèixer el món del postdoc als Estats Units. A Rodrigo i Bruce pel seu ajut al laboratori i a Cenk, Mark, Charo, César, Azucena i Joe pel seu ajut durant l'estada.

A la meua família: els meus pares Ximo i Celia per tot el que han fet per mi durant tots aquests anys, per la seua estima i comprensió. A les meues germanes Celia, Inma i Cristina. Als meus nebots Paula, Adrià i el que vé en camí; als meus cunyats i, per supost, a la meua gossa Lala.

A Laetitia per haver-me suportat durant aquests anys, per la seva estima i comprensió.

Als meus amics de la Universitat: Rosa, Moi, Anna, Marc, Merxe, Elia, Bea, Sílvia, Fernando i Raquel amb qui he passat molt bons moments durant els anys que vam passar junts a València. A les meues amigues de l'Erasmus a Bologna Patrizia i Antonella.

Als meus amics de Barcelona: Aitziber, Jordi, Eva, Guillem, Igor, Jordi, Núria i Eli que em van acollir a Barcelona i amb qui he passat molts bons moments durant aquests anys. Als meus amics valencians de Barcelona: Tona, Susana i Llorenç amb els que he compartit una llarga amistat tant en l'època d'estudiant a València com en aquests anys a Barcelona.

Als meus amics de Gandia, especialment a Blas, Esther, Tino, Alfonso i Isabel per l'amistat que ens ha unit durant tants anys.

Als meus companys de pis: David, Valerie, Volker, Christine i Laetitia. Quina feinada haver-me aguantat!

ABREVIATURES

MII	malaltia inflamatòria intestinal
MC	malaltia de Crohn
CU	colitis ulcerosa
MRO	metabòlits reactius d'oxigen
XO	xantina oxidasa
COX	ciclooxigenasa
NADPHox	NADPH oxidasa
O ₂ ⁻	anió superòxid
OH ⁻	anió hidroxil
H ₂ O ₂	peròxid d'hidrogen
HOCl	àcid hipoclorós
ONOO ⁻	anió peroxinitrat
SOD	superòxid dismutasa
GSH	glutatió peroxidasa
iNOS	òxid nítric sintasa induïble
NO	òxid nítric
CAM	molècula d'adhesió cel.lular
ICAM-1	molècula d'adhesió intercel.lular 1
ICAM-2	molècula d'adhesió intercel.lular 2
VCAM-1	molècula d'adhesió cel.lular vascular 1
MAdCAM-1	molècula d'adhesió cel.lular mucosa adressina 1
PECAM-1	molècula d'adhesió cel.lular endotelial plaquetària 1
SAA	proteïna sèrica amiloid A
IL	interleucina
LPO	hidroperoxidació lipídica
TNF- α	factor de necrosi tumoral- α
NF- κ B	factor nuclear kappa B
AP-1	proteïna d'activació-1
STAT	transductor de senyal i activador de transcripció
DSS	dextrà sulfat sòdic
TNBS	àcid trinitrobenzen sulfòxid
IL-10 ^{-/-}	“knockout” o deficiència en el gen IL-10

MPO	mieloperoxidasa
LPS	lipopolisacàrid
PBS	tampó salí fosfat
DAI	index d'activitat de la malaltia

ARTICLES INCLOSSOS:

1.- "Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine."

Joaquim Seguí, Meritxell Gironella, Miquel Sans, Susana Granell, Fèlix Gil, Mercedes Gimeno, Pilar Coronel, Josep Maria Piqué, Julián Panés.
J Leukoc Biol. 2004 Sep;76(3):537-44.

2.- "Downregulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis."

Joaquim Seguí, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Manuel Álvarez, Mercedes Gimeno, Pilar Coronel, Daniel Closa, Josep Maria Piqué, Julián Panés.
Inflamm Bowel Dis. 2005 Oct;11(10):872-882.

INDEX

1.- INTRODUCCIO	25
2.- CONCEPTES	29
2.1.- Metabòlits reactius d'oxigen	31
2.1.1.- Introducció	31
2.1.2.- Origen dels MRO	33
2.1.3.- Sistemes defensius antioxidants	37
-Sistemes defensius enzimàtics	38
-Sistemes defensius no enzimàtics	41
2.1.4.- Activitat tòxica dels MRO	42
-Dany directe sobre les macromolècules	42
-Dany indirecte: inflamació i dany tissular	43
-Alteració dels processos de regulació fisiològica mitjançats pels MRO	45
2.1.5.- Evidències de la participació dels MRO en la fisiopatologia de la MII	47
2.2.- Interaccions leucòcit endoteli: fenòmens de rodament, activació, adhesió i migració leucocitària	49

2.3.- Principals CAMs	51
2.3.1.- Selectines	51
2.3.2.- Llingands de les selectines	54
2.3.3- Immunoglobulines	54
2.3.4.- Integrines	57
2.3.5. - Evidències existents de la participació de les CAMs en la MII	59
-Les CAMs en la MII humana	59
-Les CAMs en la colitis experimental	60
2.3.6.- Regulació de l'expressió de les CAMs	61
-Les CAMs com a diana terapèutica	63
3.- METODOLOGIA	65
3.1.- Models experimentals de colitis	67
3.1.1.- Colitis induïda per TNBS en rata	67
3.1.2.- Colitis espontània en ratsolins deficients en IL-10	68
3.1.3.- Colitis induïda per DSS en ratolí	69

3.2.- Avaluació de les interaccions leucòcit-endoteli en la microcirculació colònica mitjançant microscopia intravital	70
3.3.- Quantificació de l'expressió endotelial de CAMs <i>in vivo</i> mitjançant la tècnica del doble anticòs marcat	72
4.- JUSTIFICACIÓ	77
4.1.- Justificació general	79
4.2.- Justificació de l'estudi 1	81
4.3.- Justificació de l'estudi 2	83
5.- MATERIALS I MÈTODES	85
5.1.- Material i mètodes de l'estudi 1	87
5.2.- Material i mètodes de l'estudi 2	97
6.- RESULTATS	95
6.1.- Resultats de l'estudi 1	97
6.2.- Resultats de l'estudi 2	101
7.- ARTICLES ORIGINALS	107
8.- DISCUSIO	109
9.- CONCLUSIONS	125
10.- BIBLIOGRAFIA	129

BEQUES

Els treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat efectuats amb el suport dels següents ajuts a la recerca:

- Beca Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (Setembre 2000- Agost 2005).
- Beca complementaria para la realización de estancias breves en centros de investigación en el extranjero (Març-Juliol 2004). Ministerio de Ciencia y Tecnología de España.
- Beca SAF2000/0057 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- Beca SAF2002/02211 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- Beca C03/02 del Instituto de Salud Carlos III.

COMUNICACIONS EN CONGRESSOS

Els resultats dels treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat presentats en els congressos que es relacionen a continuació:

1.- **Títol:** Valor terapèutic de la superòxido dismutasa (SOD) en la malaltia de Crohn experimental. (Oral)

Congrés: 12è congrés anual de la Societat Catalana de malalties digestives.

Lloc: Lleida

Data: Febrer 2003

2.- **Títol:** Efecto de la superòxido dismutasa (SOD) en la inflamación intestinal inducida por TNBS. (Poster)

Congreso: 6º congreso anual de la asociación española de gastroenterología.

Lugar: Madrid

Fecha: Març 2003

3.- **Títol:** La ciclosporina A disminuye la expresión de moléculas de adhesión endotelial en la colitis inducida por DSS. (Poster)

Congrés: 6º congreso anual de la asociación española de gastroenterología.

Lloc: Madrid

Data: Març 2003

4.- **Títol:** Treatment with superoxide dismutase reduces leukocyte recruitment and inflammatory damage in experimental colitis. (Poster)

Congrés: Digestive disease week (American Gastroenterological Association).

Lloc: Orlando (USA)

Data: Maig 2003

5.- **Títol:** Effects of an endothelial adhesion molecule expression inhibitor on experimental colitis. (Poster)

Congrés: 12th United European Gastroenterology Week

Lloc: Praga; República Txeca

Data: Setembre 2004

6.- **Títol:** El tractament amb antioxidants és eficaç en la colitis experimental crònica.

(Oral)

Congrés: 14è congrés anual de la societat catalana de malalties digestives.

Lloc: Roses (Girona)

Data: Gener 2005

7.- **Títol:** Efectes d'un inhibidor de molècules d'adhesió endotelial en la colitis experimental (Poster)

Congrés: 14è congrés anual de la societat catalana de malalties digestives.

Lloc: Roses (Girona)

Data: Gener 2005

8.- **Títol:** Valor terapéutico de la SOD en un modelo experimental de colitis. (Poster)

Congrés: 8º congreso anual de la asociación española de gastroenterología.

Lloc: Madrid

Data: Març 2005

9.- **Títol:** Efectos de un inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión en la colitis experimental (Poster)

Congrés: 8º congreso anual de la asociación española de gastroenterología.

Lloc: Madrid

Data: Març 2005

10.-**Títol:** SOD1 is effective in treatment of chronic experimental colitis (Poster)

Congrés: Digestive disease week (American Gastroenterological Association).

Lloc: Chicago (USA)

Data: Maig 2005

Data: Setembre 2005

11.-Títol: Superoxide dismutase 1 (SOD1) is an effective treatment in two models of experimental colitis (Poster)

Congrés: United European Gastroenterology Week (UEGW)

Lloc: Copenague; Dinamarca.

Data: Octubre 2005

1.- INTRODUCCIO

La resposta inflamatòria ocupa un lloc central en el conjunt de mecanismes de defensa de l'organisme front als agents externs, així com en els processos de reparació tissular. Tanmateix, en determinades circumstàncies es pot produir un trastorn en la regulació d'aquests mecanismes, causant lesió tissular i disfunció orgànica. Un exemple d'aquest fet el constitueix la malaltia inflamatòria intestinal (MII), en la qual l'excessiva activació d'aquests mecanismes defensius origina lesions intestinals per motius encara no ben coneguts.

La MII, que inclou la colitis ulcerosa (CU), la malaltia de Crohn (MC) i la colitis indeterminada, és una patologia relativament freqüent al nostre medi, amb una taxa global de incidència de 8 casos nous / 100.000 habitants / any per a la CU i de 5.5 casos nous / 100.000 habitants / any per a la MC. El fet que es tracti d'una malaltia crònica, amb debut sovint en les primeres dècades de la vida i una mortalitat pràcticament nul·la, fa que la prevalença de MII al nostre medi sigui superior als 250 casos / 100.000 habitants ¹. La MII afecta sovint a pacients joves, condicionant de forma molt important la seva qualitat de vida, donat el seu curs crònic i la seva evolució en brots. Clàssicament, el tractament d'aquestes malalties s'ha basat en l'ús d'aminosalicilats, esteròids i immunosupressors. No obstant, tan sols els dos darrers són eficaços en el tractament dels brots de intensitat moderada o greu, i el seu ús es pot associar a efectes adversos importants. A més, una proporció considerable de pacients amb brots greus no responen al tractament mèdic intens, requerint cirurgia pel control de la seva malaltia.

Per millorar els resultats aconseguits pel tractament de la MII cal un millor coneixement de la seva fisiopatologia i, per tant, dels mecanismes moleculars implicats en la resposta inflamatòria. Sols així es podran desenvolupar nous fàrmacs, específicament dirigits a modular algun dels determinants de la reacció inflamatòria intestinal. Aquests fàrmacs haurien d'aportar una major potència d'acció i s'haurien d'acompanyar d'una menor freqüència d'efectes indesitjables que els fàrmacs d'ús habitual, donada la seva major especificitat d'acció.

En la present Tesi Doctoral s'han estudiat alguns dels mecanismes moleculars implicats en la fisiopatologia de la colitis experimental i la MII humana. A grans trets, l'objectiu d'aquests estudis tenen com a finalitat:

- 1.- Avaluar l'impacte de l'administració de suplementes de superòxid dismutasa (SOD) sobre la modulació de l'estrès oxidatiu en el curs de la colitis experimental establerta induïda per l'administració intracolònica d'àcid trinitrobenzensulfònic (TNBS) i els possibles mecanismes a través dels quals SOD confereix protecció, especialment els efectes sobre la modulació de l'expressió de molècules d'adhesió endotelial (CAMs) i el reclutament leucocitari.
- 2.- Aprofundir en la investigació del tractament amb suplementes de SOD en el curs de la colitis en el model experimental immune crònic de ratolins deficients en interleucina (IL) 10 (IL-10^{-/-}) i els possibles mecanismes d'acció de la SOD sobre el reclutament leucocitari, l'expressió de CAMs, els nivells de hidroperoxidació lipídica (LPO) al teixit colònic i els biomarcadors de gravetat de la colitis
- 3.- Avaluar la capacitat de l'administració de SOD en la prevenció del desenvolupament de la inflamació colònica en un model de colitis experimental induït per dextrà sulfat sòdic (DSS), per determinar el possible valor d'aquest tractament en la prevenció de recurrències de la MII.

2.- CONCEPTES

2.1.- Metabòlits reactius d'oxigen

2.1.1.- Introducció

L'aport d'oxigen és fonamental per a la vida dels organismes aerobis. L'oxigen es metabolitza als mitocondris on es redueix en el procés de respiració cel.lular per obtenir l'energia indispensable per a la vida que s'emmagatzema en forma d'adenosintrifosfat (ATP). Les molècules d'oxigen no reduïdes completament en el procés de respiració cel.lular i les produïdes per diferents enzims, com la xantina oxidasa (XO), ciclooxigenasa (COX) i nicotinamida adenin dinuclifosfat oxidasa (NADPHox), i la mieloperoxidasa (MPO) present als leucòcits, originen els denominats metabòlits reactius d'oxigen (MRO).

Els MRO tenen un paper regulador fisiològic important actuant com a mediadors del sistema immune, reguladors de la pressió sanguínia i missatgers intracel.lulars. Pel que fa a la funció defensiva, aquestes molècules són generades pels monòcits i neutròfils mitjançant l'enzim MPO que catalitza la reducció del peròxid d'hidrògen (H_2O_2) fent servir diferents co-substrats com l'anió clorur (Cl^-), entre altres, per originar àcid hipocloròs (HClO). Els productes de la MPO tenen un paper clau en la resposta immune, actuen com a bactericides, presenten funció antiviral i actuen com a agent antitumoral. Una altra funció important dels MRO és la regulació de la pressió sanguínia. S'ha demostrat que l'anió superòxid (O_2^-) causa un efecte vasoconstrictor mitjançant la generació de guanidinmonofosfat cíclic (cGMP). Aquestes espècies, a més, tenen funció de missatgers intracel.lulars. Entre les funcions regulades pels MRO destaquen la secreció de citocines i hormones, l'activació de diferents factors de transcripció, el transport iònic, la neuromodulació i l'apoptosi.

En condicions fisiològiques hi ha petites quantitats d'aquests metabòlits formant-se contínuament. Com a mecanisme compensatori els teixits disposen d'un ampli sistema de defensa front als oxidants que inclou sistemes enzimàtics antioxidants com la glutatió peroxidasa (GSH), la catalasa i la SOD, i altres sistemes defensius no enzimàtics o "scavengers" constituïts per molècules de baix pes molecular com el retinol o vitamina A, l'ascorbat, el glutatió, tiols i α -tocoferol o vitamina E. Aquestes

espècies estan encarregades de mantenir l'equilibri redox en la cèl.lula. Tanmateix, en determinades malalties i síndromes com la MII, arteriosclerosi, hipertensió, trombosi, diabetis, dany per isquèmia i reperfusió, enteritis postradiació, pancreatitis, dany pulmonar agut i infeccions bacterianes com *Helicobacter pylori*, entre d'altres, els MRO amb elevada capacitat oxidant es generen en quantitats que saturen els mecanismes compensatoris i originen accions perniciosos sobre els sistemes biològics.

El paper real dels MRO en la patogènia d'aquestes malalties és motiu de controvèrsia i no deixa de ser una incògnita fins a quin punt la seva presència és la causa o el resultat de la resposta inflamatòria associada a la seva generació.

2.1.2.- Origen dels MRO

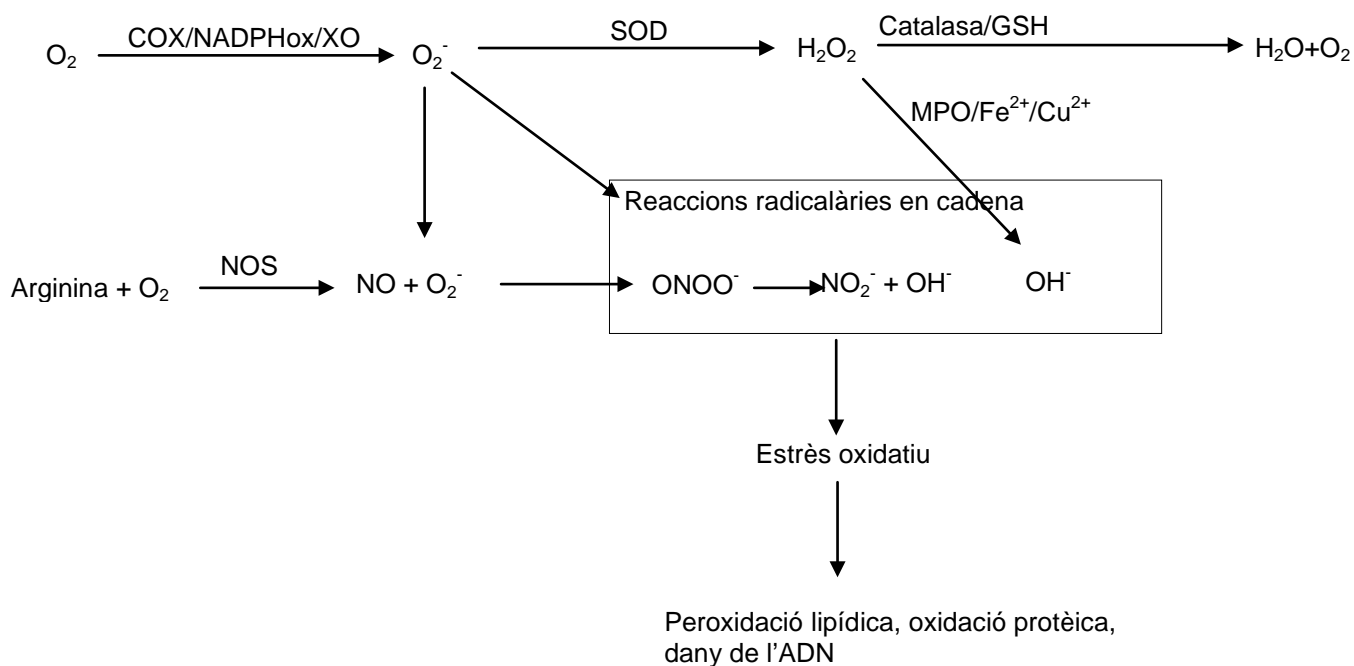
Taula 1: Mecanismes enzimàtics per a la producció de MRO i metabòlits reactius de nitrògen (MRN).

Font de radicals lliures	Producte
NAD(P)Hox	O_2^-
XO	O_2^-
COX	O_2^-
Ionització per radiació	Reacció amb qualsevol molècula
Òxid nítric sintasa (NOS)	Òxid nítric (NO). Cosubstrat necessari per a la formació dels MRN
MPO	HclO
Mitocondris	MRO resultants de la reducció parcial del O_2

Hi ha diversos mecanismes enzimàtics que generen els MRO i MRN en quasi tots els tipus cel.lulars (Taula 1). L'activitat i expressió d'aquests enzims està regulada per diferents estímuls com citocines ², la hipòxia i la isquèmia ^{3;4} i pèptids amb caràcter vasoactiu com la bradiquinina ⁵, entre altres.

L'estrès oxidatiu està iniciat i propagat per la sobreproducció de O_2^- , espècie que pot actuar com a oxidant o reductor. Nombrosos estudis han investigat aquesta reactivitat dual. S'ha demostrat *in vitro* que aquest anió redueix la citocrom C ⁶ i el blau de nitrotetrazoli ⁷. Diferents estudis *in vivo* han demostrat que el O_2^- actua com a oxidant front a diferents molècules presents als sistemes biològics, com l'epinefrina ^{6;8} i les deshidratases ⁹, generant múltiples espècies reactives algunes de les quals són radicalàries, com el radical aniònic peroxinitril ($OONO^-$), hidroxil (OH^-), sulfat (SO_5^-), sulfit (SO_3^-), i nitrat (NO_2^-), entre altres.

Figura 1: Diferents vies biològiques de formació de MRO i MNO ¹⁰



La reacció entre espècies radicalàries i no radicalàries origina reaccions radicalàries en cadena. Això té lloc perquè la reacció entre una espècie radicalària i una no radicalària sempre origina un altre producte radicalari. Si considerem com a exemple l'oxidació del sulfit a sulfat iniciada per O_2^- la reacció té lloc en tres fases:

- 1.- Iniciació: $SO_3^- + O_2^- + 2H^+ \leftrightarrow SO_3^- + H_2O_2$
- 2.- Propagació: $SO_3^- + O_2 \leftrightarrow SO_5^-$
 $SO_5^- + SO_3^{2-} \leftrightarrow SO_5^{2-} + SO_3^-$
- 3.- Finalització: $SO_5^{2-} + H_2O \leftrightarrow SO_4^{2-} + H_2O_2$

els productes formats en la fase de propagació són oxidants relativament forts capaços de reaccionar amb diferents macromolècules.

El NO és un factor de relaxació vascular lliurat per l'endoteli ¹¹ que regula el to del múscul llis i, per tant, el flux i la pressió sanguínia ¹². Per la seva banda, O_2^- actua com a factor de contracció vascular ^{13;14}. S'ha demostrat que els anions O_2^- reaccionen amb el NO i que la vida mitja del NO és prolonga amb l'administració de la SOD, però no de la catalasa ^{15;16}. Aquesta reacció constitueix la base de la formació dels MRN i de potents oxidants com $ONOO^-$ i OH^- . La reacció entre O_2^- i NO genera un potent oxidant, el $ONOO^-$ ¹⁷, que reacciona amb tiols ¹⁸, inicia la peroxidació lipídica ¹⁹, i pot causar la mort cel·lular en *E. coli* ²⁰. $ONOO^-$ és una espècie inestable el metabolisme de la qual origina espontàniament potents oxidants com OH^- i NO_2^- ²¹. Amb tota probabilitat la reacció entre NO i O_2^- modula significativament l'activitat biològica d'ambdues molècules.

S'ha descrit que O_2^- i H_2O_2 cooperen *in vivo* en la producció de OH^- que és un oxidant capaç d'atacar virtualment qualsevol biomolècula ²²⁻²⁴, amb especial afinitat per l'ADN ²⁵. Les deshidratases són un grup d'enzims que inclou la dihidroxiàcid deshidratasa, la 6-fosfogluconat deshidratasa, l'aconitasa i la fumarasa A i B. Aquesta família d'enzims conté en el seu centre actiu el "cluster" [4Fe-4S] que s'oxida per acció del O_2^- inactivat-lo i lliurant al medi Fe^{2+} ⁹. O_2^- proporciona Fe^{2+} al medi intracel·lular que possibilita la reacció de Fenton en la qual el Fe^{2+} redueix H_2O_2 i origina $Fe^{2+}O$ i $Fe^{3+} + OH^-$.

A més dels MRO produïts per les cèl·lules endotelials hi ha aquells de producció leucocitària. La MPO és un enzim amb caràcter bàsic de la família de les oxidoreductases que presenta una estructura tetramèrica altament glicosilada. És abundant en neutròfils i monòcits, constitueix quantitativament el 5% i el 2% respectivament del pes sec d'aquestes cèl·lules ²⁶. Es magatzema als grànuls atzurofils dels leucòcits i es secreta a l'espai extracel·lular i als compartiments fagolisosòmics en resposta a l'activació leucocitària. L'activació fagocítica i la secreció de MRO causa un increment de l'estrès oxidatiu degut a l'activació del complex NADPHox que genera O_2^- al medi extracel·lular ²⁷. La MPO actua amplificant el poder oxidant del H_2O_2 fent servir aquesta espècie com a substrat per a generar oxidants més reactius i espècies radicalàries mitjançant el cicle de la peroxidasa ²⁸⁻³².

La MPO catalitza l'oxidació del Cl^- pel H_2O_2 originant HClO ^{33;34} segons la reacció:



A més de Cl^- , l'enzim MPO pot fer servir com a co-substrat reductor altres espècies com bromur (Br^-), iodur (I^-), sulfocianur (SCN^-), NO_2^- ³⁵, tirosina ³⁶, ascorbat ³⁷, catecolamines ³⁸, estrògens ³⁹ i serotonina ⁴⁰. Els productes resultants i les reaccions que inicien tenen una funció biològica significativa, originant potents molècules senyalitzadores, com és el cas de la peroxidació lipídica o l'activació d'intermediaris xenobiòtics ^{32;41-43}.

S'han descrit dos mecanismes mitjançant els quals la MPO participa en la formació de MRN. El primer mecanisme implica l'oxidació de ONOO^- originant nitrogen dioxigen (NO_2^-) ^{31;32;35}. El segon mecanisme implica l'oxidació secundària de NO_2^- pel HClO que origina clorur nitròs (ClNO_2) ^{31;44}.

2.1.3.- Sistemes defensius antioxidants

Els essers vius posseeixen diferents sistemes defensius front als oxidants per protegir les cèl·lules i els teixits de la contínua producció de MRO com a resultat del metabolisme. Aquests mecanismes estan constituïts pels sistemes defensius antioxidants enzimàtics (Taula 2) i els sistemes defensius antioxidants no enzimàtics o *scavengers* (Taula 3).

Taula 2: Sistemes defensius enzimàtics encarregats de mantenir l'equilibri redox als sistemes biològics.

ENZIM	REACIÓ CATALITZADA
SOD	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalasa	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
GSH	$2GSH + PUFA-OOH \leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$
Glutathió S-transferasa	$RX + GSH \leftrightarrow HX + R-S-GSH$
Fosfolípid-hidroperòxid glutatatió peroxidasa	$2GSH + PUFA-OOH (H_2O_2) \leftrightarrow GSSG + 2H_2O$
Ascorbat peroxidasa	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Monodeshidroascorbat reductasa	$NADH + 2MDHA \leftrightarrow NAD^+ + 2AA$
Deshidroascorbat reductasa	$2GSH + DHA \leftrightarrow GSSG + AA$
Glutatió reductasa	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

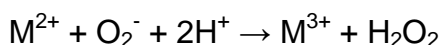
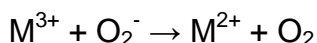
Taula 3: Sistemes defensius no enzimàtics encarregats de mantenir l'equilibri redox als sistemes biològics.

ESPECIE NO ENZIMATICA	FUNCIÓ ANTIOXIDANT
Albúmina	Quelant de Cu^{2+}
Àcid ascòrbic	<i>Scavenger</i> de radicals lliures i HClO
Bilirrubina	<i>Scavenger</i> de radicals lliures
Carotenoids	<i>Scavenger</i> de radicals lliures
Ceruloplasmina	Oxidant de Fe^{2+}
Glucosa	<i>Scavenger</i> de radicals OH^-
Piruvat	<i>Scavenger</i> de radicals H_2O_2
Grups sulfidril	<i>Scavenger</i> de radicals lliures i HClO
α -tocoferol	<i>Scavenger</i> de radicals lliures
Transferrina	Quelant de Fe^{3+}
Ubiquinos-10	<i>Scavenger</i> de radicals lliures
Àcid úric	<i>Scavenger</i> de radicals lliures i HClO. Quelant de Fe^{3+}

Sistemes defensius enzimàtics:

Els enzims SOD, GSH i catalasa constitueixen la primera línia dels sistemes defensius antioxidants front als MRO.

Es coneixen tres isoformes de SOD en mamífers, dos de les quals contenen Cu^{2+} i Zn^{2+} al seu centre actiu i es localitzen al compartiment citoplasmàtic (SOD1 o CuZnSOD) i a l'espai extracel.lular (SOD3 o ECSOD) respectivament. L'altra isoforma conté Mn^{2+} al seu centre actiu (MnSOD o SOD2), i és localitza als mitocondris de cèl.lules aeròbies. Les tres isoformes de SOD catalitzen la dismutació de O_2^- a O_2 i H_2O_2 segons la següent reacció:



SOD1 o CuZnSOD: s'expressa constitutivament, presenta una estructura homodimèrica amb un pes molecular de 32 kD. Conté un catió Cu^{2+} i un Zn^{2+} i una estructura imidazolada amb capacitat donadora de protons al centre actiu de cada subunitat, aquestes subunitats es troben estabilitzades per un pont disulfur i forces no covalents.

SOD2 o MnSOD: és un enzim tetramèric induïble que es localitza al mitocondri i actua eliminant els radicals O_2^- produïts durant el procés de respiració cel·lular al mitocondri.

SOD3 o ECSOD: es localitza en la superfície externa de la membrana plasmàtica, presenta estructura tetramèrica amb un domini enllaçant a heparina.

A més d'aquestes tres isoformes de SOD presents als mamífers s'han descrit altres dues isoformes en microorganismes, la NiSOD i la FeSOD.

En condicions fisiològiques, la concentració de SOD és aproximadament de 10^{-5} mol/l, mentre que la de O_2^- és de 10^{-10} mol/l. Per tant, un O_2^- és 10^5 vegades més probable que trobi una molècula de SOD que una de O_2^- . A més, la reacció catalitzada per SOD és 10^4 vegades més efectiva que la mateixa reacció espontània no catalitzada. Per tant, l'acció de la SOD escursa la vida mitja del O_2^- 10^9 vegades. Hi ha múltiples dianes susceptibles de ser atacades per el O_2^- , s'ha estimat que la SOD proporciona aproximadament un 95% de protecció front a l'atac d'aquestes dianes en *E. coli* ⁴⁵.

El H_2O_2 generat per acció de la SOD es detoxifica per acció de les catalases, que catalitzen la dismutació de $2\text{H}_2\text{O}_2$ a $2\text{H}_2\text{O}$ i O_2 , i les peroxidases, que redueixen el H_2O_2 a H_2O fent servir diferents reductors en el procés catalític. Algunes peroxidases, a més, poden reduir alquil-hidroperòxids als seus respectius alcohols. Com en el cas de la SOD, les catalases i les peroxidases estan constituïdes per diferents famílies enzimàtiques, moltes de les quals contenen un grup ferrohemo. El procés de catàlisi implica l'oxidació del catió Fe^{2+} present al grup hemo per part del H_2O_2 , seguida de la reducció divalent de H_2O_2 , en el cas de catalases, i dues

reduccions univalents successives per un substrat orgànic en el cas de les peroxidases ⁴⁶.

Les catalases de mamífers són enzims homotetramèrics, amb un pes molecular de 60 kDa cada subunitat, que contenen un grup ferrohemo. Aquests enzims són més eficients quan la concentració de H₂O₂ és relativament elevada degut a que el valor de la K_M front al substrat es troba en el rang de concentracions milimolars. Es magatzema en l'interior dels lisosomes juntament amb una gran quantitat d'enzims productors de H₂O₂. La catalasa dels mamífers pot actuar també com a peroxidasa front a molècules de baix pes molecular com metanol, etanol, nitrit i format fent servir H₂O₂ per oxidar aquests substrats que són suficientment petits per a accedir al grup hemo. D'acord amb aquesta observació, l'estructura d'aquest enzim, que ha estat determinada per cristal·lografia de raigs X, indica que el grup hemo és relativament poc accessible en l'estructura de l'enzim i, per tant, aquesta família d'enzims únicament pot catalitzar reaccions en les que intervenen molècules de baix pes molecular ⁴⁷. La catalasa conté un lligam estret a NADPH, que té com a funció prevenir l'acúmul de la forma oxidada inactiva del catió Fe³⁺ de l'enzim ⁴⁸. Durant el procés de catàlisi no hi ha interacció entre el NADPH i el grup hemo ⁴⁹. Aquesta família d'enzims ha estat estudiada intensivament en *E. Coli* on s'han caracteritzat dues isoformes de catalasa denominades hidroperoxidasa I i II ^{50;51} que difereixen en la seva activitat, regulació i localització. La hidroperoxidasa-I té activitat catalasa i peroxidasa, es troba al periplasma associat a la membrana plasmàtica. En canvi, la hidroperoxidasa-II té únicament activitat catalasa i es troba al citosol ⁵².

Les peroxidases són enzims que fan servir diverses molècules com a donadors d'electrons per a reduir H₂O₂ a H₂O. Els llevats fan servir citocrom C peroxidasa, les plantes utilitzen ascorbat peroxidasa i peroxidases que interactuen amb fenols i amines com a donadors d'electrons, *E. Coli* presenta una NADPH-peroxidasa que es denomina alquil-hidroperòxid reductasa. La principal peroxidasa en mamífers és la GSH que s'oxida durant el procés catalític i es reverteix a la seva forma original per l'acció reductora de NADPH. Hi ha dues isoformes de GSH en mamífers, una de les quals es secreta i es localitza a l'espai extracel·lular ⁵³, i l'altra actua específicament sobre fosfolípids hidroperoxidats ⁵⁴.

Sistemes defensius no enzimàtics

Els *scavengers* dels radicals lliures representen un altre tipus de sistema defensiu antioxidant. Es tracta d'un conjunt molt heterogeni de molècules que es classifiquen en dos grups.

Un grup el constitueixen les proteïnes plasmàtiques quelants de metalls, com la transferrina, ceruloplasmina, albúmina, haptoglobina i hematopexina (Taula 3), que tot i que no interactuen directament amb els MRO es consideren *scavengers* per la seva acció quelant sobre els cations metàlics que participen en la de producció de radicals lliures per la seva capacitat catalítica.

L'altre grup de sistemes antioxidants no enzimàtics el constitueixen molècules amb capacitat d'interactuar i neutralitzar els MRO com α -tocoferol, àcid ascòrbic i tiols (Taula 3) que reaccionen directament amb els MRO i neutralitzen la seva capacitat oxidant. A diferència dels sistemes defensius enzimàtics, la interacció dels *scavengers* amb els MRO implica l'oxidació irreversible d'aquestes molècules i, per tant, la seva inactivació. S'ha postulat que la determinació del nivell de *scavengers* en forma reduïda pot constituir una mesura del grau d'estrès oxidatiu en un determinat teixit.

2.1.4.- Activitat tòxica dels MRO

Els MRO causen efectes tòxics quan saturen els sistemes defensius antioxidants ja sigui per reacció directa sobre les diferents macromolècules, per acció indirecta mitjançant diferents mecanismes que causen dany tissular i inflamació, o bé per alteració dels processos de regulació fisiològica mitjançats pels MRO.

Dany directe sobre les macromolècules

S'ha demostrat que els sucres de baix pes molecular, com el glicolaldehid i la dihidroxiacetona, s'autooxiden per acció dels radicals lliures. Aquest mecanisme està iniciat i propagat pel O_2^- ⁵⁵⁻⁵⁷ que produeix l'enolització del grup carbonil dels glúcids i la seva posterior autooxidació. Els sucres de baix pes molecular són incapaços de bloquejar el grup carbonil per ciclació i són, per tant, més fàcilment autooxidats. En canvi, les aldoses que existeixen com a piranoses són relativament estables. La producció de O_2^- i H_2O_2 durant l'autooxidació dels glúcids explica la capacitat dels sucres de inactivar la rodanasa⁵⁸ i generar peroxidació lipídica⁵⁹. Per altra banda, la inhibició de la degradació autooxidativa dels sucres per acció de la SOD demostra el paper del O_2^- com a propagador de la reacció⁶⁰.

El catió Fe^{2+} , que es genera com a producte de la reacció entre el O_2^- i els cations Fe^{3+} presents en els centres actius de diferents enzims, com les deshidratases, actua com a catalitzador de la reacció de Fenton, en la qual el H_2O_2 oxida el Fe^{2+} i genera OH^- que és un potent oxidant amb capacitat de reaccionar amb qualsevol biomolècula. El catió Fe^{2+} pot interactuar amb l'ADN i catalitzar la reacció de Fenton en un *locus* adjacent a aquesta biomolècula i, per tant, possibilita que l'ADN esdevingui una diana susceptible a ser oxidada per acció del OH^- generat en la reacció de Fenton. Aquest mecanisme és responsable de l'efecte mutagènic i de l'increment de la peroxidació de l'ADN com a resultat de l'increment de l'estrès oxidatiu⁶¹⁻⁶⁶.

Com s'ha descrit prèviament, els MRO, a mes, originen dany directe sobre els lípids, per peroxidació lipídica, i les proteïnes, per inactivació i/o oxidació^{32;41-43}.

Dany indirecte: inflamació i dany tissular

Un aspecte clau en la fisiopatogènesi de la resposta inflamatòria que contribueix a amplificar i perpetuar el dany inflamatori és el reclutament de cèl.lules inflamatòries des del torrent circulatori a l'interior del teixit. L'adhesió de leucòcits circulants a la superfície de les cèl.lules de l'endoteli vascular depèn de l'expressió de les molècules d'adhesió endotelial (CAMs), que inclou la molècula d'adhesió cel.lular vascular 1 (VCAM-1), la molècula d'adhesió cel.lular mucosa adressina 1 (MAdCAM-1) i molècula d'adhesió intercel.lular 1 (ICAM-1), juntament a l'activació dels respectius contrarreceptors de les CAMs expressats en la superfície dels leucòcits ⁶⁷.

S'ha suggerit que el reclutament leucocitari està influenciat per l'estrès oxidatiu agut i crònic en l'endoteli vascular. Múltiples estudis han descrit el paper regulador dels MRO en el reclutament leucocitari. S'ha demostrat que l'extravassació leucocitària està marcadament incrementada en resposta a un increment de l'estrès oxidatiu ⁶⁸ i que el tractament amb antioxidants bloqueja significativament l'adhesió leucocitària ferma en la superfície de les cèl.lules endotelials ^{69;70}. Un estudi *in vivo* ha demostrat que el O₂⁻ generat per la perfusió de hipoxantina i XO al messenteri incrementa la interacció dels leucòcits a l'endoteli vascular mesurada per microscopia intravital en aquest òrgan ⁷¹. De manera similar, s'ha demostrat que la perfusió a la microcirculació pancreàtica de rata amb xantina i XO incrementa la infiltració de neutròfils en aquest teixit mesurada per activitat MPO ⁷².

S'ha suggerit que l'increment de l'expressió de les principals CAMs: ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1 i E-selectina està directa o indirectament relacionada a la concentració de MRO al teixit. L'anàlisi funcional del promotor humà de VCAM-1 ha demostrat que diferents factors de transcripció sensibles a estrès oxidatiu estan relacionats amb l'activació de l'expressió del gen VCAM-1 en resposta a l'estimulació amb IL-1 β i el factor de necrosi tumoral (TNF)- α ⁷³⁻⁷⁵. Un estudi *in vitro* ha demostrat que l'expressió de SOD, però no de catalasa, per adenovirus disminueix l'acúmulo d'ARNm de VCAM-1 induït per TNF- α ⁷³. La regulació de l'expressió de MAdCAM-1 *in vivo* no es coneix en profunditat. Tanmateix, diferents estudis *in vitro* han

demostrat que MAdCAM-1 es sobreexpressa en resposta a l'estimulació amb TNF- α , i que la modulació d'aquest mediador és dependent dels MRO ja que el tractament amb antioxidants prevé la sobreexpressió de MAdCAM-1 induïda per TNF- α ^{70;76}. Per altra banda, s'ha demostrat que l'increment dels nivells de H₂O₂ indueix la transcripció de ARNm de ICAM-1 i que aquesta transcripció s'inhibeix amb l'administració d'antioxidants ⁷⁷. Paral·lelament, s'ha demostrat que l'expressió de ICAM-1 està transcripcionalment regulada per TNF- α ⁷⁸ en les cèl·lules endotelials de vena umbilical humana, i la implicació de l'activació del factor nuclear de transcripció kappa B (NF- κ B) i altres citocines proinflamatories sensibles a estrès oxidatiu en la regulació de l'expressió de ICAM-1 ⁷⁹. S'ha descrit, a més, que la transcripció del gen que codifica l'expressió de E-selectina és dependent dels MRO ja que la seva expressió està induïda per TNF- α i IL-1 ⁸⁰.

A més dels efectes de l'estrès oxidatiu sobre l'increment de les interaccions leucòcit-endoteli i la sobreexpressió de CAMs, diversos estudis documenten la participació dels MRO en l'increment de la permeabilitat de l'endoteli vascular que permet la migració leucocitària des del torrent circulatori a l'interior del teixit. La perfusió de MRO, o xantina i XO, en pulmons de conill ⁸¹ i cobai ^{82;83} genera un increment del coeficient de filtració capilar. Paral·lelament a aquesta observació, s'ha demostrat la participació conjunta dels MRO i VCAM-1 en l'increment de la permeabilitat de l'endoteli vascular. L'acoblament de la integrina α_4 a VCAM-1 activa senyals per a l'estimulació de l'enzim NADPHox present en la membrana plasmàtica de les cèl·lules endotelials ⁸⁴ que genera O₂⁻ al medi extracel·lular ⁸⁵ per activar les metaloproteases ⁸⁶ que actuen degradant la matriu extracel·lular i obrir espais intercel·lulars que permeten la migració leucocitària entre cèl·lules endotelials.

La sobreexpressió de MRO causa l'alteració de l'equilibri enzimàtic proteasa/antiproteasa que existeix en condicions fisiològiques a l'interstici cel·lular. L'activació de les proteases per part dels MRO causa la proteolisi descontrolada que possibilita la infiltració de cèl·lules inflamatòries al teixit que danyen la mucosa i produeixen erosions i ulceracions ³⁴. Un cop les cèl·lules inflamatòries invadeixen el teixit es produeix l'amplificació del procés inflamatori per l'acció secretora de proteases, citocines proinflamatòries i MRO per les cèl·lules infiltrades. S'ha

demostrat que el HClO produït per l'enzim MPO pot amplificar la proteolisi descontrolada de l'interstici per la seva acció inactivadora de diferents inhibidors de les proteases, com la α_1 -proteasa i la α_2 -macroglobulina. Per altra banda, el HClO activa la colagenasa i la gelatinasa secretada de forma latent pels neutròfils. La inactivació dels inhibidors de les proteases juntament amb l'activació de proteases leucocitàries causa la degradació de la matriu extracel.lular i danya les cèl.lules endotelials durant els episodis inflamatoris.

Alteració dels processos de regulació fisiològica mitjançats pels MRO

L'increment en la concentració de MRO pot alterar els processos reguladors fisiològics mitjançats per aquestes espècies. Els MRO actuen com a missatgers intracel.lulars, per tant, un increment en la concentració d'aquestes espècies exerceix múltiples efectes en la funció cel.lular que poden originar l'alteració dels diferents processos fisiològics regulats pels MRO. S'ha demostrat que la sobreexpressió de MRO causa necrosi ⁸⁷, apoptosi ⁸⁸ i que certs oxidants d'origen leucocitari poden comportar-se com a potents agents mutagènics *in vitro* ^{89;90}. Aquesta dada podria estar relacionada amb la major incidència de transformacions neoplàsiques en el còlon de pacients amb MII crònica.

Els MRO, a més, tenen funció activadora en la regulació de diferents gens implicats en la resposta immune i inflamatòria. S'ha demostrat que els MRO activen diferents factors de transcripció com NF- κ B, la proteïna d'activació 1 (AP-1) i el factor transductor de senyal i activador de transcripció (STAT) ⁹¹⁻⁹⁵ que s'uneixen a promotors de diversos gens que regulen la resposta immune i inflamatòria i activen la seva transcripció. Entre els gens regulats per aquests factors de transcripció es troben les CAMs, l'enzim òxid nítric sintasa induïble (iNOS) ⁹⁶, que participa en la regulació de la vasodilatació capilar i l'activació plaquetària, diverses citocines proinflamàtories ⁹⁷⁻⁹⁹, com TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, que secreten els limfòcits, monòcits, granulòcits, cèl.lules epitelials, cèl.lules endotelials i fibroblasts i juguen un paper essencial en la modulació del sistema immunitari intestinal. L'alteració de l'equilibri de citocines proinflammatory/antiinflammatory i la sobreexpressió de CAMs

origina la inducció, amplificació i prolongació de la resposta inflamatòria i possibilita el dany tissular i inflamatori causat per la sobreexpressió dels MRO.

Pel que fa als processos reguladors fisiològics propis del tracte intestinal, s'ha suggerit que la sobreexpressió dels MRO incrementa la secreció de Cl⁻ mitjançant l'alliberament de diferents metabòlits de l'àcid araquidònic i de neurotransmissors. La secreció de Cl⁻ està relacionada amb la motilitat intestinal. S'ha postulat, per tant, que els MRO podrien ser agents causants, en part, dels quadres diarrèics associats a la MII ^{100;101}. Per altra banda, s'ha descrit que la sobreexpressió de MRO pot alterar la contractibilitat del múscul llis intestinal *in vivo* mitjançant l'alliberament de neurotransmissors provinents dels nervis del plexe mientèric ¹⁰².

2.1.5.- Evidències existents de la participació dels MRO en la fisiopatologia de la MII

La resposta immune que participa en el procés inflamatori de la MII no està totalment caracteritzada. Tanmateix, múltiples evidències suggereixen que en la inflamació participen diferents factors clau com el reclutament leucocitari, la sobreexpressió de CAMs en la superfície de les cèl.lules endotelials vasculars, i diversos mediadors inflamatoris com proteases, citocines, metabòlits de l'àcid araquidònic i MRO.

S'ha demostrat en diferents estudis la presència de concentracions anormalment elevades de MRO en l'intestí crònicament inflammat, tant en pacients amb MII com en diferents models experimentals de colitis^{23;103-107}. Per altra banda, s'ha determinat indirectament la participació dels MRO en la MII determinant els nivells de peroxidació lipídica, la inactivació per oxidació d'enzims, com la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, i les concentracions anormalment reduïdes de *scavengers* en la seva forma reduïda, com ascorbat i deshidroascorbat, en mostres de teixit colònic de pacients amb MII activa¹⁰⁸⁻¹¹⁰. S'ha suggerit que els MRO d'origen leucocitari tenen un paper essencial en la fisiopatologia de la MII. En concret, s'ha demostrat que els monòcits aïllats de sang perifèrica i els macròfags intestinals aïllats de pacients amb MII generen una major quantitat de MRO que les cèl.lules d'individus sans^{111;112} i que en la fase activa de la malaltia els neutròfils perifèrics migren al teixit intestinal on generen MRO²³. Aquestes dades demostren la implicació de l'estrès oxidatiu a l'intestí crònicament inflammat i el protagonisme que els MRO de producció leucocitària poden tenir en la fisiopatologia de la MII.

Un aspecte complementari a tenir en compte és l'observació que els sistemes enzimàtics antioxidants presenten una activitat disminuïda en el còlon de pacients amb MII activa fent així el teixit susceptible al dany oxidatiu¹⁰⁹. En el cas particular de la SOD s'ha demostrat que l'expressió d'aquest enzim està alterada en pacients amb MII activa. En concret, s'ha descrit una disminució de l'activitat enzimàtica i dels nivells citoplasmàtics de SOD1¹¹³⁻¹¹⁶. Un estudi comparatiu de l'expressió de les tres isoformes de SOD en la mucosa intestinal de pacients amb CU i MC demostra que hi ha un increment dels nivells de SOD2 i una marcada disminució dels nivells de SOD1 i SOD3 en l'epiteli de la mucosa inflamada en ambdues malalties¹¹⁶.

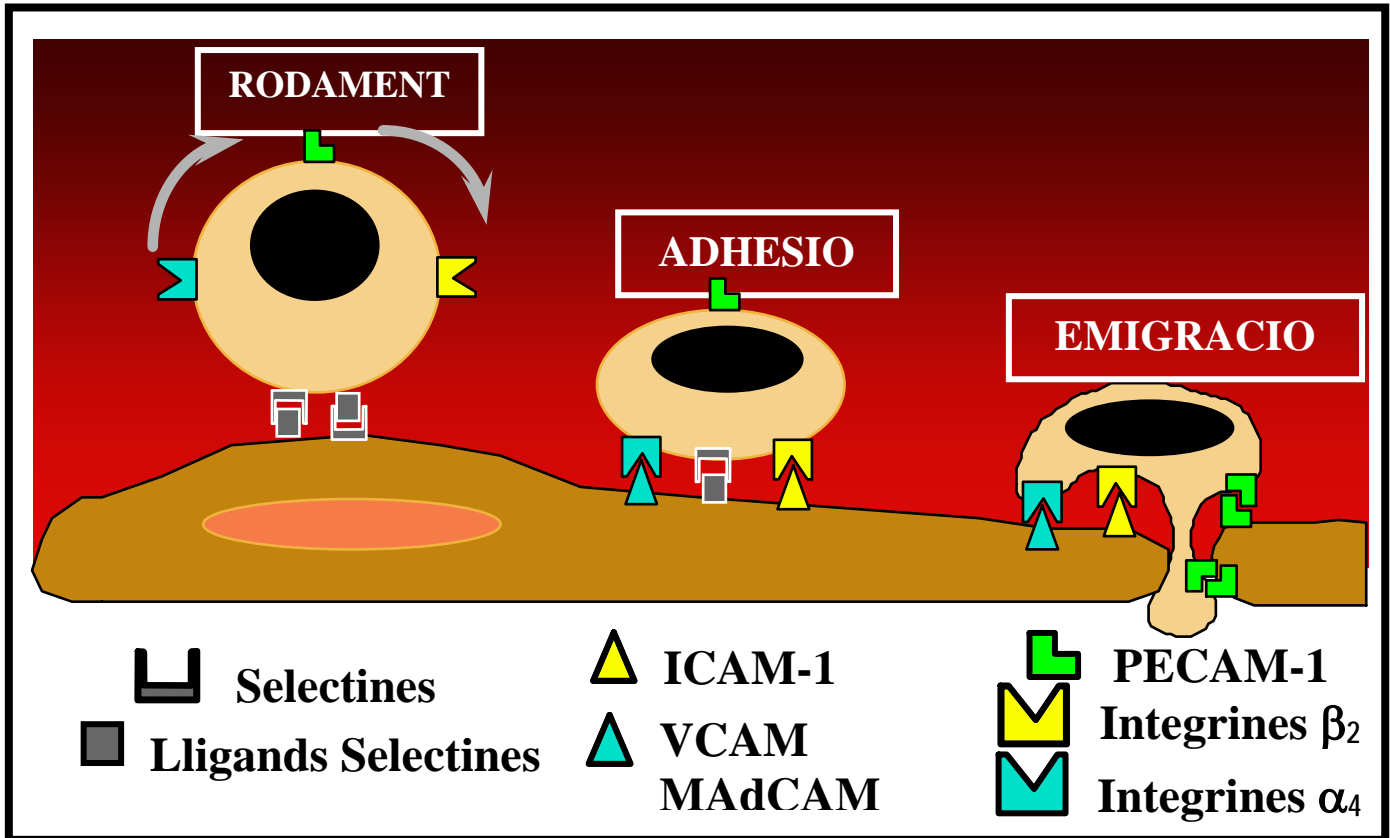
Tenint en compte la importància de l'estrès oxidatiu en la patogènia de la MII, que els nivells i l'activitat dels enzims antioxidants, en particular de la SOD, es troben reduïts en la fase activa de la malaltia i que l'estrès oxidatiu s'inicia i es propaga per la sobreexpressió del O_2^- , la degradació d'aquest radical aniònic sembla que pot tenir importants implicacions en el desenvolupament de noves estratègies *biològiques* per al tractament de la MII humana.

2.2.- Interaccions leucòcit-endoteli: fenòmens de rodament, activació, adhesió i migració leucocitària

El component cel.lular essencial de la reacció inflamatòria, sigui quin sigui el context en el qual es produeix, és el reclutament de leucòcits cap al focus inflamatori. Per que es produeixi l'extravassació de leucòcits circulants a l'interior del teixit cal que s'estableixin una sèrie de interaccions entre els leucòcits i les cèl.lules de l'endoteli vascular. Un factor essencial en la fisiopatogènia de la MII és la sobreexpressió de les CAMs que intervenen en el procés de reclutament leucocitari ⁶⁷. Aquestes molècules participen en la transmigració dels leucòcits des del compartiment vascular a l'interior dels teixits on desenvolupen la seva funció immune i inflamatòria. Aquest procés consta de varies fases que comprenen rodament, activació i adhesió ferma leucocitària i la posterior migració dels leucòcits a través de l'endoteli vascular.

Les interaccions dels leucòcits amb l'endoteli vascular s'inicien en la perifèria de les vècules postcapilars, on interaccionen de forma dèbil amb les cèl.lules endotelials. Aquesta interacció fa que els leucòcits presentin un moviment de rotació al llarg de la paret de les vècules, que anomenem rodament. En una segona fase, es pot produir l'activació dels leucòcits per acció de diferents mediadors proinflamatoris, com el factor d'activació plaquetari o el leucotriè B₄. Aquesta estimulació dels leucòcits implica l'activació dels contrarreceptors leucocitaris de les CAMs denominats integrines que es troben habitualment inactius. Un cop activats els leucòcits tindrà lloc l'adhesió ferma a l'endoteli. El pas final d'aquesta seqüència es produeix quan els leucòcits adherits migren cap a l'espai intersticial a través de les unions existents entre les cèl.lules endotelials ¹¹⁷.

Figura 2: Esquema de les interaccions leucòcit endoteli, resumides en tres etapes seqüencials: rodament, adhesió i emigració. Així mateix, es representen les principals molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries implicades en cada etapa.



2.3.- Principals CAMs

2.3.1.-Selectines:

Les selectines són les CAMs responsables dels fenòmens de rodament leucocitari. És coneixen tres selectines: E-selectina, present únicament en la superfície endotelial; P-selectina, expressada a nivell de l'endoteli i de les plaquetes; i L-selectina, que es troba en els neutròfils, monòcits i eosinòfils circulants, i en la majoria dels limfòcits B i T verges ^{67;118}.

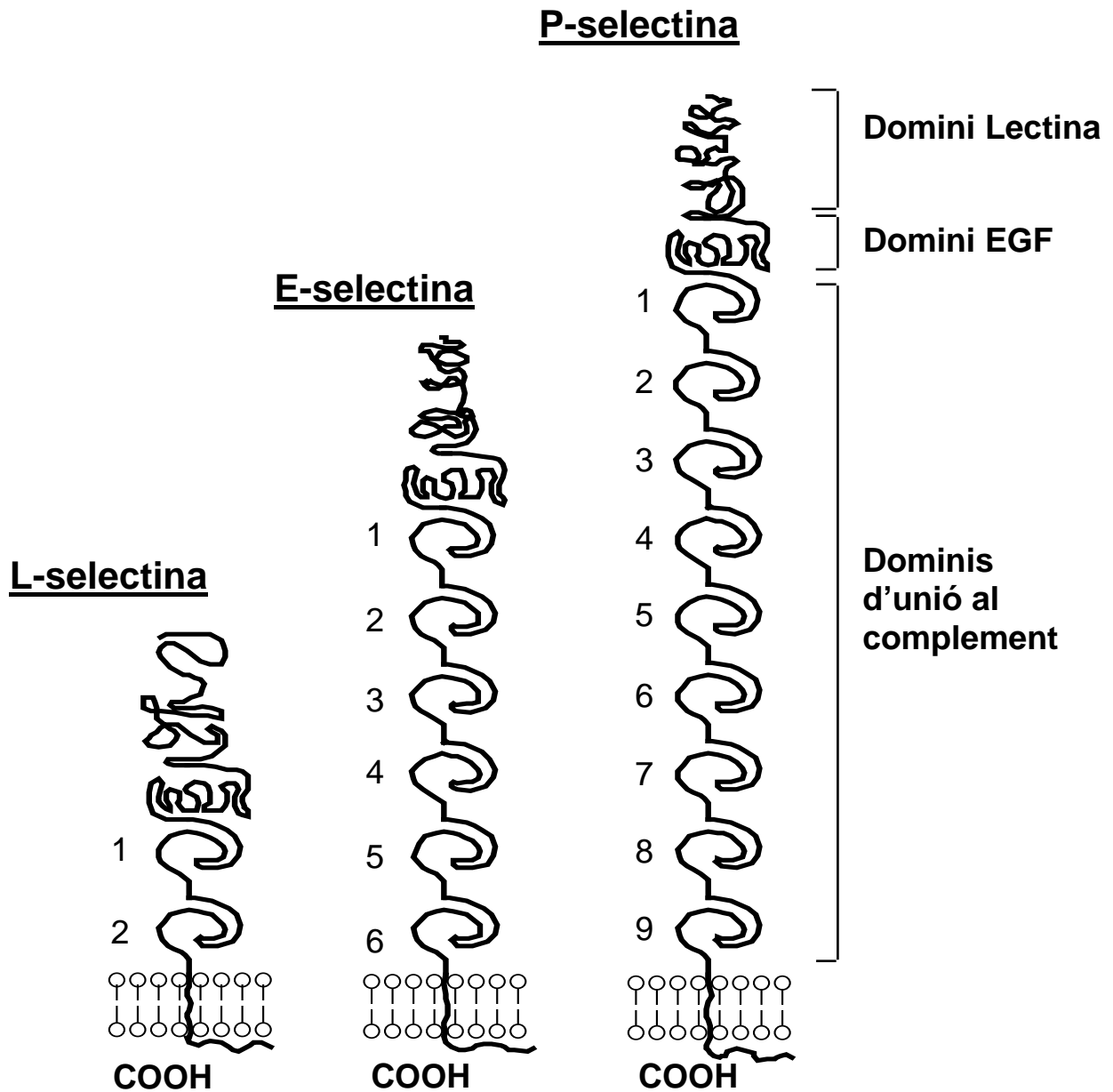
P-selectina s'emmagatzema als cossos de Weibel-Palade de les cèl.lules endotelials i als grànuls alfa de les plaquetes. En resposta a un estímul activador, P-selectina es mobilitzada cap a la membrana cel.lular i apareix expressada en la superfície de la cèl.lula pocs minuts després ¹¹⁸. Posteriorment, P-selectina es pot mobilitzar de nou cap a l'interior de la cèl.lula per ser reutilitzada o bé es pot desprendre i ser alliberada al plasma originant la P-selectina soluble que pot ser quantificada ¹¹⁹. Les cèl.lules endotelials, a més, poden sintetitzar P-selectina *de novo* en resposta a determinats estímuls com la sobreexpressió de MRO, endotoxèmia i citocines proinflamatòries. Aquesta síntesi es tradueix en un segon pic d'expressió que es detecta en la superfície de les cèl.lules 4 hores després de l'estímul proinflamatori ^{120;121}.

E-selectina, en canvi, no es troba en la superfície de les cèl.lules endotelials de forma constitutiva. La síntesi i expressió d'aquesta CAM està totalment regulada a nivell transcripcional. S'ha demostrat que l'expressió de E-selectina en la superfície de les cèl.lules endotelials pot ser induïda per diversos estímuls proinflamatoris, com IL-1 o TNF- α . E-selectina es pot detectar en la superfície de les cèl.lules endotelials a les 2 hores de l'aparició de l'estímul, disminuint novament a les 8 hores de l'exposició a l'estímul ¹²²⁻¹²⁴.

Les interaccions entre L-selectina i l'endoteli no requereixen de l'activació del leucòcit, ja que la L-selectina s'expressa constitutivament en la seva superfície. S'ha implicat aquesta CAM en els fenòmens d'adhesió dels neutròfils a cèl.lules endotelials activades, però no a cèl.lules endotelials quiescents ¹²⁵. Aquesta dada

suggereixen que el lligand de L-selectina no s'expressa constitutivament en la superfície endotelial i que la seva expressió requereix l'activació d'aquestes cèl.lules per part de diferents estímuls proinflamatoris. Contràriament al que succeeix amb la P- i la E-selectina, l'activació dels leucòcits per mitjà de citocines o altres agents proinflamatoris s'acompanya d'una disminució en l'expressió de L-selectina, com a resultat del seu alliberament de la membrana dels leucòcits ^{126;127}.

Figura 3: Estructura molecular de les selectines. Totes les selectines contenen un domini lectina, un domini "epidermal growth factor (EGF)-like" i diferents dominis de unió al complement.



2.3.2.- Lligands de les selectines:

Es tracta d'una família de CAMs que es localitza en la superfície de les cèl.lules endotelials i dels leucòcits i que pertany a la família de les mucines. Aquestes CAMs són proteïnes riques en serina i treonina, posseeixen un alt grau de glicosilació de la seva molècula per carbohidrats sulfatats que possibiliten la interacció amb altres CAMs ¹¹⁸. Aquestes proteïnes contenen, entre d'altres, els tetrasacàrids sLex, sLea, o bé les seves formes sulfatades, que tenen activitat de lligand per a les tres selectines ¹²⁸. A més, s'han descrit lligands específics per a L-selectina en la superfície de les cèl.lules endotelials ¹²⁹, i altres lligands específics per a la P-selectina ^{130;131} o la E-selectina ¹³² en la superfície leucocitària.

2.3.3.- Immunoglobulines:

La característica comuna d'aquest conjunt de CAMs és l'existència de múltiples dominis tipus immunoglobulina en la seva estructura. Cinc d'aquestes molècules intervenen en les interaccions leucòcit-endoteli: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MAdCAM-1 i la molècula d'adhesió cel.lular endotelial plaquetària 1 (PECAM-1).

ICAM-1 s'expressa de forma constitutiva en la superfície de les cèl.lules endotelials, cèl.lules epitelials, leucòcits i fibroblasts ^{122;133}. L'activació de l'endoteli mitjançant estímuls proinflamatoris com citocines, lipopolisacàrid (LPS) i MRO indueix un increment en l'expressió de ICAM-1 la magnitud del qual varia de forma molt marcada d'un territori vascular a un altre ¹³⁴.

ICAM-2 és una forma truncada de la molècula ICAM-1 que s'expressa de forma basal en la superfície de les cèl.lules endotelials. La seva expressió, a diferència de ICAM-1, no es modifica en resposta a l'estimulació de l'endoteli ¹³⁵.

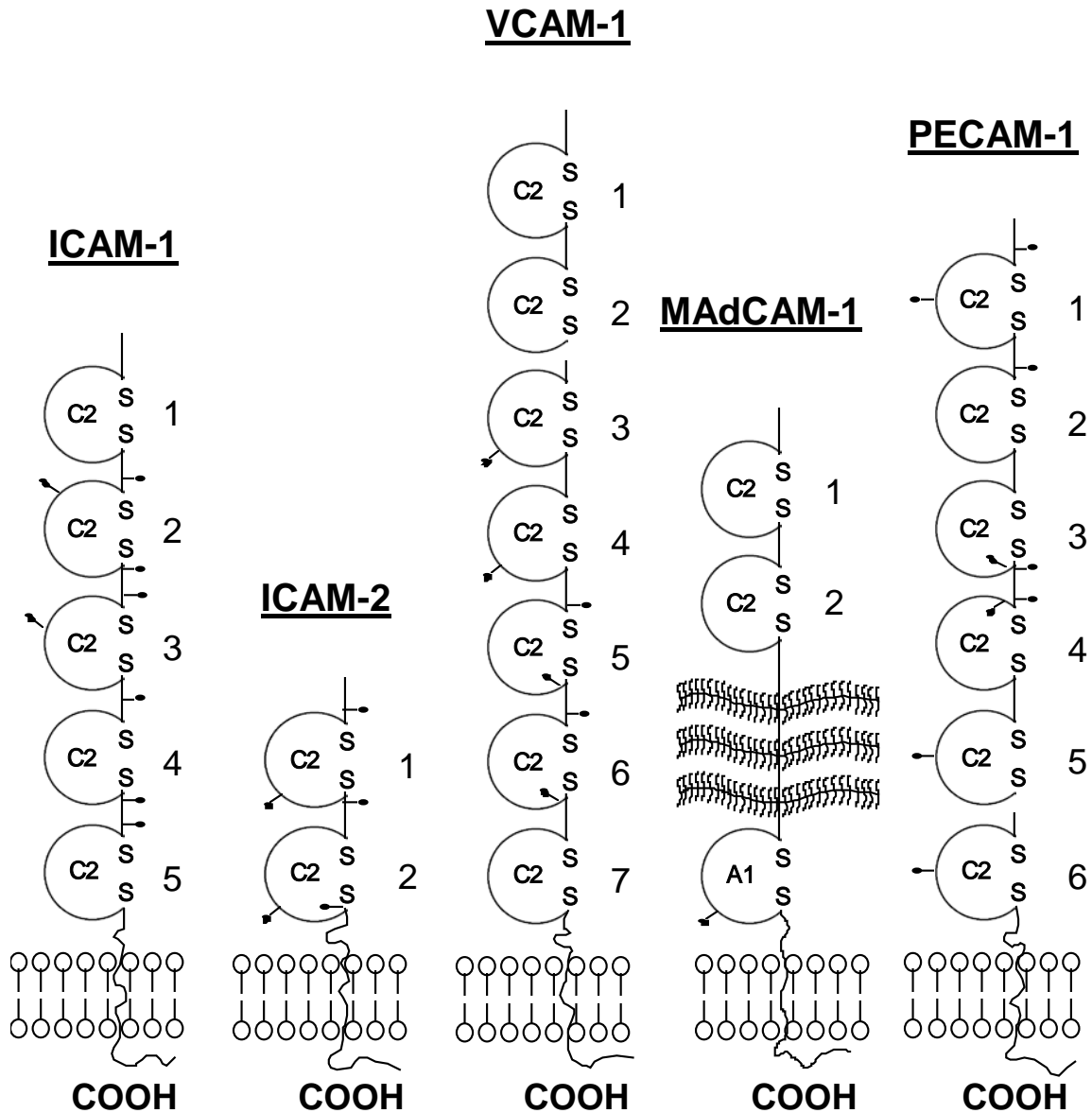
VCAM-1 és una CAM amb una expressió constitutiva mínima o inexistent. En canvi, la seva expressió està marcadament incrementada en resposta a estímuls proinflamatoris, com citocines, LPS i MRO, amb una cinètica similar a la de ICAM-1.

VCAM-1 és el lligand de les integrines $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i, en menor mesura, $\alpha_4\beta_7$ ^{136;137}, té un paper important en el reclutament de limfòcits i monòcits.

MAdCAM-1 s'expressa fonamentalment en la superfície de l'endoteli de les vècules de les plaques de Peyer, així com en altres vècules del budell prim i gruixut¹³⁸. Aquesta molècula pot actuar com a lligand tant de la L-selectina com de la integrina $\alpha_4\beta_7$. Aquestes interaccions estan implicades en la recirculació fisiològica de limfòcits cap a les plaques de Peyer, així com en el reclutament de limfòcits cap al teixit intestinal en condicions de inflamació^{139;140}.

PECAM-1 és un mediador de l'adhesió de leucòcits i plaquetes a cèl.lules endotelials. A més, s'ha postulat que pot intervenir també en l'emigració dels leucòcits a través de les unions entre les cèl.lules endotelials^{141;142}. Aquesta CAM s'expressa en la superfície de les plaquetes, leucòcits, i cèl.lules endotelials. A l'igual que ICAM-2, no modifica de forma significativa el seu grau d'expressió en resposta a estímuls inflamatoris. Per aquest motiu, l'expressió de ICAM-2 i de PECAM-1 s'ha utilitzat com a indicador de la magnitud de la superfície endotelial d'un determinat òrgan¹⁴³.

Figura 4: Estructura molecular de les molècules d'adhesió pertanyents a la família de les immunoglobulines. Es tracta de glicoproteïnes, amb un domini citoplasmàtic (representat per COOH) i un nombre variable de dominis tipus immunoglobulina (representats per cercles), units a cadenes laterals glicosilades.



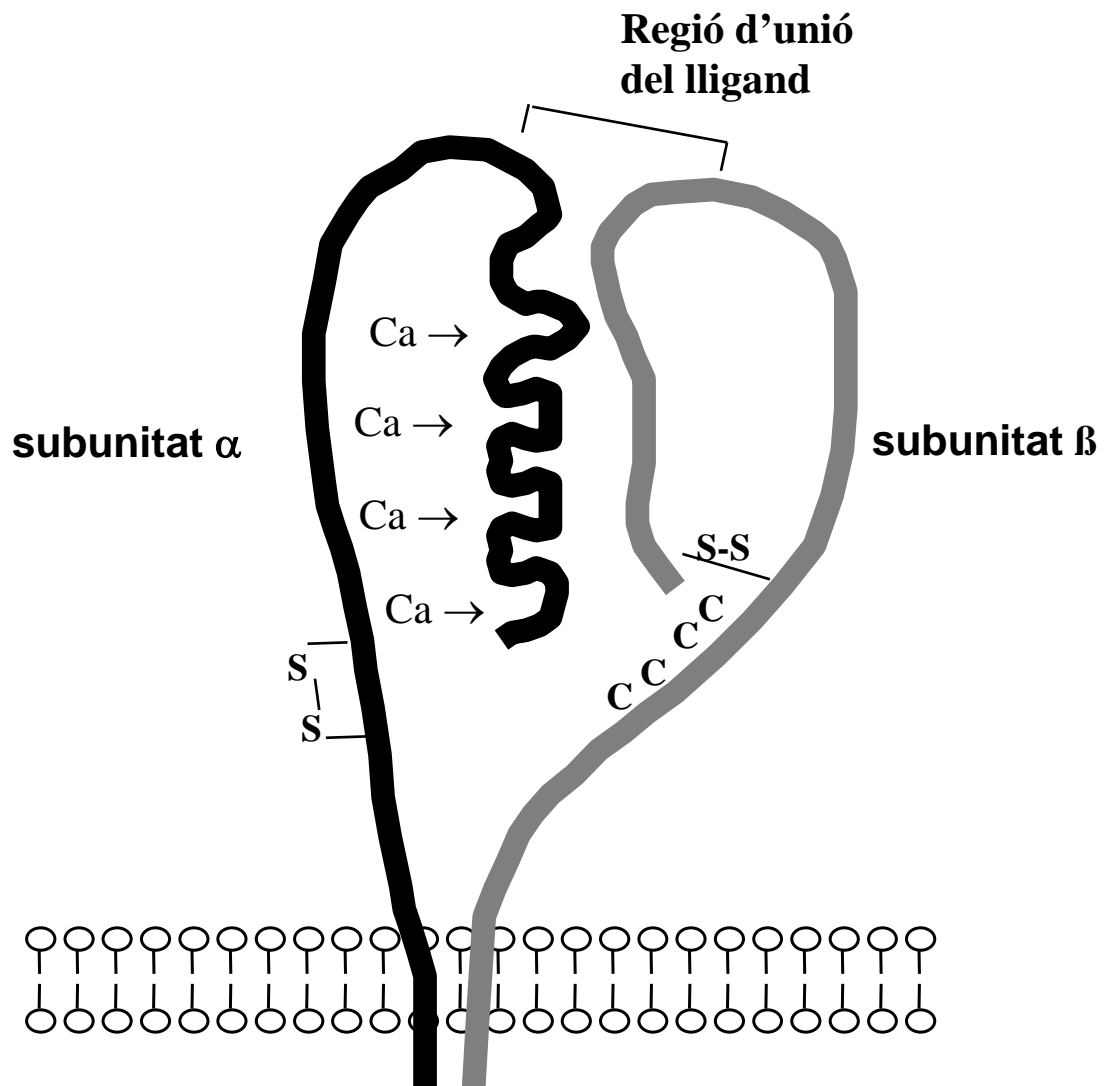
2.3.4.- Integrines:

Les integrines són proteïnes amb una estructura heterodimèrica, resultant de la unió d'una subunitat α i una subunitat β . Els leucòcits poden expressar a la seva superfície 25 integrines diferents que es poden classificar en dos grups que difereixen en la seva afinitat per les diferents immunoglobulines:

Les integrines de la família β_2 estan formades per una subunitat β comú (CD18 o β_2), que pot estar associada amb diferents subunitats α , com CD11a, CD11b o CD11c. Els limfòcits perifèrics expressen fonamentalment CD11a/CD18 (LFA-1), mentre que els neutròfils, monòcits i cèl.lules “*natural killer*” poden expressar qualsevol de les tres subunitats α associada amb la subunitat β_2 ¹⁴⁴. Aquesta família de integrines interacciona amb ICAM-1 i constitueix un important mecanisme d'adhesió leucocitària en la superfície de l'endoteli.

La segona família de integrines presenta la subunitat comú α_4 associada a la subunitat β_1 o β_7 . VLA-4 o $\alpha_4\beta_1$ constitueix el contrarreceptor de VCAM-1, s'expressa en la superfície de limfòcits i monòcits i intervé en l'adhesió ferma en la superfície de les cèl.lules endotelials activades^{145;146}. $\alpha_4\beta_7$ s'expressa selectivament en una subpoblació de leucòcits que colonitza el teixit limfòid associat a la mucosa del budell, reconeix el lligand endotelial MAdCAM-1. Aquesta interacció és essencial per la recirculació dels limfòcits al budell, en condicions fisiològiques^{147;148}. A més de MAdCAM-1, $\alpha_4\beta_7$ pot també interaccionar amb VCAM-1, si bé presenta una menor afinitat per aquesta darrera CAM. En funció de l'estat d'activació de les integrines de la família α_4 , aquestes CAMs poden intervenir en el rodament leucocitària o en l'adhesió ferma dels leucòcits a les cèl.lules de l'endoteli vascular mitjançant la seva interacció amb VCAM-1 i MAdCAM-1.

Figura 5: Estructura molecular de les integrines. Aquestes resulten de la unió no covalent de dues subunitats α i β . L'esquema mostra la contribució d'ambdues subunitats per a constituir el lloc d'unió al seu lligand.



2.3.5.- Evidències existents de la participació de les CAMs en la fisiopatologia de la MII

Les CAMs en la MII humana

La informació que disposem en l'actualitat sobre l'expressió de CAMs en la MII prové d'estudis de immunohistoquímica ¹⁴⁹⁻¹⁵² i d'estudis de quantificació dels nivells plasmàtics de determinades formes solubles d'aquestes CAMs ^{149;153}.

Diversos estudis de immunohistoquímica efectuats a partir de biòpsies endoscòpiques o peces de ressecció han mostrat una notable expressió constitutiva de ICAM-1 tant en pacients amb MII inactiva com en controls sans, i un significatiu increment en l'expressió d'aquesta molècula en les mostres provinents de pacients amb MII activa ^{151;152;154}. S'ha demostrat que MAdCAM-1 s'expressa constitutivament en la làmina pròpia de l'intestí prim i gruixut ¹³⁸. Diversos estudis de immunohistoquímica han descrit que l'expressió de MAdCAM-1 està marcadament incrementada en la mucosa del còlon inflammat en humans amb MC i CU ^{155;156}. En canvi, hi ha una escassa o nul.la expressió constitutiva de VCAM-1 en controls sans i en pacients amb MII inactiva ^{150;157}, mentre que els pacients amb MII en la fase activa presenten un marcat increment de VCAM-1 soluble comparat amb controls sans o pacients en fase inactiva ¹⁴⁹.

Pel que fa a les selectines, els estudis de immunohistoquímica també coincideixen que existeix un major grau d'expressió endotelial de P-selectina ¹⁵¹ i de E-selectina ^{150;157} en les mostres de còlon procedents de pacients amb MII activa comparat amb pacients amb MII inactiva o controls sans. En canvi, els estudis en els quals es quantifica els nivells circulants de L-selectina mostren resultats contradictoris ^{149;153}.

Pel que fa a les CAMs leucocitàries s'ha trobat que l'expressió de β_2 està marcadament incrementada en monòcits de sang perifèrica de pacients amb MC però no amb CU ¹⁵⁸. Un estudi de immunohistoquímica en biòpsies de mucosa intestinal ha demostrat un notable augment en l'expressió de les integrines β_2 , amb CD11a/CD18 majoritàriament expressades en les cèl.lules mononuclears i CD11b/CD18 en neutròfils, i un increment de ICAM-1 en els limfòcits ¹⁵⁹.

Les CAMs en la colitis experimental

Les CAMs que van merèixer l'atenció dels primers estudis en el camp de la MII van ser MAdCAM-1 i el seu contrarreceptor leucocitari $\alpha_4\beta_7$. Diversos estudis van demostrar que el bloqueig selectiu de MAdCAM-1 ¹⁶⁰, la integrina $\alpha_4\beta_7$ ¹⁶¹, o les integrines amb subunitat α_4 ¹⁶² mitjançant l'administració d'anticossos monoclonals atenua de forma significativa la colitis experimental. Un altre estudi va demostrar que el bloqueig de ICAM-1 millora la colitis induïda per àcid acètic a la rata ¹⁶³.

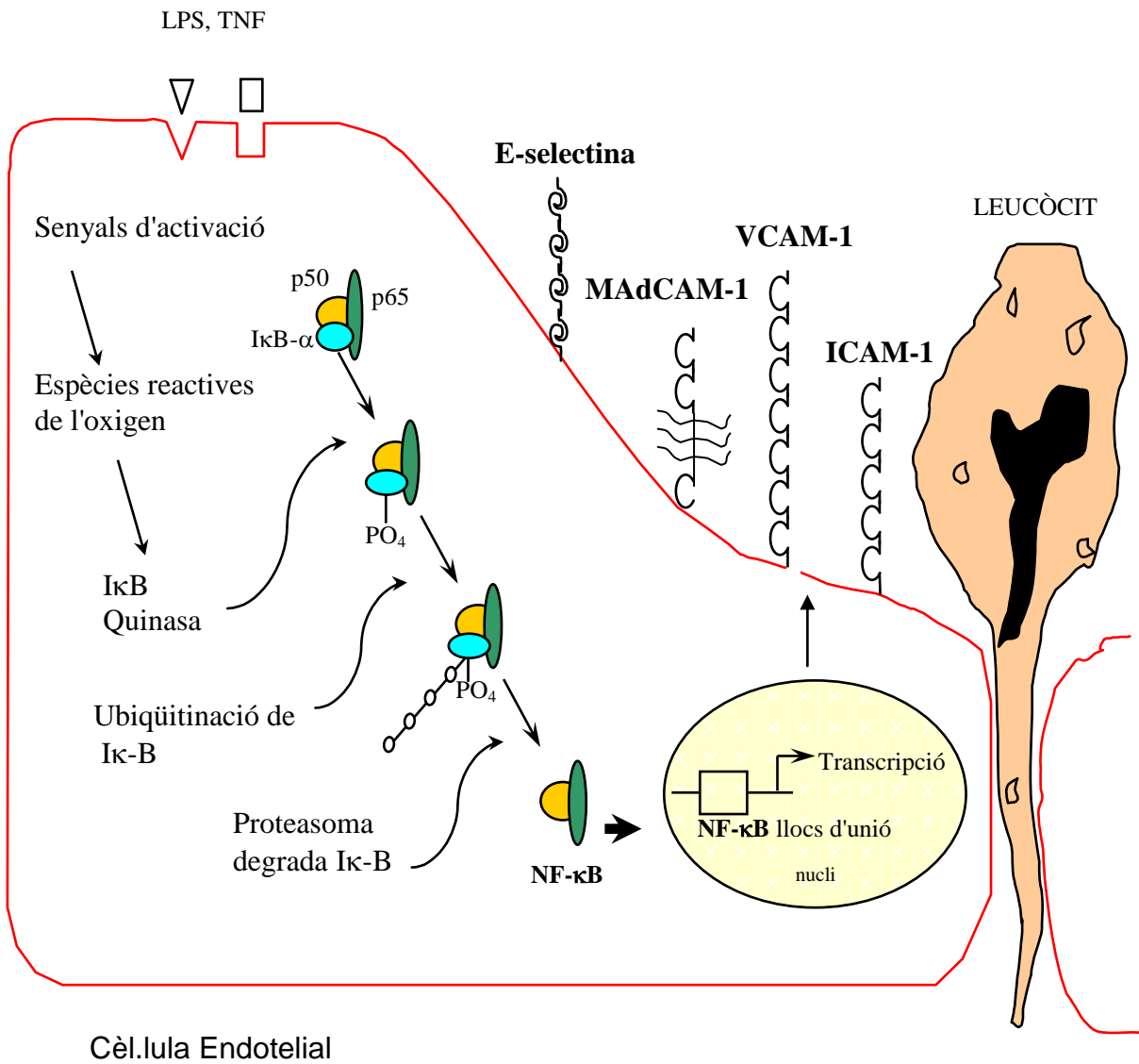
Estudis més recents incorporen informació sobre l'expressió de les CAMs en diferents models experimentals de colitis. Alguns d'aquests estudis han utilitzat la tècnica del doble anticòs marcat per a quantificar l'expressió de les CAMs. Així, s'ha demostrat que les expressions de P-selectina i E-selectina estan marcadament incrementades en la colitis experimental per TNBS i que el tractament d'immunobloqueig amb anticossos anti-P-selectina atenua significativament el rodament leucocitari ¹⁶⁴. Per altra banda, s'ha determinat que hi ha un marcat increment en l'expressió endotelial de ICAM-1, VCAM-1 i MAdCAM-1 al còlon en la colitis experimental en ratolins IL-10^{-/-} ¹⁶⁵ i el model induït per la transferència de limfòcits CD45RB^{high} a ratolins immunodeficients SCID ¹⁶⁶. Els animals genèticament deficients en ICAM-1 i en P-selectina també desenvolupen colitis després de l'administració de TNBS i, de fet, la seva mortalitat és superior a la dels ratolins de la soca salvatge sense aquestes deficiències genètiques ^{167;168}. Un estudi posterior va posar de manifest la implicació de VCAM-1 i ICAM-1 en l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular en el model experimental de colitis induïda per TNBS en rata ¹⁶⁹. Paral·lelament, un estudi comparatiu d'immunobloqueig de les diferents molècules d'adhesió va determinar que el bloqueig de VCAM-1, però no de ICAM-1 o

MAdCAM-1 millora la severitat clínica i les lesions macroscòpiques en la colitis experimental induïda per DSS en ratolí ¹⁴³. La disminució en l'expressió de CAMs s'ha postulat com un dels mecanismes d'acció de la ciclosporina en la MII ¹⁷⁰.

2.3.6.- Regulació de l'expressió de les CAMs

La inducció de l'expressió gènica és un mecanisme regulador clau que requereix de l'activació de proteïnes activadores de la transcripció que s'uneixen a l'ADN en resposta a un estímul proinflamatori específic. De tots els factors de transcripció descrits, NF- κ B i AP-1 semblen ser els més rellevants en la regulació dels gens implicats en la resposta inflamatòria. S'han identificat llocs de unió per NF- κ B en les regions promotores dels gens de E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1 ¹⁷¹, en aquesta última CAM també s'ha identificat un lloc d'unió a AP-1. La regulació de l'expressió de MAdCAM *in vivo* no es coneix en profunditat. El factor NF- κ B juga un paper molt important en la inducció d'aquests gens en resposta a diferents estímuls com citocines proinflamatòries, LPS i MRO ^{91-95;172} (Figura 6). NF- κ B s'ha trobat activat tant en diversos models experimentals de colitis ^{173;174} com en la MII humana ^{174;175}. Aquesta activació es restringeix a les àrees amb inflamació activa tant en MC com en CU, i té lloc tant en les cèl.lules mononuclears de la làmina pròpia com en les cèl.lules epitelials intestinals ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Figura 6. Esquema d'activació de NF- κ B en les cèl.lules endotelials i estimulació de la síntesi de CAMs en resposta a estímuls proinflamatoris.



Les CAMs com a diana terapèutica

La intervenció en els passos inicials de la inflamació, quan els leucòcits s'adhereixen a l'endoteli vascular i migren cap a l'interior del teixit, representa una nova estratègia terapèutica en el tractament de la MII. En aquest sentit, la modulació de la funció de les CAMs que participen en el reclutament leucocitari per tal d'atenuar l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli i inhibir la inflamació és un dels objectius d'algunes de les noves teràpies en estudi.

La família de les integrines leucocitàries amb subunitat α_4 , que es combina amb la subunitat β_1 o β_7 , constitueixen els contrarreceptors leucocitaris que interaccionen principalment amb VCAM-1 i MAdCAM-1 respectivament. Un estudi en pacients amb MII va posar de manifest que les cèl·lules endotelials obtingudes de la mucosa de l'intestí inflamat presenten un increment de l'adhesió a leucòcits que és dependent de α_4 ¹⁷⁷. Per altra banda, l'increment en l'expressió de ICAM-1 contribueix a l'adhesió i migració leucocitària al còlon en resposta a diferents estímuls inflamatoris^{169;178}.

Considerant la importància de les integrines amb subunitat α_4 i ICAM-1 en la patogènesi de la MII s'han desenvolupat diferents estratègies biològiques front a aquestes dianes terapèutiques com l'immunolocalització de les integrines amb subunitat α_4 i la inhibició de l'expressió de ICAM-1.

Natalizumab és un anticòs recombinant humanitzat obtingut a partir d'un anticòs monoclonal murí dirigit contra la subunitat de la integrina humana α_4 . La immunoneutralització de la integrina α_4 utilitzant l'anticòs natalizumab, és eficaç per induir, i sobretot per mantenir la remissió en pacients amb MC¹⁷⁹, mentre que el bloqueig de la integrina $\alpha_4\beta_7$ s'ha demostrat altament efectiu en el tractament de la CU¹⁸⁰. Per altra banda, alicaforsen, o ISIS 2302, és un oligonucleòid antisentit per a ICAM-1 que inhibeix la síntesi d'aquesta CAM. Diferents estudis han avaluat l'eficàcia de l'estratègia terapèutica de l'administració d'alicaforfen en la teràpia de la MII humana i els resultats obtinguts fins al moment han sigut contradictoris. Per una banda, un estudi pilot en pacients amb MC lleu o moderada tractats amb alicaforsen ha posat de manifest que l'administració d'aquest antisentit en la teràpia de la MC

activa crònicament causa una atenuació de la resposta inflamatòria ¹⁸¹. De manera similar, l'administració d'alicaforsen en enemes en pacients amb CU distal amb activitat de la malaltia lleu o moderada va demostrar una millora clínica de l'activitat de la malaltia i la remissió endoscòpica ¹⁸². Un altre estudi, en canvi, va avaluar l'efecte del tractament amb alicaforsen en pacients amb MC refractària a esteroides i els resultats obtinguts van demostrar que aquesta teràpia no genera un efecte beneficiós en el curs de la malaltia ¹⁸³.

Els MRO tenen un paper essencial en la regulació de diferents gens implicats en la resposta immune i inflamatòria. Entre aquests gens es troben aquells que codifiquen les CAMs, com VCAM-1, MAdCAM-1, ICAM-1 i E-selectina. En la present Tesi Doctoral ens vam proposar investigar si la reducció de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració de suplementos de SOD proporciona una millora en el curs de la colitis en diferents models experimentals i, si és així, determinar els possibles mecanismes a través dels quals SOD cofereix protecció, especialment, determinar l'impacte de l'atenuació de l'estrès oxidatiu sobre la modulació de l'expressió de CAMs i el reclutament leucocitari en la colitis experimental. El fet que no existeixi un model animal de MII que reproduï exactament la malaltia humana fa necessari que la mateixa estratègia sigui provada en diferents models per tal d'analitzar les divergències i poder predir amb més certesa el que pot passar en la malaltia humana.

3.- METODOLOGIA

3.1.- Models experimentals de colitis

Existeix un gran nombre de models experimentals de colitis, la majoria dels quals han estat desenvolupats en rata o ratolí i presenten característiques clíniques i morfològiques similars, fins a cert punt, a les pròpies dels pacients amb MC i CU. En l'actualitat no existeix un consens sobre quin és, globalment, el millor model de colitis experimental. Així, en funció de quin sigui l'aspecte concret de la MII que es vol estudiar un model de colitis serà més o menys adequat. A continuació es descriuen breument els models de colitis experimental que s'han utilitzat en els diferents treballs de recerca que conformen la present Tesi Doctoral.

3.1.- Colitis induïda per TNBS en rata

El model de colitis induïda per l'administració intracolònica de TNBS va ser descrit l'any 1989 per Morris ¹⁸⁴ i ha estat un dels més freqüentment utilitzats des d'aleshores. Si bé aquest model es va descriure inicialment en rata, la colitis també es pot induir en altres espècies, com ratolí ¹⁷⁴ i conill ¹⁸⁵, per l'administració intracolònica de TNBS.

La colitis per TNBS en rata es caracteritza, macroscòpicament, per l'aparició de grans úlceres, la presència d'estenosi al còlon i adherències entre el còlon i les nances del budell prim i l'engruiximent de la paret de la meitat distal del còlon. Els animals presenten diarrea, en ocasions sanguinolenta, i experimenten una important pèrdua de pes corporal que pot arribar al 30% ^{184;186;187}. La mortalitat en les 2 setmanes que segueix a la inducció de la colitis sol ser del 15-20%. Histològicament es caracteritza per un marcat increment d'infiltració leucocitària, l'alteració de l'arquitectura, destrucció glandular, disminució de la població de cèl.lules caliciformes i, en ocasions, granulomes. Globalment, la intensitat de les lesions és màxima 7 dies després de l'administració de TNBS, s'ha descrit la persistència de les mateixes amb lenta tendència a la curació en els 2-3 mesos següents ^{169;184;186}.

En aquest model experimental de colitis s'ha descrit un increment significatiu del reclutament leucocitari, que està modulada per la sobreexpressió de CAMs, i un marcat increment en la concentració de MRO al teixit colònic ^{164;169;178}. S'ha

demostrat que l'increment en la concentració de MRO, com a resultat del metabolisme del TNBS en el còlon, està implicat en la fisiopatogènia de la colitis en aquest model experimental ¹⁸⁸.

3.1.2.- Colitis espontània en ratolins deficients en IL-10

L'eliminació de diferents gens implicats en la resposta immune constitueix una estratègia important per al desenvolupament de models experimentals de colitis i per al coneixement de la importància d'aquests gens en la patogènia de la malaltia ¹⁸⁹⁻¹⁹⁴. Un d'aquests models experimentals és la colitis espontània desenvolupada per ratolins IL-10^{-/-}. IL-10 és una citocina produïda per limfòcits T ¹⁹⁵, limfòcits B ¹⁹⁶ i monòcits ¹⁹⁷ amb una potent activitat immunoreguladora i antiinflamatòria. Actua reduïnt la proliferació de limfòcits T per la disminució de la capacitat presentadora d'antigen dels monòcits ¹⁹⁸, inhibeix la producció de citocines proinflamatòries com IL-1 α , IL-6 i TNF- α ^{199;200} i les funcions fagocítica i bactericida dels neutròfils així com la capacitat productora de MRO en macròfags, neutròfils i monòcits ²⁰¹⁻²⁰³.

Aquest model animal va ser descrit l'any 1993 per Kuhn ²⁰⁴, es caracteritza per ser un model de colitis crònic que es desenvolupa espontàniament i presenta característiques semblants a la MC a les 16 setmanes de vida en condicions convencionals d'estabulació ²⁰⁴⁻²⁰⁷. En canvi, aquells animals mantinguts en condicions lliures de patògens no desenvolupen inflamació intestinal ^{208;209}.

El desenvolupament de la colitis en aquest model animal està associat a l'escurçament i engruiximent del còlon sense que s'apreciïn ulceracions macroscòpiques en la mucosa del còlon ²⁰⁴. Histològicament, es caracteritza per un increment en el gruix de la mucosa, la presència d'úlceres i abscessos a la cripta, la infiltració de cèl.lules inflamatòries al teixit i la disminució de la població de cèl.lules caliciformes ²⁰⁴. La colitis es desenvolupa tant al cec com al còlon proximal i està associada a la infiltració d'un gran nombre de leucòcits, com els limfòcits, monòcits i cèl.lules plasmàtiques. En aquest model experimental de colitis s'ha descrit la sobreexpressió de MRO, MRN, citocines proinflamatòries i diferents CAMs com ICAM-1, VCAM-1 i MAdCAM-1 al còlon i cec ¹⁶⁵.

3.1.3.- Colitis induïda per DSS en ratolí

El model de colitis induït per l'administració de DSS va ser descrit l'any 1990 per Okayasu ²¹⁰. En aquest model experimental s'indueix colitis a ratolins mitjançant l'administració de DSS dissolt en aigua de beguda. En la literatura trobem que l'administració de DSS s'ha fet a diferents dosis, durant diferents períodes de temps i administrat de manera continuada o a cicles per tal d'obtenir diferents graus de severitat de colitis. En la colitis aguda per DSS s'administra DSS al 3-5% durant 6-10 dies, i es caracteritza, clínicament, per la presència de diarrea, sang a la femta i pèrdua de pes corporal. El còlon d'aquests animals està escurçat i engruixit, sense que s'apreciïn habitualment ulceracions macroscòpiques en la mucosa del còlon ²¹¹. Histològicament, existeix una afectació difusa, limitada a la mucosa, amb infiltrat leucocitari i alteració de l'arquitectura glandular ^{210;211}. En aquest model experimental de colitis s'ha descrit la implicació en el desenvolupament de la colitis de la sobreexpressió de ICAM-1, VCAM-1 i MAdCAM-1 en el còlon i el cec que s'associa a un marcat increment en les interaccions leucòcit-endoteli al còlon ¹⁴³.

En la present Tesi Doctoral hem fet servir una concentració de DSS del 3% en aigua de beguda durant 6 dies per a la inducció de colitis. La dosi escollida ha sigut calculada empíricament per a induir colitis i minimitzar la mortalitat dels ratolins tenint en compte la sensibilitat de la soca de ratolins en la inducció de la colitis per DSS ²¹².

3.2.- Avaluació de les interaccions leucòcit-endoteli en la microcirculació colònica mitjançant microscopia intravital

La tècnica de la microscopia intravital permet l'estudi de les interaccions que els leucòcits estableixen amb l'endoteli en un segment venular. Els leucòcits que interaccionen amb la superfície endotelial es poden visualitzar directament ja que presenten una marcada reducció de la seva velocitat en relació a la velocitat mitja del flux sanguini de la vènula (Figura 7). Per realitzar un estudi acurat de les interaccions leucòcit-endoteli s'efectua l'enregistrament de la vènula durant un minut mitjançant una videocàmera i posteriorment es realitza una anàlisi detallada. Els paràmetres de major interès són el “nombre de leucòcits adherits a l'endoteli” (nombre de leucòcits immòbils durant més de 30 segons en una porció de 100 µm de vènula) i el “flux de leucòcits amb interaccions de rodament” (nombre de leucòcits que exhibeixen fenòmens de rodament travessant un punt determinat de la vènula).

Per l'estudi del messenteri s'utilitza un microscopi convencional, sense tinció dels leucòcits amb un fluorocrom ni ús de fluorescència, ja que els leucòcits es poden visualitzar per transil.luminació (Figura 8). Aquesta tècnica permet l'estudi de la permeabilitat vascular mitjançant l'administració endovenosa d'albúmina marcada amb fluoresceïna. A més del messenteri, aquesta tècnica ha estat utilitzada per a l'estudi de la microcirculació d'altres òrgans com el cervell ²¹³, fetge ²¹⁴, múscle ²¹⁵, pell ²¹⁵, estómac ²¹⁶ i plaques de Peyer de l'intestí prim ²¹⁷.

En la present Tesi Doctoral vam utilitzar aquesta tècnica per avaluar els canvis en les interaccions leucòcit-endoteli en la microcirculació del còlon. Donat que el gruix de la paret d'aquest òrgan no permet l'estudi de la microcirculació colònica per transil.luminació es van marcar els leucòcits mitjançant l'administració subcutània del fluorocrom rodamina-6G i es va utilitzar un microscopi de fluorescència. La microscopia intravital en aquest òrgan no permet visualitzar els leucòcits que han emigrat a l'interstici ni tampoc estudiar la permeabilitat vascular.

Figura 7. Imatge de microscòpia intravital on es mostra la seqüència d'interaccions leucòcit-endoteli.

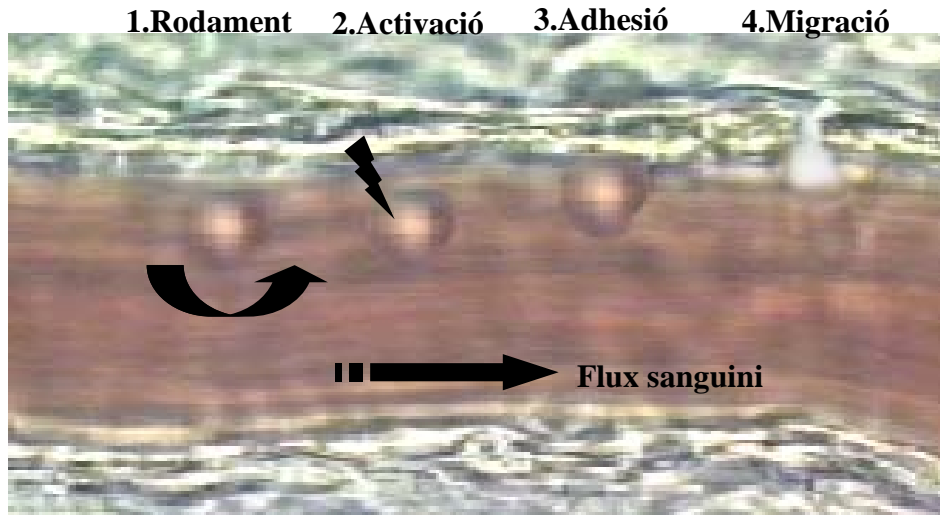
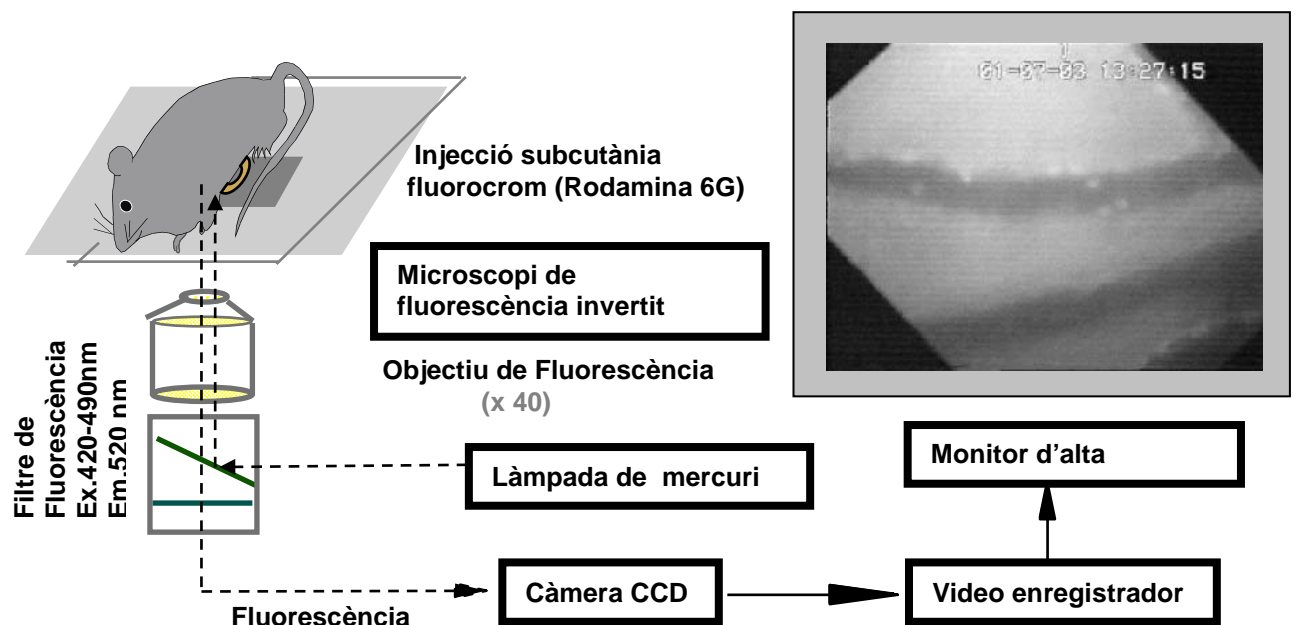


Figura 8. Gràfic representatiu de la tècnica de microscòpia intravital del còlon.

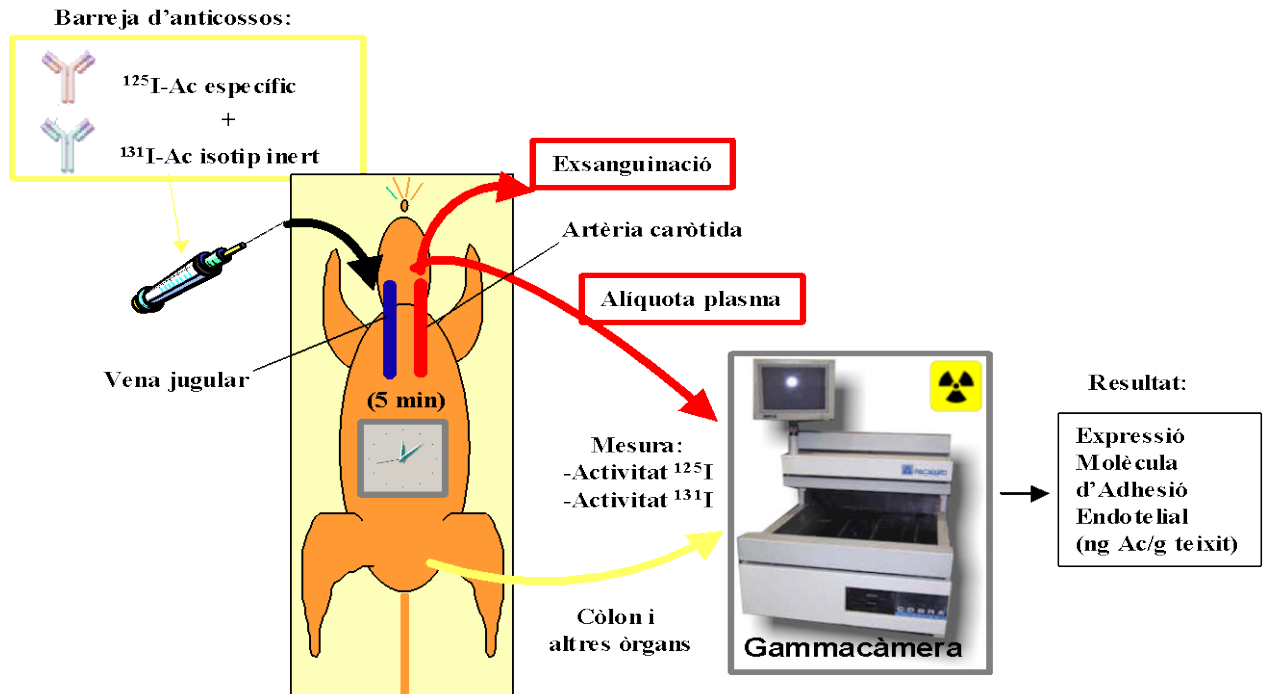


3.3.- Quantificació de l'expressió endotelial de CAMs *in vivo* mitjançant la tècnica del doble anticòs marcat

L'estudi del grau d'expressió de les CAMs a nivell de la superfície endotelial s'ha basat, clàssicament, en la realització d'estudis d'immunohistoquímica¹⁵⁰⁻¹⁵². No obstant, aquesta metodologia té diversos desavantatges. En primer lloc, no permet realitzar una quantificació acurada del grau d'expressió de les CAMs i, en segon lloc, pot resultar poc útil per apreciar variacions en l'expressió d'aquelles molècules que ja s'expressen basalment a l'endoteli, o bé de molècules l'expressió de les quals és petita. En aquest darrer cas un increment percentual important en l'expressió d'aquestes molècules pot comportar una expressió encara escassa en valor absolut que es traduirà en una tinció tènue de l'endoteli en fer l'estudi immunohistoquímic.

Amb l'objectiu de quantificar *in vivo* i de forma precisa l'expressió de les CAMs el grup de recerca en el que s'ha realitzat aquesta Tesi Doctoral va desenvolupar la tècnica que del doble anticòs marcat¹³⁴ (Figura 9). Aquesta tècnica consisteix en l'administració endovenosa (vena jugular esquerra) d'una barreja d'anticòsos constituïda per un anticòs monoclonal, anticòs enllaçant, marcat amb ¹²⁵I dirigit contra la molècula d'estudi i un segon anticòs monoclonal inert, anticòs no enllaçant, marcat amb ¹³¹I que permetrà compensar el possible acúmulo inespecífic de l'anticòs enllaçant per altres causes que no sigui la unió específica a la molècula d'interès. Cinc minuts després de l'administració de la barreja d'anticòsos es pren una mostra de sang a través de l'artèria caròtida dreta que es centrifuga per obtenir 100 µl de plasma. Posteriorment, s'exanguina l'animal a través de l'artèria caròtida dreta amb reposició simultània de volum mitjançant la injecció de tampó salí fostat (PBS) a través de la vena jugular esquerra. A continuació es recullen els diferents òrgans, es pesen i es quantifica la radiactivitat acumulada dels isòtops de iode en els diferents òrgans mitjançant una gammacàmera.

Figura 9. Gràfic representatiu de la metodologia de la tècnica del doble anticòs marcat.



L'expressió de la CAM es calcula a partir de la següent fórmula. El resultat s'expressa en ng d'anticòs per gram de teixit (ng Ac/g teixit).

Expressió d'una molècula d'adhesió (en ng Ac / g teixit) =

$$\left[\frac{\text{cpm } ^{125}\text{I } \grave{\text{o}}\text{rgan} / \text{g}}{\text{cpm } ^{125}\text{I injectat}} - \frac{\text{cpm } ^{131}\text{I } \grave{\text{o}}\text{rgan} / \text{g}}{\text{cpm } ^{131}\text{I injectat}} \times \frac{\text{cpm } ^{125}\text{I plasma}}{\text{cpm } ^{131}\text{I plasma}} \right] \times \text{ng Ac injectat}$$

De forma que:

-cpm ¹²⁵I òrgan: Activitat del ¹²⁵I acumulat en un òrgan quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera.

-cpm ¹³¹I òrgan: Activitat del ¹³¹I acumulat en un òrgan quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera.

-cpm ¹²⁵I injectat: Activitat total del ¹²⁵I que es troba unit a l'anticòs específic que s'injecta per via endovenosa quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera. Es calcula a partir d'una alíquota de 5 µl de la barreja d'anticossos abans de ser injectada.

-cpm ¹³¹I injectat: Activitat total del ¹³¹I que es troba unit a l'anticòs inespecífic o no enllaçant que s'injecta per via endovenosa quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera. Es calcula a partir d'una alíquota de 5 µl de la barreja d'anticossos abans de ser injectada.

-cpm ¹²⁵I en plasma: Activitat ¹²⁵I residual que conté el plasma 5 minuts després de l'administració endovenosa de la barreja d'anticossos, quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera. Es calcula a partir d'una mostra de 100 µl de plasma.

-cpm ¹³¹I en plasma: Activitat ¹³¹I residual que conté el plasma 5 minuts després de l'administració endovenosa de la barreja d'anticossos, quantificada en comptes per minut i mesurada mitjançant una gammacàmera. Es calcula a partir d'una mostra de 100 µ de plasma.

-ng Ac injectat: ng d'anticòs específic que s'injecten per via endovenosa

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per quantificar l'expressió de diferents CAMs en diversos teixits tant en condicions basals com en diferents condicions experimentals de inflamació ^{124;143;218-221}.

4.- JUSTIFICACIO

4.1.- Justificació general

La MII és una patologia relativament freqüent que afecta sovint a pacients joves condicionant de forma molt important la seva qualitat de vida donat el seu curs crònic i evolució en brots. Clàssicament, el tractament d'aquesta malaltia ha tingut com a objectiu la inducció i manteniment de la remissió basant-se en l'ús d'antiinflamatoris o immunosupressors com els corticoesteròids, els aminossalicilats, l'azatioprina i la ciclosporina. No obstant, l'ús d'aquests fàrmacs s'associa a efectes adversos importants i un nombre considerable de pacients és refractari a les teràpies tradicionals requerint cirurgia pel control de la seva malaltia.

El fet que la majoria de les teràpies antiinflamatòries usades a la MII s'hagin adoptat d'altres disciplines com l'oncologia i la immunologia del trasplantament explica la incapacitat que tenen de modificar la història natural d'aquesta malaltia. Els mecanismes d'acció d'aquests fàrmacs són sovint desconeguts cosa que ha dificultat el desenvolupament de noves teràpies.

En els últims anys, el coneixement dels mecanismes immunològics implicats en la patogènesi de la MII ha millorat considerablement la qual cosa ha portat a la identificació de potencials dianes terapèutiques. Gràcies a aquest avenç científic s'estan estudiant nous tipus de fàrmacs designats *biològics* que bloquegen específicament un procés molecular que es considera clau en la patogènesi de la MII. En aquest sentit, l'eficàcia clínica que s'està obtenint en la utilització de l'anticòs anti-TNF- α , o infliximab, que és l'única teràpia biològica provada fins al moment en la MC²²² i CU²²³ en humans, i els resultats prometedors d'altres teràpies biològiques en estudi, com immunobloqueig dels contrarreceptors de les CAMs membres de la família α_4 , natalizumab, obren les noves portes en la investigació sobre el tractament d'aquesta malaltia en aquesta direcció.

Els treballs que integren la present Tesi Doctoral tenen com a objectiu avaluar l'efecte d'una estratègia biològica en la MII, com és la reducció de l'estrès oxidatiu en el curs de la malaltia, i investigar els mecanismes d'acció mitjançant els quals aquesta estratègia terapèutica confereix protecció. Paral·lelament, també s'ha tingut com a

objectiu aprofundir en el coneixement d'aspectes mecanístics d'aquesta aproximació terapèutica. En aquest sentit, en ambdós estudis s'han comparat els resultats obtinguts en resposta al tractament amb antioxidants en tres models experimentals de colítis. En el primer treball vam avaluar l'impacte de l'administració de suplementes de SOD en el model experimental de colitis induït per TNBS des del punt de vista d'alteracions clíniques, morfològiques, bioquímiques i enzimàtiques, així mateix vam estudiar els possibles mecanismes d'acció de la SOD en la modulació de VCAM-1 i el reclutament leucocitari. En el segon estudi vam aprofundir en la investigació mecanística de l'acció terapèutica de l'administració de SOD sobre la modulació de les CAMs, en concret sobre MAdCAM-1 i VCAM-1, en ratolins IL-10^{-/-} i el seu impacte sobre el reclutament leucocitari, així com l'efecte preventiu de la SOD front al desenvolupament de la inflamació colònica quan s'administra profilàcticament en el model de colitis agut induït per DSS.

Els diferents estudis que comprenen la present Tesi Doctoral mostren una gran varietat metodològica que ens ha permès explorar diferents aspectes de la MII des de diferents punts de vista. Dels resultats obtinguts en aquests estudis vam tenir en compte els punts febles de cada mètode i vam considerar que l'efecte beneficiós del tractament en diferents models animals constitueix la base per al desenvolupament clínic d'aquesta aproximació terapèutica en humans.

4.2.- Justificació de l'estudi 1:

S'han caracteritzat diferents factors implicats en la fisiopatologia de la MII humana, un d'ells és la sobreexpressió de MRO com O_2^- , HClO, OH^- , H_2O_2 i $ONOO^-$ que no són merament metabòlits del procés inflamatori sinó que estan directament implicats en la patologia de la MII ^{23;103-105}. Entre aquestes espècies, O_2^- té un paper essencial en el desenvolupament del procés inflamatori ja que l'estrès oxidatiu s'inicia i propaga per la sobreexpressió d'aquesta espècie radicalària. Els sistemes biològics posseeixen un conjunt de mecanismes defensius enzimàtics antioxidants per regular la sobreexpressió dels MRO, entre els que es troba la SOD que és l'enzim que inicia el procés de detoxificació transformant el O_2^- en O_2 i H_2O_2 . S'ha demostrat que l'activitat i els nivells de SOD en la mucosa intestinal de pacients amb MII activa es troben alterats ¹¹⁶. Tenint en compte aquestes consideracions, l'atenuació de l'estrès oxidatiu com a resultat l'administració de SOD pot constituir una important diana terapèutica en el tractament de la MII.

Estudis previs han fet servir diferents estratègies experimentals per determinar l'eficàcia de l'increment de la producció d'aquest enzim en la patogènesi de la MII però els resultats obtinguts han sigut contradictoris i no han resolt el seu objectiu. En aquest sentit, s'ha descrit que tractament amb SOD causa un efecte beneficiós en la prevenció de la colitis experimental ^{104;224} i que l'administració d'un mimètic de SOD, anomenat M40403, és una teràpia efectiva en el tractament de la colitis establerta ²²⁵. Altres estudis, en canvi, han suggerit que la sobreexpressió de SOD per ratolins transgènics origina una colitis més severa ²²⁶ o una reducció de la infiltració de neutròfils sense afectar la severitat clínica i la severitat de la valoració de la histologia de la colitis ²²⁷. Per tant, l'avaluació dels efectes de la SOD en la MII està justificada, especialment per a dilucidar el possible valor terapèutic d'aquesta estratègia en la colitis establerta.

Un aspecte clau en la patogènesi del procés inflamatori és el reclutament leucocitari, en el que participen coordinadament la sobreexpressió de CAMs juntament amb l'activació dels contrarreceptors leucocitaris d'aquestes molècules. Estudis previs en el nostre grup de treball han demostrat la importància de la sobreexpressió de VCAM-1 en el curs de la colitis. En particular, el reclutament leucocitari i el dany en

la mucosa estan significativament atenuats en resposta a l'immunobloqueig d'aquesta CAM en diferents models experimentals de colitis ^{143;169}. La comparació directa de l'eficàcia relativa de la immunoneutralització de ICAM-1, MAdCAM-1 i VCAM-1 en el tractament de la colitis experimental mostra que l'immunobloqueig de la darrera CAM és l'estratègia més efectiva ¹⁴³. Paral·lelament, s'ha descrit que la immunoneutralització de la integrina α_4 , el contrarreceptor leucocitari de VCAM-1 i MAdCAM-1, és una estratègia efectiva en el tractament de la MC ^{179;228} i que la seva eficàcia és similar a les estratègies d'immunobloqueig de TNF- α ²²⁹.

S'ha demostrat la implicació dels MRO en la inducció de la sobreexpressió de VCAM-1 per síntesi *de novo*. L'anàlisi funcional del promotor humà de VCAM-1 ha demostrat que diferents factors de transcripció sensibles a estrès oxidatiu estan associats a l'activació de l'expressió del gen VCAM-1 en resposta a IL-1 β i TNF- α ^{73;74}. Paral·lelament, un estudi *in vitro* ha suggerit que l'expressió de SOD, però no catalasa, per adenovirus suprimeix l'acúmul d'ARNm de VCAM-1 induït per TNF- α ⁷³.

Tenint en compte aquestes consideracions es va dissenyar un estudi per avaluar si el tractament amb SOD confereix protecció en la colitis experimental establerta induïda per l'administració intracolònica de TNBS, i si és així, determinar els possibles mecanismes a través dels quals SOD pot exercir protecció, en particular els seus efectes sobre l'expressió de VCAM-1 i el reclutament leucocitari.

4.3.- Justificació de l'estudi 2:

Tot i que la resposta immune de la MII no està totalment caracteritzada es coneix que la resposta inflamatòria es deu a una ràpida i prolonga infiltració de leucòcits al teixit juntament amb el lliurament de diferents mediadors que presenten un paper clau en la resposta inflamatòria com els MRO, metabòlits de l'àcid araquidònic, citocines i proteases. Un factor essencial en la patogènia de la MII és la sobreexpressió de les CAMs que s'expressen en la superfície de les cèl.lules endotelials vasculares i que modulen el reclutament leucocitari. Tant els leucòcits com aquestes molècules participen en el procés de transmigració dels leucòcits des del compartiment vascular a l'interior del teixit on causen la resposta immune i inflamatòria.

VCAM-1 i MAdCAM-1 són CAMs de la família de les immunoglobulines amb un paper crític en la mediació de l'adhesió ferma dels leucòcits sobre les cèl.lules endotelials en diferents malalties inflamatòries cròniques i agudes^{67;230}. Ambdues CAMs estan sobreexpressades tant en models experimentals com en la MII humana i la rellevància funcional de l'increment en l'expressió de les CAMs s'ha determinat mitjançant estudis d'immunobloqueig que han demostrat un efecte beneficiós en el tractament de la colitis^{143;160}. Tot i que l'efectivitat d'aquesta estratègia terapèutica no ha estat assajada en la MII en humans, la immunoneutralització dels contrarceptors leucocitaris corresponents a VCAM-1 i MAdCAM-1, les integrines membres de la família α_4 , ha demostrat que és altament efectiva en el tractament de la CU^{231;232} i MC^{179;228}.

Els MRO tenen un paper important en l'activació de gens implicats en la regulació de la resposta immune i inflamatòria. S'ha demostrat que l'activació del promotor humà de VCAM-1 és sensible a diferents factors dependents d'estrès oxidatiu^{73;74}. En canvi, la regulació de l'expressió de MAdCAM-1 en el teixit de la mucosa *in vivo* no es coneix en profunditat. Diferents estudis *in vitro* fent servir cèl.lules de vènula umbilical han demostrat que la sobreexpressió de MAdCAM-1 en resposta a l'estimulació amb TNF- α és dependent d'estrès oxidatiu ja que el tractament amb antioxidants prevé la sobreexpressió de MAdCAM-1 induïda per TNF- α ^{70;76}.

En el primer estudi que forma part d'aquesta Tesi Doctoral vam demostrar que el tractament amb SOD disminueix l'expressió de VCAM-1 i el reclutament leucocitari, cosa que va causar una millora clínica i histològica en el curs de la colitis, en el model experimental induït per TNBS. Tot i que aquest estudi es va realitzar en un model experimental de colitis establerta, l'assaig de l'eficàcia d'aquesta estratègia terapèutica en un model de colitis immune sembla convenient ja que cap model experimental de MII reproduceix completament la patologia d'aquesta malaltia en humans. Així doncs, l'obtenció de conclusions consistents en diferents models experimentals incrementa la probabilitat de que la utilització d'aquesta estratègia terapèutica sigui efectiva en la MII humana. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi és caracteritzar els efectes de l'administració de suplementes de SOD en un model experimental de colitis immune i crònic com el model murí IL-10^{-/-}. En aquest estudi ens vam proposar, a més, aprofundir en el coneixement dels mecanismes d'acció de l'impacte de la reducció de l'estrès oxidatiu en la modulació de l'expressió de CAMs, en concret, VCAM-1 i MAdCAM-1, el reclutament leucocitari, els nivells de LPO al teixit colònic i els nivells de biomarcadors de la gravetat de la colitis en en ratolins IL-10^{-/-} i ratolins de la soca salvatge, i determinar si el tractament amb suplementes de SOD té capacitat de prevenir el desenvolupament de la inflamació colònica quan s'administra profilàcticament en un model de colitis induït per DSS.

5.- MATERIALS I METODES

5.1.- Materials i mètodes de l'estudi 1:

La inducció de colitis es va realitzar mitjançant l'administració intracolònica de 30 mg de TNBS en 0.25 ml 50% etanol (vol/vol) a rates Sprague-Dawley ¹⁸⁴. El grup control va rebre 0.25 ml de 50% etanol (vol/vol) sense TNBS. Els animals colítics es van separar en diferents grups de tractament que van rebre injeccions subcutànies de 1 mg/kg/dia de SOD, 4 mg/kg/dia de SOD, 13 mg/kg/dia de SOD o placebo (vehicle). El grup control es va tractar amb vehicle durant 7 dies. Les dosis administrades es basen en estudis previs que demostren que l'administració de 4 mg/kg/dia de SOD durant 3 dies redueix el reclutament leucocitari en la inflamació intestinal induïda per radiació ²³³ i que l'administració de 13 mg/kg/dia de SOD atenua la inflamació pulmonar associada a pancreatitis aguda ²³⁴. La primera injecció de SOD es va administrar 4 hores després de la inducció de colitis. El punt d'inici del tractament es basa en un estudi previ del nostre grup de treball en el que vam demostrar que l'administració de TNBS induïx la deplecció progressiva de GSH entre els 30 minuts i les 4 hores posteriors a l'administració del TNBS i que aquesta deplecció pot contribuir a la iniciació de la inflamació intestinal en aquest model experimental ²³⁵. El tractament amb SOD es va administrar un cop al dia fins al final de l'estudi a dia 7.

Els animals es van pesar diàriament. Els diferents grups d'animals es van estudiar 7 dies després de la inducció de colitis per avaluar els canvis macroscòpics, histològics i bioquímics al còlon. Es van fer servir grups animals addicionals per determinar els efectes del tractament amb 13 mg/kg/dia de SOD i vehicle 24 h després de la inducció de colitis. En el moment de l'estudi, els animals es van anestessiar mitjançant l'administració intraperitoneal de tiobarbital. A continuació es van prendre mostres de sang per punció cardíaca i es van centrifugar, el sèrum del sobrenadant es va recollir i es va emmagatzemar en tubs Eppendorf prèviament autoclavats. Les mostres de plasma es van congelar a -80°C per posterior determinació dels nivells de IL-6. Posteriorment es van sacrificar els animals, es va extraure el còlon, es va obrir longitudinalment, es va rentar amb PBS i es va pesar. A continuació es va avaluar el dany macroscòpic al còlon mitjançant l'ús d'una escala prèviament descrita ²³⁶ que té en compte la presència d'adhesions i estenosi, l'extensió de les úlceres i el gruix de la paret del còlon. Es van recollir tres mostres de teixit colònic de 200 mg dues de les quals es van congelar a -80°C per ser homogeneitzades

posteriorment i determinar els nivells de LPO i l'activitat de l'enzim MPO al teixit. L'altra mostra de teixit es va conservar en formalina 10%, per ser fixada posteriorment en parafina, tallada i tenyida amb hematoxilina i eosina per determinar el dany histològic al teixit mitjançant l'ús d'una escala prèviament descrita ²³⁷.

Es van fer servir grups addicionals de rates colítics tractades amb les diferents dosis de SOD o vehicle i rates control tractades amb vehicle per determinar les interaccions leucòcit-endoteli en vèdules de la làmina pròpia i la submucosa colònica mitjançant microscopia intravital. Els diferents grups es van estudiar 7 dies després de la inducció de colitis. En el moment de l'estudi, es van anestessiar els animals amb tiobarbital, posteriorment es va obrir la cavitat abdominal mitjançant la realització d'una incisió longitudinal. Per l'anàlisi al microscopi es va exterioritzar un segment de còlon i es va cobrir amb una gassa humida amb PBS. A continuació, es va col·locar l'animal sobre una platina que permet la visualització d'un segment de còlon d'aproximadament 2 cm². Posteriorment, es van marcar els leucòcits mitjançant l'administració subcutània del fluorocrom rodamina-6-G. Per a la determinació de les interaccions leucòcit-endoteli es va utilitzar un microscopi de fluorescència invertit connectat a una càmera que transfereix les imatges a un monitor. Les imatges es van registrar per ser analitzades posteriorment i determinar el nombre de leucòcits en rodament, el flux de leucòcits en rodament i el nombre de leucòcits adherits. En cada animal es van estudiar entre 4 i 6 vasos no ramificats amb un diàmetre comprès entre 20 i 40 µm.

Per determinar l'expressió endotelial de VCAM-1 al còlon i cec es van utilitzar grups animals addicionals colítics tractats amb les diferents dosis de SOD o vehicle i animals control tractats amb vehicle. Els animals es van tractar diàriament i es van estudiar 7 dies després de la inducció de colitis. Es va fer servir els anticossos monoclonals 5F10, anti-VCAM-1 de rata, que es va marcar amb ¹²⁵I, i UPC10 que és un anticòs no enllaçant que es va marcar amb ¹³¹I. En el moment de l'estudi, es van anestessiar els animals mitjançant l'administració de tiobarbital. A continuació es va canular l'artèria caròtida dreta i la vena jugular esquerra, es va injectar una barreja 20 µg de ¹²⁵I-5F10 i 5 µg de ¹³¹I-UPC10 a través de la vena jugular esquerra. Un estudi previ va demostrar que la dosi administrada d'anticòs 5F10 és saturant front a VCAM-1 ¹⁶⁹. Cinc minuts després de l'administració de la barreja d'anticossos es va

prendre una mostra de sang per determinar l'activitat dels isòtops de iode al plasma. A continuació es van exanguinar els animals, es van recollir els òrgans, es van rentar amb PBS, es van pesar i posteriorment es va mesurar l'activitat dels isòtops de iode en els òrgans. L'expressió de VCAM-1 es va calcular a partir de l'activitat acumulada dels isòtops de iode unit als anticossos en un òrgan determinat d'acord amb la fórmula descrita prèviament, el resultat s'expressa en ng d'Ac/mg de teixit.

5.2.- Material i metodes de l'estudi 2:

Per avaluar l'efecte de l'administració de SOD en el curs de la colitis establerta es van utilitzar ratolins IL-10^{-/-} i ratolins de la soca salvatge, C57BL10, que van créixer en condicions d'establiment convencional. Els animals es van estudiar a les 16 setmanes de vida. Els ratolins IL-10^{-/-} es van separar en diferents grups de tractament que van rebre diàriament una injecció subcutània de 13 mg/kg/dia de SOD durant 7 o 14 dies, o placebo (vehicle) durant 14 dies. Els ratolins de la soca salvatge es van tractar diàriament amb una injecció subcutània de vehicle durant 14 dies.

Per determinar l'efecte preventiu de l'administració de SOD en el tractament profilàctic de la colitis induïda per DSS es van fer servir ratolins C57BL6J de 12 setmanes de vida. La colitis es va induir mitjançant l'administració de DSS dissolt en aigua de beguda al 3% durant 6 dies. El grup control va rebre aigua de beguda sense DSS. Els ratolins colítics es van tractar diàriament amb una injecció subcutània de 13 mg/kg/dia de SOD o placebo (vehicle) durant 7 dies. La primera injecció del tractament es va administrar 24 hores abans de l'administració de DSS. Els animals control es van tractar amb vehicle durant 7 dies.

Colitis en IL-10^{-/-}: Els diferents grups de ratolins es van estudiar després del tractament durant 7 o 14 dies. En el moment de l'estudi, els animals es van anestèsiar mitjançant l'administració subcutània de 0.2 ml de ketamina i xilacina 50% (vol/vol). Es van prendre mostres de sang per punció cardíaca, es va centrifugar la sang, es va recollir sèrum del sobrenadant i es va congelar a -80°C per valorar els nivells de proteïna sèrica amilòid A (SAA). Posteriorment, els animals es van sacrificar, es va extreure el còlon, es va rentar amb PBS i es va mesurar la longitud i el pes. El còlon es va dividir en dues tires longitudinals una de les quals es va congelar a -80°C per ser homogeneïtzada posteriorment i determinar els nivells de LPO i l'activitat de l'enzim MPO al teixit. L'altra tira es va conservar en formalina 10% per ser fixada posteriorment en parafina, tallada i tenyida amb hematoxilina i eosina per determinar el dany histològic amb una escala prèviament descrita que té en compte la presència de cèl.lules inflammatòries infiltrades al teixit, la població de

cèl.lules caliciformes, el gruix de la mucosa, presència d'úlceres i abscessos a la cripta²³⁸.

Es van fer servir grups animals addicionals IL-10^{-/-} tractats amb SOD durant 7 o 14 dies, o vehicle durant 14 dies i ratolins de la soca salvatge tractats amb vehicle durant 14 dies per determinar les interaccions leucòcit-endoteli en les vècules colòniques de la làmina pròpia i la submucosa mitjançant microscopia intravital. En el moment de l'estudi, es van anestessiar els animals amb 0.2 ml de ketamina i xilacina 50% (vol/vol). El procediment quirúrgic i l'avaluació de les interaccions leucòcit-endoteli van ser idèntics als descrits en l'apartat anterior.

Es va determinar l'expressió endotelial de VCAM-1 i MAdCAM-1 en grups de tractament addicional. Es van fer servir els anticossos enllaçants monoclonals 429, anti-VCAM-1 de ratolí, MECA-367, anti-MAdCAM-1 de ratolí, i UPC10, anticòs no enllaçant. Es va marcar els anticossos enllaçants amb ¹²⁵I mentre que per al marcatge del no enllaçant i es va fer servir ¹³¹I. En el moment de l'estudi, es van anestessiar els animals amb 0.2 ml de ketamina i xilacina 50% (vol/vol), es va canular l'artèria caròtida dreta i la vena jugular esquerra. Per a la determinació de l'expressió de VCAM-1 es va injectar una barreja de 30 µg de ¹²⁵I-429 i 3 µg de ¹³¹I-UPC10 a través de la vena jugular. Per a la determinació de l'expressió de MAdCAM-1 es va injectar una barreja de 10 µg ¹²⁵I-MECA-367 i 3 µg de ¹³¹I-UPC10 a través de la vena jugular. S'ha demostrat en estudis previs que la dosis d'anticossos enllaçants administrades són saturants front a VCAM-1 i MAdCAM-1^{134;239;240}. El procediment metodològic de la tècnica, el càlcul de l'expressió de iode i la determinació de la expressió de les CAMs van ser idèntics als descrits en l'apartat anterior.

Colitis induïda amb DSS: La manipulació de les mostres de teixit i sèrum van ser idèntiques a les descrites en la colitis per IL-10^{-/-}. Es van determinar paràmetres clínics que comprenen: la variació de pes corporal, la consistència de la femta i la presència de sang en femta. A partir d'aquestes dades es va determinar l'índex d'activitat de la malaltia (DAI) per combinació dels tres paràmetres clínics d'acord amb una escala prèviament descrita²⁴¹. La severitat del dany hisològic es va

determinar mitjançant l'ús d'una escala que té en compte el percentatge del dany de la mucosa, l'extensió de la longitud del còlon i la profunditat de la lesió ²¹¹.

Es van fer servir grups animals colítics tractats amb SOD o vehicle durant 7 dies i ratolins control tractats amb vehicle durant 7 dies per determinar les interaccions leucòcit-endoteli en les vèdules colòniques de la làmina pròpia i la submucosa mitjançant microscopia intravital. En el moment de l'estudi, es van anestessiar els animals amb 0.2 ml de ketamina i xilacina 50% (vol/vol). El procediment quirúrgic i l'avaluació de les interaccions leucòcit-endoteli van ser idèntics als descrits en l'apartat anterior.

6.- RESULTATS

6.1.- Resultats de l'estudi 1:

La simptomatologia clínica de la colitis induïda per TNBS es va associar a una marcada disminució del pes corporal del grup colíctic tractat amb vehicle comparat amb el grup control des del dia 3 de tractament fins al final de l'estudi. Aquesta tendència es va atenuar significativament en resposta a l'administració de 13 mg/kg/dia de SOD que va reduir significativament la pèrdua de pes corporal respecte al grup colíctic tractat amb vehicle a partir del dia 3 de tractament fins al final de l'estudi. El grup tractat amb 13 mg/kg/dia de SOD, a més, va recuperar ràpidament el pes corporal mentre que cap dels altres grups colíctics va seguir aquesta tendència.

El desenvolupament de la colitis es va associar a un marcat augment en la valoració del dany macroscòpic al còlon respecte al grup control. Paral·lelament, la valoració del dany histològic en aquest òrgan va presentar valors significativament incrementats en el grup colíctic tractat amb vehicle comparat amb grup control. Aquestes dades són concordants amb evidències prèvies en aquest model experimental de colitis ^{164;169}. La instauració de la colitis va causar un marcat augment del pes del còlon comparat amb el grup control. Diferents estudis demostren que aquesta dada és indicadora de la gravetat de la colitis en aquest model experimental de colitis ^{164;169}. El tractament amb 13 mg/kg/dia de SOD es va associar a una disminució en la valoració del dany macroscòpic al còlon comparat amb el grup colíctic tractat amb vehicle. El pes del còlon es va atenuar significativament respecte al grup colíctic tractat amb vehicle en resposta al tractament amb la major dosi de SOD. Paral·lelament, aquest tractament va disminuir significativament el dany histològic al teixit colònic respecte al grup colíctic tractat amb vehicle. En particular, aquest tractament va originar una marcada reducció de l'infiltrat inflamatori que es va limitar a la mucosa, sense afectar la làmina pròpia, les àrees amb ulceració extensa característiques del grup colíctic no es van observar en el grup que va rebre el tractament de la major dosi de SOD.

Es van utilitzar grups addicionals d'animals colíctics tractats amb vehicle o 13 mg/kg/dia de SOD 24 hores després de la inducció de colitis per descartar que l'efecte beneficiós del tractament amb SOD es degui a la prevenció, o la interferència de l'administració d'aquest fàrmac, en els mecanismes d'acció de la inducció de

colitis per TNBS. En aquest punt de tractament, l'administració de SOD no va alterar la pèrdua de pes corporal comparat amb el tractament amb vehicle. El pes del còlon, la valoració del dany macroscòpic i la determinació de la gravetat del dany histològic al teixit colònic van presentar valors semblants en ambdòs grups de tractament.

Tenint en compte que tant en la MII humana ²³ com en diferents models experimentals de colitis ^{143;164;169} es produeix un fenomen de infiltració de neutròfils perifèrics al teixit intestinal i que aquestes cèl.lules tenen una important activitat generadora de MRO ¹⁰³ es va avaluar la infiltració de neutròfils al còlon mitjançant la determinació de l'activitat de l'enzim MPO al teixit colònic. El desenvolupament de colítis es va associar a un marcat augment de l'activitat MPO al còlon en aquest model experimental de colitis. El tractament amb 4 mg/kg/dia i 13 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament l'activitat MPO al teixit colònic en la colitis experimental.

Clàssicament s'ha utilitzat la valoració dels nivells plasmàtics de IL-6 com a marcador d'activitat de la malaltia ²⁴². Diferents estudis han demostrat que els nivells plasmàtics d'aquesta citocina estan marcadament augmentats en el sèrum i en el teixit colònic de pacients amb MII ²⁴³⁻²⁴⁶. En el nostre estudi la determinació dels nivells plasmàtics de IL-6 van presentar valors marcadament incrementats en el grup colític tractat amb vehicle comparat amb el grup control. El tractament amb 4 mg/kg/dia i 13 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament els nivells plasmàtics d'aquesta citocina respecte al grup colític tractat amb vehicle.

La instauració de la colítis es va associar a un marcat increment de l'estrès oxidatiu al teixit colònic mesurat pels nivells de LPO al còlon. El tractament amb 4 mg/kg/dia i 13 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament els nivells de LPO al còlon respecte al grup colític. Un dels mecanismes mitjançant el qual SOD confereix protecció i redueix la severitat del dany inflamatori intestinal pot estar relacionat amb l'atenuació de l'estrès oxidatiu en aquest òrgan.

El grup control va presentar nivells d'expressió de VCAM-1 molt baixos al còlon. El desenvolupament de la colitis es va associar a un marcat augment en l'expressió de VCAM-1 al còlon que va ser 3 vegades superior al nivell presentat pel grup control. Aquesta dada és concordant amb evidències prèvies en el nostre grup de treball en

aquest model experimental de colitis ¹⁶⁹. El tractament de la colitis amb SOD va atenuar l'expressió de VCAM-1 de manera dosi-dependent. L'administració de 1 mg/kg/dia de SOD no va modificar l'expressió de VCAM-1, el tractament amb 4 mg/kg/dia de SOD va originar una disminució dels nivells de VCAM-1 però no va assolir la significació estadística, l'administració de 13 mg/kg/dia de SOD, en canvi, va atenuar significativament l'expressió d'aquesta CAM al còlon. L'expressió de VCAM-1 al cec va presentar el mateix patró d'expressió que en el còlon.

Un cop es va determinar que l'expressió de VCAM-1 al còlon estava atenuada en resposta a l'administració de SOD es va avaluar l'efecte del tractament de SOD sobre el reclutament leucocitari *in vivo* en vècules colòniques de la làmina pròpia i submucosa en grups animals addicionals mitjançant microscopia intravital. El grup colíctic tractat un vehicle va presentar un marcat increment de les interaccions leucòcit-endoteli respecte al grup control. En concret, el flux de leucòcits en rodament en el grup colíctic va presentar valors 12 vegades superiors respecte al grup control. El nombre de leucòcits en rodament en el grup colíctic va ser 15 vegades superior al del grup control. L'adhesió leucocitària ferma en el grup colíctic va presentar valors 16 vegades superiors en el grup colíctic comparat amb els animals control. Aquestes dades estan d'acord amb evidències prèvies en el nostre grup de treball en aquest model experimental de colitis ^{164;169}. El tractament de la colitis amb SOD va atenuar el reclutament leucocitari de manera dosi-dependent.

L'administració de 1 mg/kg/dia de SOD no va alterar el reclutament leucocitari al còlon. El tractament amb 4 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament el nombre de leucòcits en rodament i va reduir un 30% l'adhesió leucocitària al còlon, aquest darrer paràmetre, però, no va assolir la significació estadística. Aquesta dada suggereix que l'atenuació del rodament leucocitari en resposta al tractament amb antioxidants és un paràmetre més sensible a l'estrès oxidatiu que la modulació de l'adhesió ferma leucocitària en aquest model experimental de colitis. L'administració de 13 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament tant el rodament com l'adhesió leucocitària al còlon, la qual cosa suggereix que aquest podria ser un dels mecanismes implicats en la seva activitat antiinflamatòria en el context de la colitis. El tractament amb SOD no va modificar el nombre de leucòcits circulants en sang perifèrica en cap dels grups de tractament.

6.2.- Resultats de l'estudi 2:

Efectes del tractament amb SOD en la colitis de IL-10^{-/-}

L'expressió endotelial de MAdCAM-1 en el còlon de ratolins de la soca salvatge va ser relativament baixa. Els ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle van presentar un valor d'expressió d'aquesta CAM 5 vegades incrementat respecte a la soca salvatge. Aquesta dada és concordant amb evidències prèvies en aquest model experimental de colitis ¹⁶⁵. El tractament amb SOD durant 14 dies va atenuar significativament, en un 50%, l'expressió de MAdCAM-1 al còlon. A més del còlon es va determinar l'efecte de l'administració de SOD sobre l'expressió endotelial de MAdCAM-1 en altres òrgans. L'expressió d'aquesta CAM es va marcadament incrementar en tots els òrgans del tracte digestiu en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle comparat amb els ratolins de la soca salvatge. El tractament amb SOD durant 14 dies va disminuir significativament l'expressió de MAdCAM-1 en tots els segments del tracte digestiu que va arribar a ser, en alguns òrgans, inferior als valors expressats pels ratolins de la soca salvatge. En concret, l'expressió basal de MAdCAM-1 al fetge es va inhibir completament en resposta al tractament amb SOD.

L'expressió endotelial de VCAM-1 al còlon de ratolins de la soca salvatge va ser baixa. Els ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle van presentar valors d'expressió d'aquesta CAM 5 vegades superiors als nivells expressats pels animals de la soca salvatge. Un estudi previ va demostrar que VCAM-1 es sobreexpressa en el còlon en aquest model experimental de colitis ¹⁶⁵. El tractament amb SOD durant 14 dies va atenuar significativament l'expressió de VCAM-1 al còlon. L'expressió d'aquesta CAM es va incrementar en alguns dels òrgans del tracte digestiu en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle, en concret, al fetge, messenter i ili. El tractament amb SOD durant 14 dies va atenuar significativament l'expressió de VCAM-1 en aquests òrgans.

Els ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle van presentar un increment en les interaccions leucòcit-endoteli en les vèdules del còlon comparat amb el grup d'animals de la soca salvatge. En concret, el grup de ratolins IL-10^{-/-} tractat amb vehicle va presentar valors de flux de leucòcits en rodament 5 vegades superiors respecte als ratolins de la soca salvatge. El nombre de leucòcits en rodament en el grup IL-10^{-/-} tractat amb vehicle es va incrementar 9 vegades respecte al grup de ratolins de la soca salvatge. L'adhesió leucocitària ferma va ser relativament baixa al grup de ratolins de la soca salvatge. Aquest valor va presentar valors 7 vegades superiors en el grup de ratolins IL-10^{-/-} tractat amb vehicle respecte al grup de ratolins de la soca salvatge. La sobreexpressió de MAdCAM-1 i VCAM-1 al còlon en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle es va correlacionar amb un marcat augment en el reclutament leucocitari en aquest òrgan. El tractament amb SOD durant 7 dies va disminuir significativament el nombre de leucòcits en rodament però no va afectar el flux de leucòcits en rodament. L'adhesió leucocitària ferma no es va atenuar en resposta al tractament amb SOD durant 7 dies. El tractament amb SOD durant 14 dies, en canvi, va atenuar significativament el flux de leucòcits en rodament, en un 50%, i el nombre de leucòcits en rodament, en un 80%, aquest darrer paràmetre va assolir valors similars als presentats pels ratolins de la soca salvatge. L'adhesió leucocitària ferma al còlon de ratolins IL-10^{-/-} va disminuir significativament en resposta a l'administració de SOD durant 14 dies. El tractament amb SOD no va modificar el nombre de leucòcits circulants en sang perifèrica en cap dels grups de tractament. La disminució del rodament i adhesió leucocitària al còlon en resposta al tractament amb SOD es va correlacionar amb l'atenuació significativa de l'expressió endotelial de MAdCAM-1 i VCAM-1.

El desenvolupament de la colitis en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle es va associar a una disminució en la longitud del còlon comparat amb els animals de la soca salvatge. El tractament amb SOD durant 14 dies va atenuar significativament la variació en la longitud del còlon. A més, el cocient pes del còlon/longitud del còlon es va incrementar marcadament en el grup IL-10^{-/-} tractat amb vehicle respecte als ratolins de la soca salvatge. La relació pes/longitud del còlon es va atenuar significativament en resposta al tractament amb SOD durant 14 dies. En canvi, el tractament amb SOD durant 7 dies no va alterar aquests paràmetres morfològics. Les dades obtingudes en el nostre estudi de les modificacions longitud de còlon i de

la relació pes/longitud del còlon en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle són concordants amb evidències prèvies en aquest model experimental de colitis ¹⁶⁵.

La valoració del dany histològic al còlon en el grup de ratolins IL-10^{-/-} tractat amb vehicle va ser 5 vegades superior respecte als ratolins de la soca salvatge. Diversos estudis demostren que el dany histològic està marcadament incrementat en aquest model experimental de colitis ^{165;205;247}. El tractament amb SOD durant 7 dies no va alterar la gravetat en la valoració del dany histològic. El tractament durant 14 dies, en canvi, va atenuar significativament el dany histològic al teixit colònic. Tot i que la disminució de la gravetat histològica en resposta al tractament amb SOD durant 14 dies va assolir la significació estadística, la variació va ser molt modesta i es va associar a la recuperació de la població de cèl.lules caliciformes i la reducció en el nombre de cèl.lules inflamatòries infiltrades al teixit colònic. Aquesta dada es correlaciona amb la disminució del reclutament leucocitari observada en resposta al tractament amb SOD durant 14 dies.

L'activitat MPO al teixit colònic en el grup de ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle va ser 3 vegades superior al valor presentat pels ratolins de la soca salvatge. El tractament amb SOD durant 14 dies va originar una marcada disminució de l'activitat MPO al còlon que va assolir els nivells presentats en els ratolins de la soca salvatge. En canvi, el tractament amb SOD durant 7 no va alterar el l'activitat MPO al teixit colònic.

Els ratolins de la soca salvatge van presentar nivells plasmàtics de SAA indetectables per la tècnica utilitzada. El desenvolupament de la colitis en ratolins IL-10^{-/-} tractats amb vehicle es va associar a un marcat increment d'aquest biomarcador d'activitat de la malaltia en plasma. Diferents estudis demostren que els nivells plasmàtics de SAA estan marcadament incrementats en resposta al desenvolupament de la colitis tant en models experimentals ^{165;248} com en la malaltia humana ^{249;250}. El tractament amb SOD durant 14 dies va atenuar significativament els nivells plasmàtics de SAA, en un 50%, respecte al grup de ratolins IL-10^{-/-} tractat amb vehicle. L'administració de SOD durant 7 dies no va modificar els nivells plasmàtics d'aquesta proteïna.

La valoració de l'estrès oxidatiu al còlon es va avaluar per determinació de la concentració de LPO al teixit. El nivell de LPO en l'homogeneïtzat de teixit colònic de ratolins de la soca salvatge va presentar una valor molt baix. El desenvolupament de la colitis en ratolins IL-10^{-/-} es va associar a un marcat increment en concentració de LPO al còlon que va presentar un valor 27 vegades superior respecte als ratolins soca salvatge. L'administració de SOD durant 7 i 14 dies va atenuar en un 50% la concentració de LPO en el teixit colònic.

Valor terapèutic de la SOD com a teràpia preventiva

La inducció de colitis mitjançant l'administració de DSS al 3% en aigua de beguda durant 6 dies va causar una marcada disminució en el pes corporal respecte al grup control, que va començar el dia 4 i es va mantenir fins al final de l'estudi.

L'administració preventiva de SOD va atenuar significativament la pèrdua de pes corporal respecte al grup colíctic tractat amb vehicle a partir del dia 4 fins al final de l'estudi. Tots els animals del grup colíctic van presentar test positiu de sang oculta en femta i disminució de la consistència de la femta respecte al grup control.

L'administració de SOD va atenuar significativament ambdós paràmetres. L'escala DAI és un index per quantificar l'activitat de la malaltia per combinació de pèrdua de pes corporal, consistència de la femta i presència de sang oculta en femta¹⁴³. La valoració del DAI es va incrementar marcadament en ratolins colíctics tractats amb vehicle comparat amb el grup control. Un estudi previ en el nostre grup va mostrar valors concordants en la valoració del DAI en aquest model experimental de colítis¹⁴³. El tractament amb SOD va atenuar significativament, en un 40%, la valoració del DAI respecte al grup colíctic tractat amb vehicle.

L'activitat MPO a l'homogeneïtzat del teixit colònic va presentar valors 4 vegades superiors en el grup colíctic tractat amb vehicle comparat amb el grup control. El tractament amb SOD va reduir significativament l'activitat MPO al teixit colònic respecte al grup colíctic tractat amb vehicle. La valoració de la severitat del dany histològic al còlon va ser 4 vegades superior en el grup colíctic tractat amb vehicle comparat amb el grup control. L'administració de SOD no va alterar el dany histològic al còlon.

El desenvolupament de la colitis es va associar a un marcat increment en les interaccions leucòcit-endoteli en les vècules colòniques. En concret, el flux de leucòcits i el nombre de leucòcits en rodament es van incrementar 6 vegades en el grup colític tractat amb vehicle comparat amb el grup control. El tractament amb SOD va atenuar significativament ambdós paràmetres de rodament leucocitari que van assolir valors similars als presentats pel grup control. L'adhesió leucocitària ferma va ser 13 vegades superior en el grup colític tractat amb vehicle respecte al grup control. L'administració de SOD va atenuar significativament, un 65%, el nombre de leucòcits adherits a les vècules colòniques. El tractament amb SOD no va modificar el nombre de leucòcits circulants en sang perifèrica.

7.- ARTICLES ORIGINALS

Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine

Joaquim Seguí,* Meritxell Gironella,* Miquel Sans,* Susana Granell,[†] Fèlix Gil,* Mercedes Gimeno,[‡] Pilar Coronel,[‡] Josep M. Piqué,* and Julián Panés*,¹

*Department of Gastroenterology, Hospital Clínic, Institut de Investigacions biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain; [†]IIBB, CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain; and [‡]Tedec-Meiji Farma Laboratories, Madrid, Spain

Abstract: Oxidant stress has been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), are candidate drugs for modulating this pathogenic factor. This study was designed to determine the therapeutic value of SOD in an experimental model of colitis and to study the mechanisms underlying its effects on intestinal inflammation. For that purpose, colitic (trinitrobenzene sulfonic acid-induced) and control rats were studied. Groups of colitic animals were treated with different doses of SOD (1, 4, or 13 mg/kg/day) or vehicle, starting after induction of colitis and during 7 days. Clinical and pathological markers of colitis severity and lipid peroxidation in colonic tissue were measured. Leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules and expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were determined. Development of colitis was associated with a significant loss in body weight, an increase in macroscopic and microscopic damage scores, and colonic myeloperoxidase activity. Administration of SOD significantly attenuated these changes in a dose-dependent manner and reduced lipid peroxidation in colonic tissue. The increase in leukocyte rolling and adhesion in colonic venules of colitic rats were significantly reduced by administration of SOD, 13 mg/kg/day. Development of colitis was associated with a marked increase in endothelial VCAM-1 expression, which was significantly reduced by treatment with SOD. In conclusion, treatment with SOD significantly reduces peroxidation reactions in the inflamed colon and affords significant amelioration of colonic inflammatory changes in experimental colitis. This effect is related to a reduction in VCAM-1 expression and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J. Leukoc. Biol.* 76: 537–544; 2004.

Key Words: inflammatory bowel disease · reactive oxygen species · vascular cell adhesion molecule-1

INTRODUCTION

Several factors are recognized to contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) including an overgeneration of reactive oxygen species (ROS) [1, 2]. Previous studies demonstrated that peripheral blood monocytes [3] and isolated intestinal macrophages from patients with IBD produce free radicals [4]. Also, high numbers of peripheral neutrophils, which are capable of producing large amounts of superoxide, migrate into the intestinal wall in active IBD [1]. A growing body of evidence indicates that ROS, such as peroxide anion, hydrogen peroxide (H₂O₂), and hypochlorous acid, are not merely byproducts of the inflammatory process, but they are actually involved in its pathogenesis. To regulate overall ROS levels, the intestinal mucosa possesses a complex of antioxidant systems, of which the superoxide dismutases (SOD) are the initial enzymes, converting superoxide anion to H₂O₂. SOD expression in patients with active IBD seems to be altered. In particular, decreased protein activity and levels of cytoplasmic Cu/Zn-SOD have been reported consistently [5–7].

Several experimental strategies have been used to address the importance of the enhanced production of superoxide in the pathogenesis of IBD, but inconsistent findings have left this issue largely unresolved. For example, some reports have described a beneficial effect of SOD treatment in the prevention of experimental colitis [8, 9] and of a SOD mimetic in the treatment of established colitis [10], whereas in studies using transgenic mice overexpressing SOD, a more severe colitis [11] or a reduction in neutrophil infiltration without affecting the clinical or histological severity of colitis has been reported [12]. Therefore, further investigation about the effects of SOD on IBD seems warranted, especially elucidating the value of this therapeutic approach in established colitis.

One of the key aspects in the pathogenesis of IBD that contributes to perpetuate and amplify the inflammatory damage is the recruitment of inflammatory cells into the inflamed intestine. Adhesion of circulating leukocytes to intestinal en-

¹ Correspondence: Gastroenterology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: panes@ub.edu

Received March 25, 2004; revised May 7, 2004; accepted May 9, 2004; doi: 10.1189/jlb.0304196.

dothelium depends on the coordinated expression of adhesion molecules on endothelial cells, including vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1), and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), along with their respective integrin counter-receptors expressed on the surface of circulating leukocytes [13]. The fundamental importance of increased VCAM-1 expression in IBD in particular is supported by reports demonstrating that leukocyte recruitment and mucosal damage in experimental models of colitis are blocked by immunoneutralization of this adhesion molecule [14, 15]. Direct comparison of the relative efficacy of ICAM-1, MAdCAM-1, and VCAM-1 immunoneutralization in the treatment of experimental colitis showed that the latter was the most effective strategy [15]. It has been shown recently that immunoneutralization of $\alpha 4$ integrins, the receptors for VCAM-1 and MAdCAM-1, is effective in the treatment of human Crohn's disease, as its efficacy is similar to that of anti-tumor necrosis factor (TNF)-blocking strategies [16, 17].

ROS induce a quantitative up-regulation of VCAM-1 by de novo synthesis. Functional analysis of the human VCAM-1 promoter demonstrated that several oxidant-sensitive transcription factors are associated with activation of VCAM-1 gene expression in response to interleukin (IL)-1 β and TNF- α [18, 19]. Furthermore, *in vitro* studies have shown that expression of SOD but not catalase by adenovirus suppressed TNF- α -induced VCAM-1 mRNA accumulation [18].

Based on these observations, the present study was designed to evaluate whether treatment with SOD exerts protection on established experimental colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and if so, highlight possible mechanisms through which SOD may confer protection, specifically its effects on adhesion molecule expression and leukocyte recruitment.

MATERIALS AND METHODS

Induction of colitis

Male Sprague-Dawley rats weighing 300–350 g were obtained from CRIFFA, S.A. (Santa Perpètua de la Mogoda, Spain). Colitis was induced by intracolonic administration of 30 mg TNBS (Sigma Química, Madrid, Spain) in 0.25 mL 50% (vol/vol) ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) [20]. Control rats received 0.25 mL saline. Principles of laboratory animal care (National Institutes of Health, publication no. 86-23, revised 1985) and the guidelines of procedures for animal experiments from the Generalitat de Catalunya were followed.

Treatment groups

Groups of colitic animals were treated with different daily subcutaneous (*s.c.*) doses of Cu/Zn SOD: 1 mg/kg/day, 4 mg/kg/day, or 13 mg/kg/day or vehicle (saline). For the current study, a preparation of SOD commercially available (Ontosein[®], Tedec-Meiji Farma Laboratories, Alcalá de Henares, Spain) was used. The doses of SOD used are based on previous evidence showing that treatment with SOD, 4 mg/kg for 3 days, is effective in reducing leukocyte recruitment in irradiation-induced, intestinal inflammation [21] and a beneficial effect of treatment with 13 mg/kg SOD in reducing pulmonary inflammation associated with severe acute pancreatitis [22]. The first injection of SOD was administered 4 h after the induction of colitis. This time-point was chosen based on previous data from our group showing that intracolonic TNBS induces a progressive depletion of reduced glutathione from 0.5 h to 4 h, and this early depletion may contribute to the initiation of intestinal inflammation in this

model [23]. Treatment was administered once daily up to the end of the study at day 7.

Assessment of colonic inflammatory changes

Animals were weighed daily. Animal groups were studied 7 days after induction of colitis to assess macroscopic, histological, and biochemical colonic changes; the number of animals studied in each experimental group was as follows: controls, $n = 6$; colitis treated with vehicle, $n = 6$; colitis treated with SOD, 1 mg/kg/day, $n = 6$; colitis treated with SOD, 4 mg/kg/day, $n = 7$; colitis treated with SOD, 13 mg/kg/day, $n = 8$. To determine the early effects of SOD, additional groups of colitic rats treated with vehicle ($n=6$) or SOD 13 mg/kg/day ($n=6$) were studied 24 h after induction of colitis. Anesthesia was induced by administration of thiobutabarbital (Inactin[®], Research Biochemicals International, Natick, MA), 100 mg/kg body weight intraperitoneally (*i.p.*). Samples of blood were collected by open cardiac puncture under aseptic conditions using a 1-ml syringe and placed in Eppendorf vials; blood was spun at 1500 g for 10 min at 4°C; the supernatant serum was then pipetted into autoclaved Eppendorf vials and frozen at -80°C for later assay of IL-6 levels using a quantitative, colorimetric commercial kit (R&D Systems, Barcelona, Spain). Thereafter, the colon was excised, opened by a longitudinal incision, rinsed with saline, and weighed (8 cm distal colon). Macroscopic damage was assessed by a single observer blinded to characteristics or treatment of the animal being studied, according to a previously established score that takes into account presence of adhesions (score 0–2), strictures (score 0–3), ulcers (score 0–3), and wall thickness (score 0–2) [24]. Two colon samples (150–200 mg) were then excised, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for later assay of myeloperoxidase (MPO) activity and lipid hydroperoxide (LPO) concentration. Additional samples were preserved in 10% formalin for histologic studies. For assessment of microscopic damage, formalin-fixed colonic samples were embedded in paraffin, and sections (5- μ m thick) were stained with hematoxylin-eosin (H&E). The degree of inflammation of the colon was graded semiquantitatively from 0 to 11 according to previously defined criteria [25].

MPO assay

MPO activity was measured photometrically by using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate [26]. Samples were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Homogenates were then disrupted for 30 s by using a Labsonic (Braun Biotech, Melsungen, Germany) sonicator and subsequently snap-frozen in dry ice and thawed on three consecutive occasions before a final 30-s sonication. Samples were incubated at 60°C for 2 h and then spun down at 4000 g for 12 min. Supernatants were collected for MPO assay. Enzyme activity was assessed photometrically at 630 nm. The assay mixture consisted of 20 mL supernatant, 10 mL tetramethylbenzidine (final concentration, 1.6 mM) dissolved in dimethyl sulfoxide, and 70 mL H₂O₂ (final concentration, 3.0 mM) diluted in 80 mM phosphate buffer, pH 5.4. An enzyme unit is defined as the amount of enzyme that produces an increase of 1 absorbance unit per minute.

Measurement of lipid peroxidation

Quantification of lipid peroxidation was performed in colon tissue samples (150–200 mg) by direct measurement of LPO according to a previously described technique [27], based on the property of hydroperoxides to readily react with ferrous ions to produce ferric ions, which are detected using thiocyanate ions as the chromogen. In brief, after tissue samples were homogenized, LPO were extracted into chloroform and stored at -80°C until the time of the assay. For performing the assay, the commercially available kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) was used following the manufacturer's instructions. Results are expressed in nmols LPO/g tissue.

Endothelial VCAM-1 expression

Thirty rats were used to characterize endothelial expression of VCAM-1. Six control (saline-treated) rats and 24 animals with TNBS colitis treated with vehicle or SOD, 1 mg/kg, 4 mg/kg, or 13 mg/kg ($n=6$ per group) were studied.

The monoclonal antibodies (mAb) used were 5F10, a murine immunoglobulin G_{2a} (IgG_{2a}) against rat VCAM-1 [28], and UPC-10, a nonbonding, murine IgG_{2a}. 5F10 was obtained from Biogen Inc. (Cambridge, MA) and UPC-10, from Sigma Química. The binding mAb 5F10 directed against VCAM-1 was

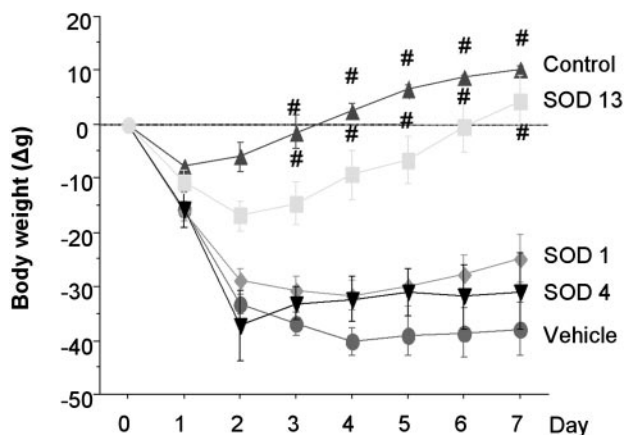


Fig. 1. Effect of treatment with various doses of SOD (1, 4, or 13 mg/kg) or vehicle on daily changes in body weight loss in colitic animals. #, $P < 0.05$, versus SOD, 1 mg/kg; SOD, 4 mg/kg; and vehicle.

labeled with ^{125}I , whereas the nonbinding mAb UPC-10 was labeled with ^{131}I (Amersham Ibérica, Madrid, Spain). Radioiodination of the mAb was performed by using the iodogen method as described previously [29].

Animals were anesthetized with thiobutabarbital (100 mg/kg body weight i.p.), and the right carotid artery and right jugular vein were cannulated. For assessment of endothelial VCAM-1 expression, $20\ \mu\text{g}\ ^{125}\text{I}$ -5F10 was used. In all cases, $5\ \mu\text{g}\ ^{131}\text{I}$ -UPC-10 was added to the mixture. Doses of anti-VCAM-1 mAb proved to be saturating in previous assays [14]. The mixture of binding and nonbinding mAb was administered through the jugular catheter. The injected activity in each experiment was calculated by counting a $5\text{-}\mu\text{L}$ sample of the mixture containing the radiolabeled mAb. The accumulated activity of each mAb in an organ was expressed as nanograms of binding antibody per gram of tissue. The formula used to calculate VCAM-1 expression was as follows: endothelial expression = $[(\text{cpm}\ ^{125}\text{I}\ \text{organ}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cpm}\ ^{125}\text{I}\text{-injected}^{-1}) - (\text{cpm}\ ^{131}\text{I}\ \text{organ}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cpm}\ ^{131}\text{I}\text{-injected}^{-1}) \times (\text{cpm}\ ^{125}\text{I}\ \text{in plasma}) / (\text{cpm}\ ^{131}\text{I}\ \text{in plasma})] \cdot \text{ng-injected mAb}$. This formula was modified from the original method [30] to correct the tissue accumulation of nonbinding mAb for the relative plasma levels of binding and nonbinding mAb [31].

In vivo assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules

Leukocyte-endothelial cell interactions in colonic submucosal (s.m.) and lamina propria venules were characterized by using intravital microscopic techniques in additional groups of control animals and in rats with TNBS-induced colitis treated with vehicle; SOD, 1 mg/kg; SOD, 4 mg/kg; or SOD, 13 mg/kg ($n=5\text{--}7$ animals per group). These studies were also performed at day 7 after induction of colitis. Rats were anesthetized with thiobutabarbital (100 mg/kg body weight i.p.), the right carotid artery was cannulated, and the abdomen was opened via a midline incision. A segment of the distal colon was chosen for microscopic examination, gently exteriorized, and covered with a cotton gauze soaked with bicarbonate buffer. Rats were then placed on an adjustable microscope stage, and the colon was extended over a nonautofluorescent coverslip that allowed observation of a 2-cm^2 segment of tissue. An inverted microscope (Diaphot 300, Nikon, Tokyo, Japan) with a CF Fluor 40 \times objective lens (Nikon) was used. A charge-coupled device (CCD) camera (model XC-77,

Hamamatsu Photonics, Japan) with a C2400 CCD camera control unit and a C2400-68 intensifier head mounted on the microscope projected the image onto a monitor (Trinitron KX-14CP1, Sony, Tokyo, Japan). The images were recorded using a videocassette recorder (SR-S368E, JVC, Tokyo, Japan). Leukocytes were in vivo-labeled by s.c. injection of rhodamine 6G (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The route of administration was changed relative to previous methodology [14] after observing that the s.c. route produces a more even and sustained leukocyte fluorescence. Rhodamine 6G-associated fluorescence was visualized by epi-illumination at 510–560 nm, using a 590-nm emission filter. Single unbranched, s.m. and lamina propria venules ranging between 15 and 25 μm in diameter (D) were studied. The flux of rolling leukocytes, number of rolling leukocytes, and number of adherent leukocytes in 100 μm venule were determined off-line after playback of videotapes, as described previously [14]. Venular blood flow (Vbf) was estimated from the mean of the velocity of three free-flowing leukocytes (ffv), using the empirical relationship of $\text{Vbf} = \text{ffv}/1.6$ [32]. Venular wall shear rate (γ) was calculated, assuming cylindrical geometry, using the Newtonian definition, $\gamma = 8 (\text{Vbf}/D)$ [33]. In each animal, three to six venules were examined, and values for number of rolling and adherent leukocytes, leukocyte rolling velocity, and venular wall shear rate were calculated as the mean of each parameter in all venules examined.

Statistical methods

Data were analyzed using analysis of variance with Bonferroni (post-hoc) test or the Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test when appropriate. Values are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of treatment with SOD on TNBS-induced colitis

Treatment with SOD at the dose 13 mg/kg per day significantly attenuated the decrease in body weight from 3 days after initiation of treatment up to the end of the study relative to animals receiving vehicle or treatment with 1 or 4 mg/kg/day SOD. In addition, animals treated with SOD, 13 mg/kg/day, rapidly regained weight, whereas in those receiving vehicle or SOD at lower doses, the decrease in body weight persisted for the 7 days of the study (**Fig. 1**).

Treatment with SOD, 13 mg/kg, also resulted in a significant reduction of the macroscopic damage score at day 7 compared with animals receiving vehicle or SOD at doses of 1 or 4 mg/kg/day (**Table 1**). Concurrent with these findings, colon weight was also significantly reduced in colitic animals treated with the highest dose of SOD (**Table 1**). Histological damage score was also significantly reduced by treatment with 13 mg/kg/day of SOD (**Table 1**). In particular, animals treated with 13 mg/kg SOD had a marked reduction of the inflammatory infiltrate that was mostly limited to the mucosa, without surpassing the lamina propria, and extensive areas of ulcerations

TABLE 1. Effects of SOD Treatment on Clinical, Pathologic, and Biochemical Markers of Colitis Severity

	Control n = 6	Vehicle n = 6	SOD, 1 mg/kg n = 6	SOD, 4 mg/kg n = 7	SOD, 13 mg/kg n = 8
Macroscopic score	0.0 \pm 0.0	7.3 \pm 0.8*	7.7 \pm 0.6*	7.5 \pm 0.8*	4.1 \pm 0.7* [†]
Histologic score	0.0 \pm 0.0	8.6 \pm 0.5*	7.3 \pm 0.3*	8.3 \pm 0.7*	5.6 \pm 0.6* [†]
Distal colon weight (g)	0.6 \pm 0.1	4.3 \pm 0.4*	4.8 \pm 0.6*	4.1 \pm 0.7*	2.1 \pm 0.3 [†]
IL-6 (pg/ml)	51.9 \pm 27.2	210.8 \pm 64.5*	204.8 \pm 20.1*	94.2 \pm 14.6 [†]	108.6 \pm 14.4 [†]

* $P < 0.05$ versus control; [†] $P < 0.05$ versus vehicle.

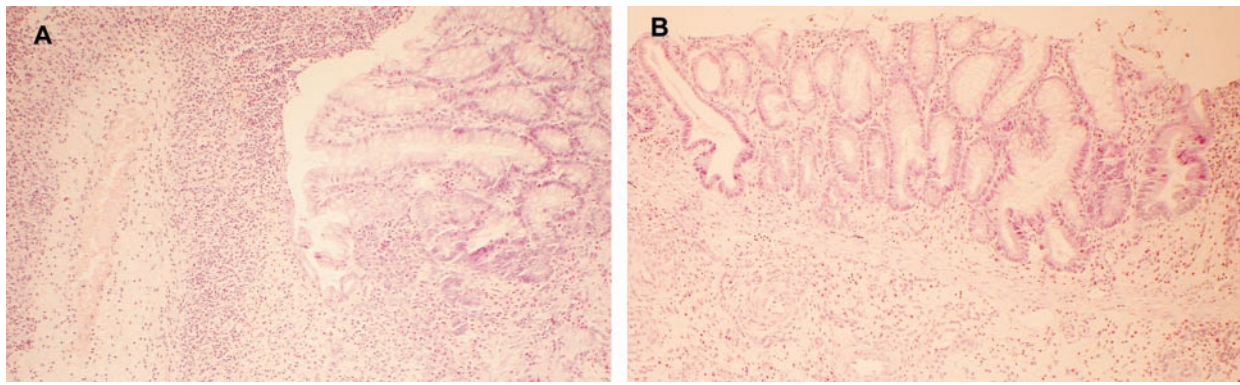


Fig. 2. Representative histologic lesions of colitic rats treated with vehicle (A) or SOD, 13 mg/kg/day (B), for 7 days. An intense, inflammatory infiltrate in the mucosa and s.m. with extensive areas of ulceration was seen uniformly in vehicle-treated, colitic rats. By contrast, SOD-treated rats had a marked reduction of the inflammatory infiltrate, mostly limited to the lamina propria, and minimal ulceration. A distortion of crypt architecture is still evident in the latter group. H&E, 100 \times .

characteristic of the vehicle-treated animals were not observed in the SOD-treated group (**Fig. 2**). Neutrophil infiltration into the inflamed intestine, measured as MPO activity, was significantly reduced by treatment with SOD. Of note, treatments with 4 and 13 mg/kg/day SOD were followed by significant reductions of MPO activity (**Fig. 3**).

To rule-out the possibility that treatment with SOD, started at 4 h after induction of colitis, was exerting its beneficial effect by preventing the inducing action of TNBS, additional groups of animals were studied at 24 h. At this time-point, in which no differences in body weight were detected as shown in Figure 1, animals treated with vehicle or with SOD, 13 mg/kg/day, had a similar macroscopic colitis score (4.3 ± 0.3 vs. 4.0 ± 0.0), histological colitis score (7.3 ± 0.3 vs. 6.8 ± 0.6), and distal colon weight (2.1 ± 0.2 g vs. 2.4 ± 0.3 g).

Development of TNBS-induced colitis was associated with a significant increase of IL-6 levels in plasma. As shown in Table 1, treatment with SOD at doses of 4 and 13 mg/kg/day signif-

icantly reduced the increase in IL-6 concentrations in plasma relative to colitic animals receiving vehicle or 1 mg/kg/day SOD.

Effects of treatment with SOD on colonic lipid oxidation

Levels of LPO in colonic tissue from different experimental groups are shown in **Figure 4**. In comparison with control animals, development of colitis was associated with a significant increase in LPO in colonic tissue (0.5 ± 0.4 nmol/g vs. 9.2 ± 2.8 nmol/g, $P < 0.05$). Treatment with SOD, 1 mg/kg/day, for 1 week, which did not alter the severity of colitis, did not induce any significant changes in the levels of LPO in colon (8.1 ± 1.4 nmol/g) when compared with vehicle-treated animals. The levels of LPO were significantly lower in colitic animals treated with 4 mg/kg (3.4 ± 1.6 nmol/g) or 13 mg/kg (2.7 ± 1.6 nmol/g) of SOD; these levels were not significantly different from the noncolitic group.

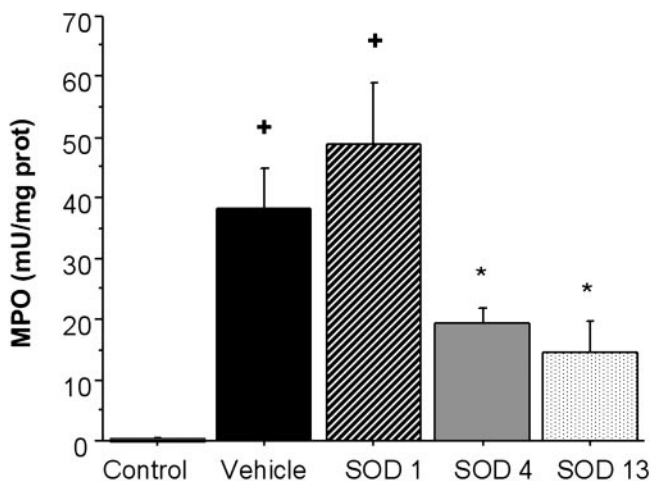


Fig. 3. Effect of treatment with vehicle or different doses of SOD (1, 4, or 13 mg/kg) on colonic MPO activity in animals studied 7 days after induction of colitis. +, $P < 0.05$, versus control animals; *, $P < 0.05$, versus vehicle-treated, colitic animals.

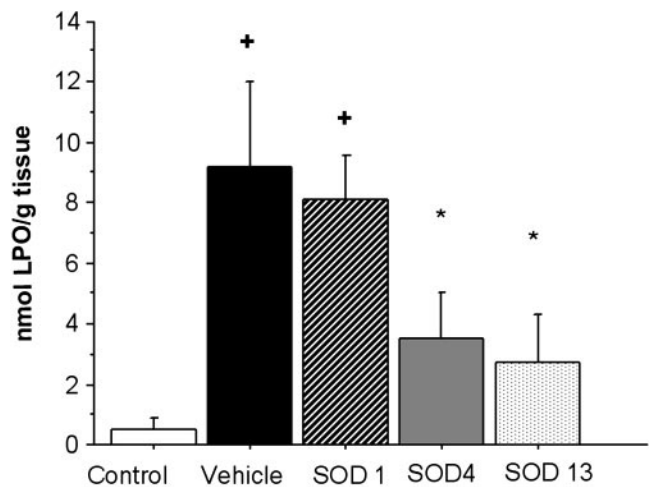


Fig. 4. Effects of treatment with vehicle or different doses of SOD (1, 4, or 13 mg/kg) on concentration of lipid peroxides in colitic animals studied 7 days after induction of colitis. +, $P < 0.05$, versus controls; *, $P < 0.05$, versus vehicle-treated, colitic animals.

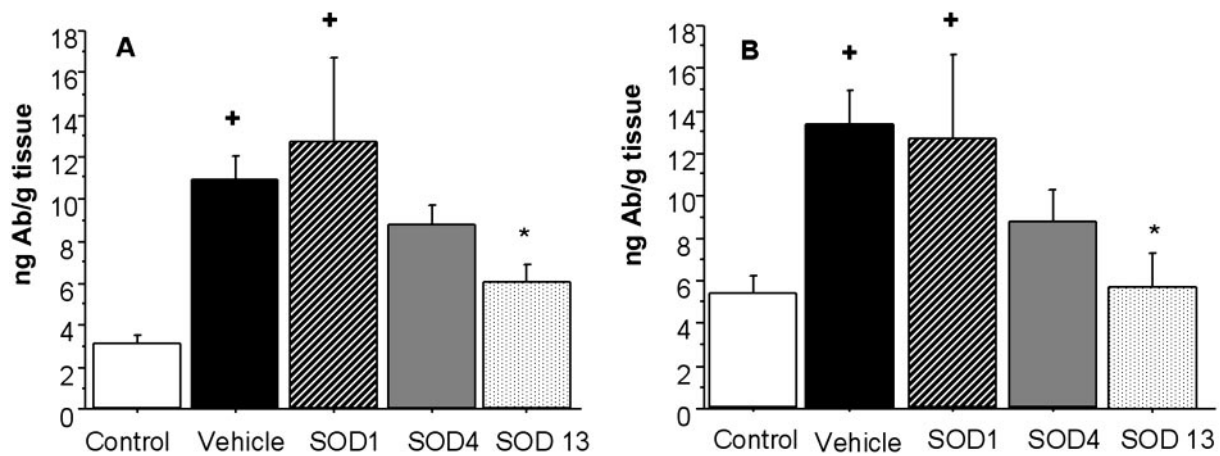


Fig. 5. Expression of endothelial VCAM-1 in (A) colon, (B) cecum relative to tissue weight in animals studied 7 days after induction of colitis. Effects of treatment with SOD. +, $P < 0.05$, versus controls; *, $P < 0.05$, versus vehicle-treated, colitic animals. Ab, Antibody.

Effects of treatment with SOD on VCAM-1 expression

In control animals, expression of VCAM-1 in colonic endothelium was very low. Appearance of colitis was associated with a marked up-regulation of VCAM-1 expression. This increment was dose-dependently attenuated by treatment with SOD, the dose of 1 mg/kg/day had no effect, a moderate but nonsignificant reduction in response to treatment with 4 mg/kg/day, and a significant reduction following treatment with the highest dose (Fig. 5A). The pattern of VCAM-1 expression in the more proximal colon (cecum) followed a similar pattern (Fig. 5B).

Leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules

Colitic rats showed a pronounced increase in leukocyte-endothelial cell interactions compared with control animals. There was a 12-fold increase in the flux of rolling leukocytes 7 days after induction of colitis. Treatment with SOD, 13 mg/kg/day, significantly reduced the flux of rolling leukocytes in colonic venules (Fig. 6A). Similar findings were found when the

number of rolling leukocytes (rolling cells/100 μm venule) was analyzed (Fig. 6B).

Very few adherent leukocytes were present in venules of control rats. A 16-fold increase in leukocyte adhesion was observed 7 days after induction of colitis in vehicle-treated rats. Treatment with SOD at the doses of 4 mg/kg/day and 13 mg/kg/day for 7 days resulted in a significant reduction in the number of adherent leukocytes, whereas the lower dose, 1 mg/kg/day, of SOD did not significantly modify the number of adherent leukocytes in colonic postcapillary venules (Fig. 7).

No differences in venular shear rate were observed between groups of control and colitic rats treated with SOD or vehicle (data not shown). Treatment with SOD did not result in changes in the number of peripheral blood circulating leukocytes (data not shown).

DISCUSSION

Cu/Zn SOD is an enzyme widely distributed in the cytoplasm of all mammalian cells and has been shown to exert anti-

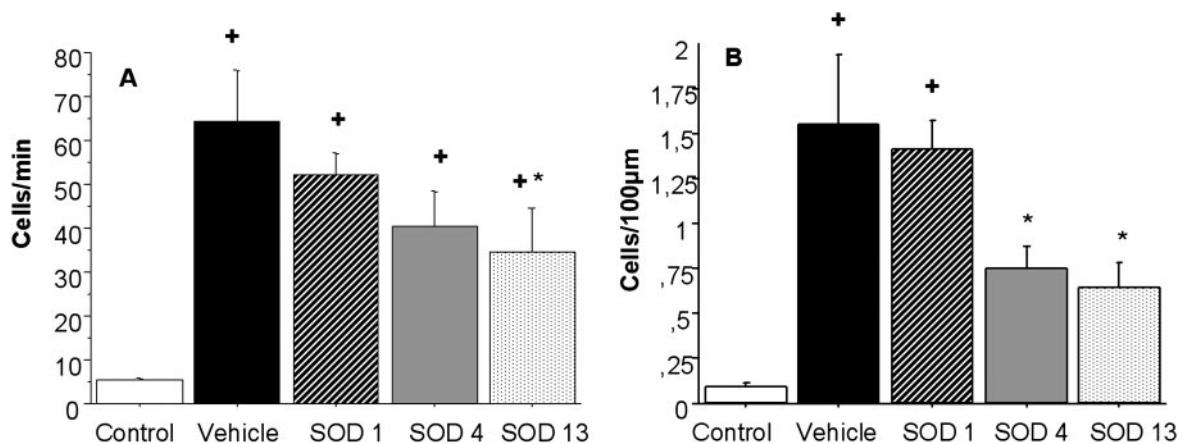


Fig. 6. Effects of treatment with vehicle or different doses of SOD on flux of rolling leukocytes (A) and number of rolling leukocytes (B) in colonic venules in animals studied 7 days after induction of colitis. +, $P < 0.05$, versus controls; *, $P < 0.05$, versus vehicle-treated, colitic animals.

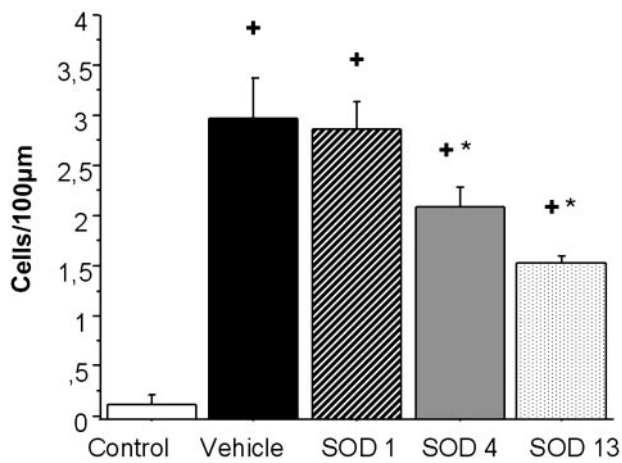


Fig. 7. Effects of treatment with vehicle or different doses of SOD on firm leukocyte adhesion in colonic venules in animals studied 7 days after induction of colitis. +, $P < 0.05$, versus controls; *, $P < 0.05$, versus vehicle-treated, colitic animals.

inflammatory effects in a variety of experimental models [9, 22, 34]. Human studies have reported decreased intestinal tissue levels of Cu/Zn SOD in patients with IBD [35], and pilot studies, including a very limited number of patients with ulcerative colitis or Crohn's disease, have reported a clinical response to treatment with Cu/Zn SOD [36], although this treatment is not currently used in the clinical setting. [37]

The current study demonstrates that treatment with Cu/Zn SOD effectively ameliorates TNBS-induced colitis in a dose-dependent manner. The beneficial effects of treatment with SOD, 13 mg/kg/day, are of similar magnitude to those previously reported by our group for dexamethasone in the same model of experimental colitis [38]. In keeping with the current observations, a previous study documented a significant reduction in macroscopic and microscopic scores in TNBS-induced colitis after 7 days of treatment with SOD [39]. However, in this study, the authors noted a significant amelioration in the treated group as early as 24 h after the induction of colitis, which may be related to the initiation of SOD treatment before colitis induction. In the current study, we chose to start treatment after colitis was established based on two main reasons: One is the superior clinical relevance of this strategy, as in the clinical setting, we treat patients with active disease, and a significant proportion of treatments that are useful when used prophylactically proves to be ineffective in established colitis. The second important reason to start treatment after induction of colitis by TNBS is that administering an antioxidant before TNBS might interfere with the process of colitis induction by this agent. Evidence has indicated that some of the inflammation produced by intrarectal administration of TNBS may be mediated by a burst of ROS produced from its metabolism within the mucosal interstitium [40]. Previous studies characterizing these effects over time indicate that most of the toxic effects of TBNS occur within 30 min of administration of this substance, and in a previous study, we observed that there is no further depletion of antioxidant systems in the colon after 4 h of TNBS administration [23]. The group of animals studied 24 h after induction of colitis treated with the highest dose of

SOD had inflammatory lesions of similar severity to those of colitic animals treated with vehicle, which excludes a direct effect of SOD hampering the development of colitis in our experimental setting.

Measurements of lipid peroxidation confirm previous evidence, indicating that development of colitis is associated with a significant burst in ROS, and we show that treatment with SOD dose-dependently inhibits peroxidation of lipids in the inflamed intestine. There is an apparent discrepancy between the relatively mild, beneficial effect of treatment with 4 mg/kg/day SOD on parameters of colitis severity and the robust effect of this treatment on lipid peroxidation, decreasing lipid peroxides in the inflamed intestine to levels similar to those observed after treatment with 13 mg/kg/day SOD and not different from controls. This may be related to the fact that peroxidation of lipids is only one of the effects of ROS, and a dose of SOD that significantly affects this process may have weaker effects on other factors more sensitive to oxidative stress such as activation of adhesion molecule expression and the process of leukocyte recruitment.

Recruitment of leukocytes from the circulation to the extravascular space is a critical event in inflammation. Two key factors regulating these complex processes are oxidant stress and specific adhesion molecules. It has previously been shown that modulation of oxidant stress in conditions such as ischemia-reperfusion or irradiation markedly reduces leukocyte trafficking into the affected organ [21, 41]. Our results now extend these observations to the field of IBD. Leukocyte-endothelial cell interactions were attenuated in response to treatment with 4 mg/kg SOD, with a significant reduction of the number of rolling leukocytes and a 30% reduction in the number of firmly adherent leukocytes, although the latter change did not reach statistical significance. This dose of SOD also induced a significant reduction (50%) in MPO activity, which has been shown by others to be proportional to the number of neutrophils in the inflamed tissue [42]. Therefore, recruitment of neutrophils seems to be particularly influenced by antioxidants. This contention is supported by a recent work showing that overexpression of Cu/Zn SOD in transgenic mice significantly reduced MPO activity in the colon without affecting the clinical or histological severity of colitis [12]. The highest dose of SOD tested in the current study (13 mg/kg/day) produced a significant reduction in leukocyte rolling and firm adhesion, and this was associated with a marked amelioration of all parameters of colitis severity.

The initial rolling interactions are mediated by the selectins, whereas firm adhesion and diapedesis are mediated by the interaction of integrins on the surface of leukocytes with endothelial adhesion molecules or the Ig superfamily. In a recent and elegant study, Cuzzocrea et al. [10] demonstrated that treatment with a low molecular weight SOD mimetic significantly reduced expression of P-selectin and ICAM-1 in colonic tissue. Our observation of reduced leukocyte rolling interactions in colonic postcapillary venules of colitic rats in response to treatment with SOD is in line with the notion that this treatment may affect expression of selectins. Nevertheless, the reduced rolling interaction between leukocytes and endothelial

cells in response to treatment with SOD probably is not a key factor in affording a clinical benefit in this model of colitis. We have previously demonstrated that TNBS-induced colitis blockade of E-, P-, or L-selectin, in spite of resulting in significant reductions in rolling interactions in colonic venules, does not alter the course of the disease [38].

Therefore, to further explore the mechanistic basis for the effects of SOD on intestinal inflammation, we concentrated on endothelial cell adhesion molecules involved in firm adhesion. Among these, VCAM-1 seems to play a crucial role, as immunoblockade of this adhesion molecule has the highest impact on leukocyte adhesion in TNBS-induced colitis [14] and is more potent than ICAM-1 or MAdCAM-1 immunoblockade in reducing inflammatory lesions in experimental colitis [15]. Previous *in vitro* studies using antioxidants support the idea that ROS are obligate intermediates in endothelial cell adhesion molecule induction, and these treatments also significantly block leukocyte infiltration into tissues, which depend on the expression of these molecules [43, 44]. Two recent *in vivo* studies using SOD gene transfer demonstrate that SOD overexpression results in a reduced VCAM-1 up-regulation in response to irradiation [34] or hypertension [45] by decreasing superoxide levels. Paralleling these observations, in the current study, we demonstrate that treatment with the highest dose of SOD markedly attenuated VCAM-1 expression in the colon of colitic rats, and this was followed by a significant reduction in the number of firmly adherent leukocytes and amelioration of colitis. The potential effect of SOD treatment preventing ICAM-1 up-regulation in TNBS colitis, demonstrated by Cuzzocrea et al. [10], may also contribute to limit leukocyte recruitment, as immunoneutralization of this adhesion molecule also reduces firm leukocyte adhesion in colonic venules, although to a lesser extent than VCAM-1 immunoneutralization [14]. Taken together, these observations indicate that modulation of the expression of endothelial adhesion molecules of the Ig superfamily is important in regulating vascular inflammatory processes in response to treatment with antioxidants such as SOD.

Reduction in oxidant stress in the course of intestinal inflammation may have effects, which contribute to the beneficial action observed in the TNBS model of colitis, on many components of the inflammatory cascade, in addition to adhesion molecule expression. In that regard, a decreased production of the highly cytotoxic oxidant peroxynitrite, which results from the interaction between nitric oxide and superoxide in the inflamed colon [46], may be one of the factors contributing to the beneficial effects of SOD in intestinal inflammation.

In conclusion, the protective effects of SOD demonstrated in this study shed new light on our understanding of the role of oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment in the pathogenesis of colonic inflammation. Our data suggest that SOD treatment decreases ROS generation and oxidative stress and thus, inhibits endothelial activation and indicate that modulation of factors that govern adhesion molecule expression and leukocyte-endothelial interactions, such as antioxidants, may be important, new tools for the treatment of IBD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant SAF2002-02211 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, and Grant C03/02 from Instituto de Salud Carlos III supported this work. J. S. is a recipient of a grant from Ministerio de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Grisham, M. B. (1994) Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* **344**, 859–861.
- Keshavarzian, A., Banan, A., Farhadi, A., Komanduri, S., Mutlu, E., Zhang, Y., Fields, J. Z. (2003) Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 720–728.
- Kitahora, T., Suzuki, K., Asakura, H., Yoshida, T., Suematsu, M., Watanabe, M., Aiso, S., Tsuchiya, M. (1988) Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **33**, 951–955.
- Rugtveit, J., Haraldsen, G., Hogasen, A. K., Bakka, A., Brandtzaeg, P., Scott, H. (1995) Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+LI+ monocyte-derived cells. *Gut* **37**, 367–373.
- Lih-Brody, L., Powell, S. R., Collier, K. P., Reddy, G. M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G. S., Katz, S., Floyd, R. A., McKinley, M. J., Fisher, S. E., Mullin, G. E. (1996) Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **41**, 2078–2086.
- Kruidenier, L., Kuiper, I., Lamers, C. B., Verspaget, H. W. (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J. Pathol.* **201**, 28–36.
- Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Mieremet-Ooms, M. A., van Hogezaand, R. A., Lamers, C. B., Verspaget, H. W. (2003) Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* **201**, 17–27.
- Keshavarzian, A., Morgan, G., Sedghi, S., Gordon, J. H., Doria, M. (1990) Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* **31**, 786–790.
- Xia, B., Deng, C. S., Chen, D. J., Zhou, Y., Xiao, J. Q. (1996) Role of copper zinc superoxide dismutase in the short-term treatment of acetic acid-induced colitis in rats. *Acta Gastroenterol. Latinoam* **26**, 227–230.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Caputi, A. P., Riley, D. P., Salvemini, D. (2001) Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. *Eur. J. Pharmacol.* **432**, 79–89.
- Kriegelstein, C. F., Cerwinka, W. H., Laroux, F. S., Salter, J. W., Russell, J. M., Schuermann, G., Grisham, M. B., Ross, C. R., Granger, D. N. (2001) Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J. Exp. Med.* **194**, 1207–1218.
- Kruidenier, L., van Meeteren, M. E., Kuiper, I., Jaarsma, D., Lamers, C. B., Zijlstra, F. J., Verspaget, H. W. (2003) Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 753–765.
- Panés, J., Granger, D. N. (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* **114**, 1066–1090.
- Sans, M., Panés, J., Ardite, E., Elizalde, J. I., Arce, Y., Elena, M., Palacin, A., Fernandez-Checa, J. C., Anderson, D. C., Lobb, R., Piqué, J. M. (1999) VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* **116**, 874–883.
- Soriano, A., Salas, A., Salas, A., Sans, M., Gironella, M., Elena, M., Anderson, D. C., Piqué, J. M., Panés, J. (2000) VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab. Invest.* **80**, 1541–1551.
- Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F. H., Malchow, H. A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnalek, P., Zadorova, Z., Palmer, T., Donoghue, S. (2003) Natalizumab for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 24–32.
- Lew, E. A., Stoffel, E. M. (2003) Natalizumab for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1599.
- Iademarco, M. F., McQuillan, J. J., Rosen, G. D., Dean, D. C. (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.* **267**, 16323–16329.

19. Neish, A. S., Khachigian, L. M., Park, A., Baichwal, V. R., Collins, T. (1995) Sp1 is a component of the cytokine-inducible enhancer in the promoter of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 28903–28909.
20. Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., Wallace, J. L. (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**, 795–803.
21. Mollà, M., Gironella, M., Gimeno, M., Closa, D., Coronel, P., Biete, A., Piqué, J. M., Panés, J. (2002) The protective effect of superoxide dismutase (SOD) in radiation-induced intestinal inflammation. *Gastroenterology* **122**, A401.
22. Closa, D., Bulbena, O., Rosello-Catafau, J., Fernandez-Cruz, L., Gelpi, E. (1993) Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation* **17**, 563–571.
23. Ardite, E., Sans, M., Panes, J., Romero, F. J., Pique, J. M., Fernandez-Checa, J. C. (2000) Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab. Invest.* **80**, 735–744.
24. Mourelle, M., Guarner, F., Malagelada, J. R. (1996) Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model of colitis. *Gastroenterology* **110**, 1093–1097.
25. Appleyard, C. B., Wallace, J. L. (1995) Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol.* **269**, G119–G125.
26. Granell, S., Gironella, M., Bulbena, O., Panes, J., Mauri, M., Sabater, L., Aparisi, L., Gelpi, E., Closa, D. (2003) Heparin mobilizes xanthine oxidase and induces lung inflammation in acute pancreatitis. *Crit. Care Med.* **31**, 525–530.
27. Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B., Razem, D. (1996) The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 53–63.
28. Sanz, M. J., Hartnell, A., Chisholm, P., Williams, C., Davies, D., Weg, V. B., Feldmann, M., Bolanowski, M. A., Lobb, R. R., Nourshargh, S. (1997) Tumor necrosis factor α -induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on $\alpha 4$ integrin/vascular cell adhesion molecule-1 adhesion pathways. *Blood* **90**, 4144–4152.
29. Fraker, P. J., Speck Jr., J. C. (1978) Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849–856.
30. Panés, J., Perry, M. A., Anderson, D. C., Manning, A., Leone, B., Cepinskas, G., Rosenbloom, C. L., Miyasaka, M., Kviety, P. R., Granger, D. N. (1995) Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am. J. Physiol.* **269**, H1955–H1964.
31. Komatsu, S., Panés, J., Grisham, M. B., Russell, J. M., Mori, N., Granger, D. N. (1997) Effects of intestinal stasis on intercellular adhesion molecule 1 expression in the rat: role of enteric bacteria. *Gastroenterology* **112**, 1971–1978.
32. Davis, M. J. (1987) Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc. Res.* **34**, 223–230.
33. Lipowsky, H. H., Kovalcheck, S., Zweifach, B. W. (1978) The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ. Res.* **43**, 738–749.
34. Epperly, M. W., Sikora, C. A., DeFilippi, S. J., Gretton, J. E., Bar-Sagi, D., Archer, H., Carlos, T., Guo, H., Greenberger, J. S. (2002) Pulmonary irradiation-induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 is decreased by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **8**, 175–187.
35. Kruidenier, L., Kuiper, I., Van Duijn, W., Marklund, S. L., van Hogezaand, R. A., Lamers, C. B., Verspaget, H. W. (2003) Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* **201**, 7–16.
36. Emerit, J., Pelletier, S., Tosoni-Verilgne, D., Mollet, M. (1989) Phase II trial of copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in treatment of Crohn's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 145–149.
37. Niwa, Y., Somiya, K., Michelson, A. M., Puget, K. (1985) Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen-related human disorders. A preliminary study. *Free Radic. Res. Commun.* **1**, 137–153.
38. Sans, M., Salas, A., Soriano, A., Prats, N., Gironella, M., Pizcueta, P., Elena, M., Anderson, D. C., Pique, J. M., Panes, J. (2001) Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology* **120**, 1162–1172.
39. Yavuz, Y., Yuksel, M., Yegen, B. C., Alican, I. (1999) The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Res. Exp. Med. (Berl.)* **199**, 101–110.
40. Grisham, M. B., Volkmer, C., Tso, P., Yamada, T. (1991) Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* **101**, 540–547.
41. Granger, D. N., Benoit, J. N., Suzuki, M., Grisham, M. B. (1989) Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* **257**, G683–G688.
42. Krawisz, J. E., Sharon, P., Stenson, W. F. (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* **87**, 1344–1350.
43. Lum, H., Roebuck, K. A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C719–C741.
44. Sasaki, M., Ostanin, D., Elrod, J. W., Oshima, T., Jordan, P., Itoh, M., Joh, T., Minagar, A., Alexander, J. S. (2003) TNF- α -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase-dependent. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C422–C428.
45. Li, L., Crockett, E., Wang, D. H., Galligan, J. J., Fink, G. D., Chen, A. F. (2002) Gene transfer of endothelial NO synthase and manganese superoxide dismutase on arterial vascular cell adhesion molecule-1 expression and superoxide production in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 249–255.
46. Yue, G., Lai, P. S., Yin, K., Sun, F. F., Nagele, R. G., Liu, X., Linask, K. K., Wang, C., Lin, K. T., Wong, P. Y. (2001) Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 915–925.

Down-regulation of Endothelial Adhesion Molecules and Leukocyte Adhesion by Treatment with Superoxide Dismutase Is Beneficial in Chronic Immune Experimental Colitis

Joaquim Seguí, PhD,* Fèlix Gil, BA,* Meritxell Gironella, PhD,* Manuel Alvarez, MD,*† Mercedes Gimeno, PhD,‡ Pilar Coronel, PhD,‡ Daniel Closa, PhD,§ Josep M. Piqué, MD,* and Julián Panés, MD*

Abstract: Modulation of adhesion molecule expression that govern trafficking of leukocytes into the inflamed intestine is envisioned as a new strategy for treatment of inflammatory bowel disease (IBD). This study was designed to determine the impact of reducing oxidative stress on adhesion molecules expression and leukocyte recruitment in experimental chronic colitis. For that purpose, colitic interleukin-10 knockout and wild-type mice were studied. Groups of animals were treated with Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 13 mg/kg/d or vehicle for either 7 or 14 days. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 were determined; leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules were studied with intravital microscopy; and changes in colon pathology and biomarkers of colitis severity were determined. Development of colitis was associated with a marked increase in endothelial vascular cell adhesion molecule-1 and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 expression, which were significantly reduced by treatment with SOD1. The increase in leukocyte rolling and adhesion in colonic venules of colitic mice were significantly reduced by administration of SOD1. This treatment markedly reduced colonic lipid hydroperoxidation, myeloperoxidase activity, and plasma levels of serum amyloid A protein and resulted in significant, although modest, reductions in histologic damage score. The therapeutic value of SOD1 when administered

prophylactically was assessed in the dextran sulfate sodium model of colitis with similar positive results. These results indicate that SOD1 affords significant amelioration of colonic inflammatory changes in experimental colitis. Down-regulation of adhesion molecule expression, reduction of lipid hydroperoxidation, and recruitment of leukocytes into the inflamed intestine contribute to this beneficial effect.

Key Words: inflammatory bowel diseases, mucosal addressin cell adhesion molecule-1, oxidative stress, superoxide dismutase, vascular cell adhesion molecule-1

(*Inflamm Bowel Dis* 2005;11:872–882)

The immune responses that mediate local inflammation in inflammatory bowel disease (IBD) are not fully characterized. Nevertheless, there is little doubt that many cardinal signs of this inflammation are caused by the rapid and prolonged infiltration of leukocytes together with the release of inflammatory mediators such as proteases, cytokines, arachidonic acid metabolites, and reactive oxygen species (ROS). Thus, central to the pathology of IBD is the role of molecules that regulate the recruitment of leukocytes such as cell adhesion molecules (CAMs).¹ Both leukocyte and endothelial CAMs participate in transmigration of leukocytes from the vascular compartment to tissue sites of inflammation or immune reactions. This is a multistep process involving rolling, activation, firm adhesion, and subsequent migration of leukocytes across the vascular endothelium.

Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) are endothelial CAMs of the immunoglobulin superfamily with a critical role in mediating the firm adhesion of leukocytes to endothelial cells in a variety of acute and chronic inflammatory diseases.^{2,3} Up-regulation of these CAMs has been shown in clinical and experimental IBD, and the functional relevance of this increased expression has been documented by

Received for publication December 22, 2004; accepted July 28, 2005.

From the *Department of Gastroenterology, Hospital Clínic, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; †Department of Gastroenterology, P. Universidad Católica de Chile, Chile; ‡Teduc-Meiji Farma Laboratories, Madrid, Spain; and §Institut d'investigacions biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), IDIBAPS, Barcelona, Spain.

Supported by Grant SAF2002-02211 from Ministerio de Ciencia y Tecnología and Grant C03/02 from Instituto de Salud Carlos III. J. Seguí is a recipient of a grant from Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Reprints: Julián Panés, MD, Gastroenterology Department, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: jpanes@clinic.ub.es)

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

experimental studies using blocking antibodies against VCAM-1 or MAdCAM-1 showing a robust beneficial effect on the course of colitis.^{4,5} Although the effectiveness of this strategies has not been directly assessed in human IBD, immunoneutralization of the corresponding leukocyte counter receptors, members of the $\alpha 4$ family of integrins, has proved highly effective in the treatment of ulcerative colitis (UC)^{6,7} and Crohn's disease (CD).^{8,9}

ROS have an important role in the regulation of several genes involved in immune and inflammatory responses. Functional analysis of the human VCAM-1 promoter showed that several oxidant-sensitive transcription factors are associated with activation of *VCAM-1* gene expression in response to interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α .^{10,11} Furthermore, *in vitro* studies have shown that expression of superoxide dismutase (SOD), but not catalase, by adenovirus, suppressed TNF- α -induced VCAM-1 mRNA accumulation.¹⁰ Relatively little is known about the modulation and expression of MAdCAM-1 in mucosal tissue *in vivo*. *In vitro* studies using endothelial venular cells have shown that up-regulation of this adhesion molecule in response to stimulation by TNF- α is oxidant dependent, because treatment with various antioxidants prevents cytokine-induced up-regulation of MAdCAM-1.^{12,13}

In a previous study, we showed that in the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) model of colitis, treatment with Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) down-regulates VCAM-1 expression and leukocyte recruitment in a dose-dependent manner, resulting in clinical and histologic amelioration of colitis.¹⁴ However, free radical production is a key mechanism for the appearance of colonic inflammation in the TNBS model.¹⁵ Although in the aforementioned study we treated animals with established colitis, testing the efficacy of this therapeutic strategy on an immune model of colitis seems appropriate. Furthermore, because no experimental model of IBD reproduces completely the alterations in human disease, consistent findings in different models of IBD increase the likelihood that a particular therapeutic strategy is effective in human IBD. Therefore, the aim of this study was to characterize the effects of SOD1 in a well characterized immune chronic model of spontaneous colitis such as IL-10-deficient mice (IL-10^{-/-}).¹⁶

In this study, we investigated whether treatment with SOD1 affects expression of CAMs, leukocyte recruitment, lipid hydroperoxidation (LPO) levels in colonic tissue, and biomarkers of disease severity in colitic IL-10^{-/-} and wild-type (WT) mice. Using the dual radiolabeled monoclonal antibody (MAb) technique, an accurate method to quantify expression of adhesion molecules *in vivo*,¹⁷⁻²⁰ we have evaluated the changes of MAdCAM-1 and VCAM-1 associated with development of colitis and how these are affected by treatment with SOD1. To assess the functional significance of changes in CAM expression, we have used intravital video-

microscopy to measure leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules and determined the therapeutic efficacy of SOD1 in chronic immune colitis in terms of clinical, biochemical, and pathologic alterations. Finally, we assessed whether SOD1 has also the ability to prevent the development of colonic inflammation when administered prophylactically in the dextran sulfate sodium (DSS) model of colitis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

IL-10^{-/-} mice on a C57BL/10 background were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). After breeding and weaning in specific pathogen-free conditions, IL-10^{-/-} mice were grown in conventional housing conditions. Animals were used at 16 weeks of age to test the efficacy of antioxidant therapeutic strategy in established colitis. WT C57BL/10 mice were used as controls at 16 weeks of age and were obtained also from Jackson Laboratory.

To determine the preventive effect of SOD1 on the development of colitis, C57BL/6J mice were used. The animals were obtained from CRIFFA S.A. (Santa Perpètua de Mogoda, Spain) and maintained on conventional housing conditions. Animals were used at 12 weeks of age. Experimental colitis was induced in mice by giving 3% (wt/vol) DSS (mol wt, 40 kd; INC Biomedicals, Aurora, Ohio) in drinking water *ad libitum* for 6 days. The volume of drinking water was monitored in control and colitic mice in all treatment groups. C57BL/6J animals that received drinking water without DSS were used as controls. Principles of laboratory animal care and use (NIH publication 86-23) and the guidelines of procedures for animal experiments from the Generalitat de Catalunya were followed.

Treatment Groups

Groups of IL-10^{-/-} mice with established colitis were treated daily with subcutaneous doses of SOD1 (13 mg/kg/d) for a period of 7 or 14 days or vehicle (saline) for a period of 14 days. Additional groups of WT vehicle-treated mice were also studied. To determine the preventive effect of SOD1 groups of C57BL/6J mice with DSS-induced colitis were treated daily with a subcutaneous dose of SOD1 (13 mg/kg/d) or vehicle starting treatment 24 hours before the administration of DSS in drinking water. Additional groups of C57BL/6J control vehicle-treated mice were also studied.

For this study, a preparation of SOD1 commercially available (Ontosein) from Tedec-Meiji Farma Laboratories (Alcalá de Henares, Spain) was used. The dose of SOD1 is based on previous data showing that treatment with SOD1 produces a beneficial effect in reducing pulmonary inflammation associated with severe acute pancreatitis²¹ and ameliorates TNBS-induced colitis in rats.¹⁴

Assessment of Colonic Inflammatory Changes Colitis in IL-10^{-/-} mice

Animal groups were studied after 7 or 14 days of treatment (6–7 mice/group) to assess histologic and biochemical colonic changes. At the time of the study, animals were anesthetized by subcutaneous injection of 0.2 mL of a combination 50% (vol/vol) of ketamine HCl (Ketolar; Parke-Davis, Morris Klein, N.J.) and xylacine (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). Samples of blood were collected by open cardiac puncture under aseptic conditions using a 1-mL syringe and placed in Eppendorf vials; blood was spun at 1500g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant serum was pipetted into autoclaved Eppendorf vials and frozen at –80°C for later assay of SAA protein using a quantitative colorimetric commercial kit (Biosource International, Nivelles, Belgium). Thereafter, the colon was removed, opened by longitudinal incision, rinsed with saline, weighed, and its length measured. The colon was longitudinally cut into 2 strips, 1 of the strips was snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for later assay of myeloperoxidase (MPO) activity and LPO concentration. The other strip was fixed in 10% formalin for histologic studies of microscopic damage, for which fixed colonic samples were embedded in paraffin, and sections (5 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin. The degree of inflammation of the colon was graded using a previously described histologic score that takes into account the presence of inflammatory cells and goblet cells, mucosal thickening, cell infiltration in the submucosa, destruction of architecture, presence of ulcers, and crypt abscess.²²

DSS-induced colitis

Basic maneuvers for animal and samples handling were identical to those described for IL-10^{-/-} animals. Clinical parameters, including body weight, stool consistency (score: 0, normal stools; 1, soft stools; and 2, liquid stools), and rectal bleeding (score: 0, negative fecal occult blood test, HemoFEC; Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain; 1, positive fecal occult blood test; 2, visible rectal bleeding) were determined. The disease activity index (DAI) was determined as a combination of the above parameters according to a scoring criteria previously described.²³ In this model, the severity of histologic damage was determined using a previously established score that takes into account the percentage of mucosal injury, extension of total colon length, and lesion depth.²⁴

Measurement of Lipid Hydroperoxidation

Quantification of LPO was performed in colon tissue samples (100–150 mg) by direct measurement of LPO concentration according to a previously described technique,²⁵ based on the property of hydroperoxides to readily react with ferrous ions to produce ferric ions, which are detected using thiocyanate ions as the chromogen. In brief, after tissue samples were homogenized in 1000 µL of high-performance

liquid chromatography (HPLC)-grade water, 600 µL of the homogenate was used for measurement of LPO concentration; the rest of this homogenate was snap frozen to be used in a later MPO assay. LPO were extracted into chloroform and stored at –80°C until the time of the assay. For performing the assay, the commercially available kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, Mich.) was used following the manufacturer's instructions. Results are expressed in nanomoles lipid hydroperoxide per gram tissue.

Myeloperoxidase Assay

MPO activity was measured photometrically by employing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate.²⁶ Samples of 400 µL of HPLC-grade water colon homogenate were disrupted for 30 seconds using a Labsonic sonicator (B. Braun, Melsongen, Germany) and subsequently snap-frozen in dry ice and thawed on 3 consecutive occasions before a final 30-second sonication. Samples were incubated at 60°C for 2 hours and spun down at 4000g for 12 minutes. Supernatants were collected for MPO assay. Enzyme activity was assessed photometrically at 630 nm. The assay mixture consisted of 20 mL of supernatant, 10 mL of tetramethylbenzidine (final concentration, 1.6 mmol/L) dissolved in dimethyl sulfoxide, and 70 mL of H₂O₂ (final concentration, 3.0 mmol/L) diluted in 80 mmol/L phosphate buffer, pH 5.4. An enzyme unit is defined as the amount of enzyme that produces an increase of 1 absorbance unit per minute.

Endothelial MAdCAM-1 and VCAM-1 Expression

Thirty-six mice were used to characterize expression of CAMs. Twelve WT mice and 24 IL-10^{-/-} mice treated with either saline or SOD1 for 14 days (n = 12/group) were studied to assess CAMs expression. The MAb's used were 429 BD (Pharmingen, Heidelberg, Germany), an IgG_{2a} against mouse VCAM-1, and MECA-367 (Pharmingen, San Diego, Calif.), an IgG_{2a} against mouse MAdCAM-1, and UPC-10 (Sigma Quimica, Madrid, Spain), a nonbinding murine IgG_{2a}. The binding MABs 429, MECA-367 were labeled with ¹²⁵I (Amersham Ibérica, Madrid, Spain), whereas the nonbinding MAB UPC-10 was labeled with ¹³¹I (Amersham Ibérica). Radioiodination of the MABs was performed by using the ionogen method as described previously.²⁷ Animals were anesthetized with ketamine HCl and xylacine as described above, and the right carotid artery and right jugular vein were cannulated. For assessment of endothelial VCAM-1 expression, 30 µg ¹²⁵I-429 was used; for assessment of endothelial MAdCAM-1 expression, 10 µg ¹²⁵I-367 was used. In all cases, 3 µg ¹³¹I-UPC-10 was added to the mixture. Doses of anti-VCAM-1 and anti-MAdCAM-1 MAB's proved to be saturating in previous studies.^{18,28,29} The mixture of binding and nonbinding MAB's was administered through the jugular catheter. The injected activity in each experiment was

calculated by counting a 5- μ L sample of the mixture containing the radiolabeled MAb's. The accumulated activity of each MAb in an organ was expressed as ng of antibody per gram of tissue. The formula used to calculate CAM expression was as follows: endothelial expression = $[(\text{cpm } ^{125}\text{I Organ (g}^{-1}) \cdot \text{cpm } ^{125}\text{I Injected}^{-1}) - (\text{cpm } ^{131}\text{I Organ (g}^{-1}) \cdot \text{cpm } ^{131}\text{I Injected}^{-1}) \times (\text{cpm } ^{125}\text{I in Plasma}) / (\text{cpm } ^{131}\text{I in Plasma})]$ ng injected MAb. This formula was modified from the original method¹⁸ to correct the tissue accumulation of nonbinding MAb for the relative plasma levels of both binding and nonbinding MAb's.³⁰

In Vivo Assessment of Leukocyte–Endothelial Cell Interactions in Colonic Venules

Leukocyte–endothelial cell interactions in colonic submucosal and lamina propria venules were characterized using intravital microscopy techniques in the colitis models and treatment groups described above. For each model, each group was comprised of 5 to 7 animals. For intravital microscopy, experiments mice were anesthetized by subcutaneous injection of a combination of ketamine HCl and xylazine as described above, the right carotid artery was cannulated, and the abdomen was opened through a midline incision. A segment of the distal colon was chosen for microscopic examination, gently exteriorized, and covered with a cotton gauze soaked with bicarbonate buffer. Mice were placed on an adjustable microscope stage, and the colon was extended over a non-autofluorescent coverslip that allowed observation of a segment of tissue. An inverted microscope (Diaphot 300; Nikon, Tokyo, Japan) with a CF Fluor $\times 40$ objective lens (Nikon) was used. A charge-coupled device (CCD) camera (model XC-77; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) with a C2400 CCD camera control unit and a C2400-68 intensifier head, mounted on the microscope, projected the image onto a monitor (Trinitron KX-14CP1; Sony, Tokyo, Japan). The images were recorded using a videocassette recorder (SR-S368E; JVC, Tokyo, Japan). Leukocytes were in vivo labeled by subcutaneous injection of rhodamine 6G (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Rhodamine 6G–associated fluorescence was visualized by epi-illumination at 510–560 nm, using a 590-nm emission filter. Single unbranched submucosal and lamina propria venules ranging between 20 and 35 μ m in diameter (D) were studied. The flux of rolling leukocytes, leukocyte rolling velocity, and number of adherent leukocytes in 100 μ m of venule were determined off-line after playback of videotapes, as described previously.³⁰ Venular blood flow (Vbf) was estimated from the mean of the velocity of 3 free-flowing leukocytes (ffv), using the empirical relationship of $Vbf = \text{ffv}/1.6$.³¹ Venular wall shear rate (γ) was calculated, assuming cylindrical geometry, using the Newtonian definition $\gamma = 8 (Vbf/D)$.³² In each animal, 4 to 6 venules were examined, and values for number of rolling and adherent leukocytes, leukocyte rolling velocity, and venular wall shear rate were

calculated as the mean of each parameter in all venules examined in each animal.

Statistical Methods

Data were analyzed using analysis of variance with Bonferroni (post hoc) test or the Kruskal-Wallis test with Dunn multiple comparison test when appropriate. Values are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of Treatment with SOD on MAdCAM-1 and VCAM-1 Expression

In WT animals, expression of MAdCAM-1 in colonic endothelium was low. MAdCAM-1 expression was 5-fold increased in colitic animals compared with WT mice, and this increment was significantly attenuated by treatment with SOD1 for 14 days (Fig. 1A). Endothelial MAdCAM-1

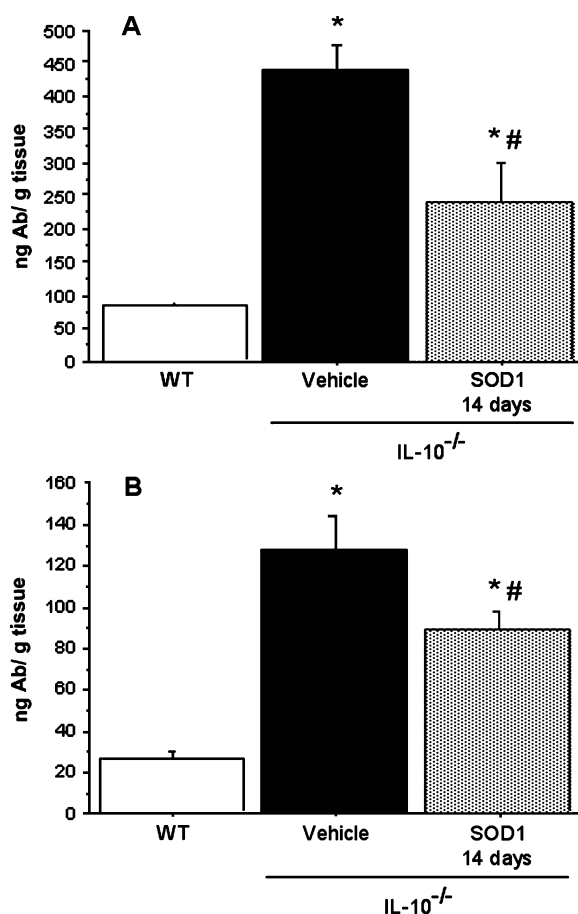


FIGURE 1. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on expression of endothelial MAdCAM-1 (A) and VCAM-1 (B) in colon, expressed as specific antibody accumulation per gram tissue weight. *, $P < 0.05$ versus WT animals; #, $P < 0.05$ versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

expression in organs other than the colon is summarized in Table 1; this expression was significantly increased compared with WT animals throughout digestive tract, and treatment with SOD1 significantly reduced MAdCAM-1 expression in all segments of the gut. An interesting observation is that SOD1 treatment reduced MAdCAM-1 expression to levels below those of control animals in some of these organs (Table 1). Particularly in the liver, MAdCAM-1 expression was abrogated by treatment with SOD1.

In WT animals, expression of VCAM-1 in colonic endothelium was very low, VCAM-1 expression increased 5-fold in colitic animals compared with WT mice, and this increment was significantly attenuated by treatment with SOD1 for 14 days (Fig. 1B). The pattern of VCAM-1 expression in organs other than the colon is summarized in Table 2; this expression was significantly increased compared with WT animals in liver, mesentery, and ileum. Treatment with SOD1 significantly down-regulated VCAM-1 expression in IL-10^{-/-} colitic mice in most of these organs (Table 2).

Leukocyte–Endothelial Cell Interactions in Colonic Venules

Colitic mice showed a pronounced increase in leukocyte–endothelial cell interactions compared with control animals. The flux of rolling leukocytes (cells rolling per minute in a fixed point) was 5-fold increased in IL-10^{-/-} colitic mice compared with WT mice. Treatment with SOD1 for 7 days did not modify the flux of rolling leukocytes, but when this treatment was prolonged for 14 days, a significant reduction in the flux of rolling leukocytes in colonic venules was observed (Fig. 2A). The number of rolling leukocytes (rolling cells/100 μ m venule; Fig. 2B) was 9-fold increased in IL-10^{-/-} colitic mice compared with WT mice. Treatment with SOD1 resulted in significant reductions of these interactions at both

time-points studied, i.e., 7 and 14 days after initiation of treatment.

Very few adherent leukocytes were present in venules of WT mice. A 7-fold increase in the number of adherent leukocytes was observed in IL-10^{-/-} colitic animals. Treatment with SOD1 for a period of 14 days resulted in a significant reduction in the number of adherent leukocytes, whereas in the group of animals treated only for 7 days, leukocyte adhesion in colonic postcapillary venules was not significantly modified (Fig. 3).

Shear rate, a measure of dispersal forces in the microvasculature that tend to oppose leukocyte adhesion, were marginally but significantly increased in IL-10^{-/-} colitic mice ($447.2 \pm 28.3 \text{ s}^{-1}$) compared with WT healthy mice ($354.4 \pm 23.5 \text{ s}^{-1}$), probably reflecting an increase in blood flow in the venules of colitic animals. Treatment with SOD1 partially reversed this changes, because shear rate values for the groups of animals treated with SOD1 for 7 ($405.1 \pm 28.9 \text{ s}^{-1}$) or 14 days ($401.2 \pm 40.6 \text{ s}^{-1}$) were not significantly different from those observed in WT mice, although the reduction in shear rate was also not significant compared with IL-10^{-/-} vehicle-treated mice.

Effects of Treatment with SOD on Colitis Severity

IL-10^{-/-} vehicle-treated mice had a decrease in colon length compared with WT mice. The reduction in colon length was significantly attenuated in the group of animals treated with SOD1 for 14 days (Table 3). In addition, an increase in the colon weight to length ratio was also observed in IL-10^{-/-} vehicle-treated mice compared with WT mice, which was significantly attenuated by treatment with SOD1 for 14 days (Table 3). Treatment with SOD1 for only 7 days did not influence these gross pathology changes.

TABLE 1. Endothelial MAdCAM-1 Expression in Different Vascular Beds in WT and IL-10^{-/-} Mice Treated with Either Vehicle or SOD1 for 14 Days

	WT (ng/g)	IL-10 ^{-/-} Vehicle (ng/g)	IL-10 ^{-/-} SOD1 (ng/g)
Lung	28.73 \pm 3.92	20.84 \pm 3.82	24.32 \pm 5.20
Heart	4.61 \pm 0.72	5.33 \pm 1.17	6.61 \pm 1.50
Liver	32.59 \pm 5.88	37.45 \pm 4.86	0.00 \pm 0.00*#
Spleen	306.00 \pm 52.24	222.86 \pm 26.98	56.10 \pm 10.56*#
Pancreas	20.71 \pm 1.97	158.19 \pm 42.72*	70.04 \pm 32.17
Mesentery	69.97 \pm 14.06	139.11 \pm 41.13	150.26 \pm 40.45
Stomach	68.13 \pm 3.17	119.69 \pm 16.71*	53.81 \pm 7.85#
Jejunum	306.32 \pm 31.71	388.96 \pm 31.93*	183.55 \pm 8.74*#
Ileum	260.31 \pm 8.69	437.88 \pm 36.25*	243.77 \pm 10.78#
Kidney	56.65 \pm 6.01	48.67 \pm 5.89	58.32 \pm 10.53
Muscle	2.00 \pm 0.36	1.58 \pm 0.48	5.47 \pm 2.82

*, $P < 0.05$, versus WT animals; #, $P < 0.05$, versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

TABLE 2. Endothelial VCAM-1 Expression in Different Vascular Beds in WT and IL-10^{-/-} Mice Treated with Either Saline or SOD1 for 14 Days

	WT (ng/g)	IL-10 ^{-/-} Vehicle (ng/g)	IL-10 ^{-/-} SOD1 (ng/g)
Lung	207.94 ± 41.22	252.83 ± 26.83	212.53 ± 10.75
Heart	168.35 ± 31.48	247.32 ± 11.50*	217.83 ± 30.48
Liver	1025.63 ± 56.37	1434.20 ± 99.74*	1112.51 ± 95.56†
Spleen	5148.99 ± 842.31	8585.48 ± 284.35*	8349.17 ± 1112.76*
Pancreas	47.14 ± 5.00	60.34 ± 2.75	59.22 ± 22.27
Mesentery	82.95 ± 9.52	146.45 ± 12.36*	103.99 ± 11.39†
Stomach	55.07 ± 9.49	80.60 ± 9.87	62.14 ± 11.11
Jejunum	62.19 ± 5.19	70.18 ± 4.03	52.54 ± 2.25†
Ileum	34.61 ± 4.22	66.58 ± 14.20*	34.91 ± 5.01†
Kidney	691.09 ± 49.12	730.87 ± 33.96	588.98 ± 81.14
Muscle	16.54 ± 4.09	34.00 ± 6.22*	17.68 ± 4.98†

*, *P* < 0.05 versus WT animals; †, *P* < 0.05 versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

Colonic histologic damage score was 5-fold higher in IL-10^{-/-} vehicle-treated mice compared with WT mice (Table 3). The severity of histologic damage was significantly attenuated in animals treated with SOD1 for a period of 14 days, although the reduction in histologic score in response to this treatment was very modest (Table 3). Histologic improvement in response to treatment with SOD1 was mainly related to a reduction in the number of inflammatory cells infiltrating the intestine and the restoration of goblet cell population (Table 3). Histologic analysis confirmed that treatment of 7 days did not influence significantly the severity of colitis.

Values of MPO activity in colonic homogenates were 3-fold higher in IL-10^{-/-} vehicle-treated mice compared with the WT group. MPO activity was significantly reduced by treatment with SOD1 for 14 days (Fig. 4), but not when this treatment was administered for 7 days. Development of colitis in IL-10^{-/-} was associated with a significant increase of plasma SAA levels, as shown in Figure 5; WT mice had no detectable SAA in plasma. Treatment with SOD1 for 14 days significantly reduced SAA protein concentration in plasma compared with IL-10^{-/-} vehicle-treated mice.

Effects of Treatment with SOD on Colonic Lipid Hydroperoxidation

Levels of LPO in colonic tissue from different experimental groups are shown in Figure 6. WT mice had a low concentration of LPO in colonic tissue. Levels of LPO were markedly increased in IL-10^{-/-} mice treated with vehicle compared with WT mice. The concentration of LPO in colonic tissue was significantly reduced in response to treatment with SOD1 for either 7 or 14 days.

Value of SOD1 as a Preventive Therapy

Administration of 3% DSS in drinking water caused a significant loss of body weight starting on day 4 and lasting

up to the end of the study in comparison with the control group. Preventive administration with SOD1 resulted in a significant attenuation of the decrease of body weight starting on day 4 and lasting up to the end of the study compared with colitic animals treated with vehicle (Fig. 7). All animals with DSS-induced colitis treated with vehicle had a positive fecal occult blood test and diminished stool consistency compared with control noncolitic animals. Both parameters were significantly attenuated by administration of SOD1 (Table 4). The DAI, combining weight loss, stool consistency, and rectal bleeding, was increased in colitic mice treated with vehicle compared with noncolitic mice. The DAI score was significantly reduced in colitic mice in response to treatment with SOD1 (Table 4). Values of MPO activity in colonic homogenates were 4-fold higher in DSS vehicle-treated mice compared with the control group. MPO activity was significantly reduced by treatment with SOD1 (Table 4). Colonic histologic damage score was 4-fold higher in DSS vehicle-treated mice compared with control group, but the severity of histologic damage was not modified in animals treated with SOD1 (Table 4).

DSS colitic mice treated with vehicle showed a pronounced increase in leukocyte–endothelial cell interactions compared with control animals. The flux of rolling leukocytes (rolling cells per minute) was increased 6-fold compared with control noncolitic mice. Treatment with SOD1 significantly reduced the flux of rolling leukocytes in colonic venules to levels similar to those of control animals (Table 4). The number of rolling leukocytes (rolling cells per 100 μm of venule) was also markedly (6-fold) increased in DSS-vehicle treated mice compared with the control group. Treatment with SOD1 resulted in significant reductions in the number of rolling leukocytes, also bringing this value to the low levels observed in noncolitic mice.

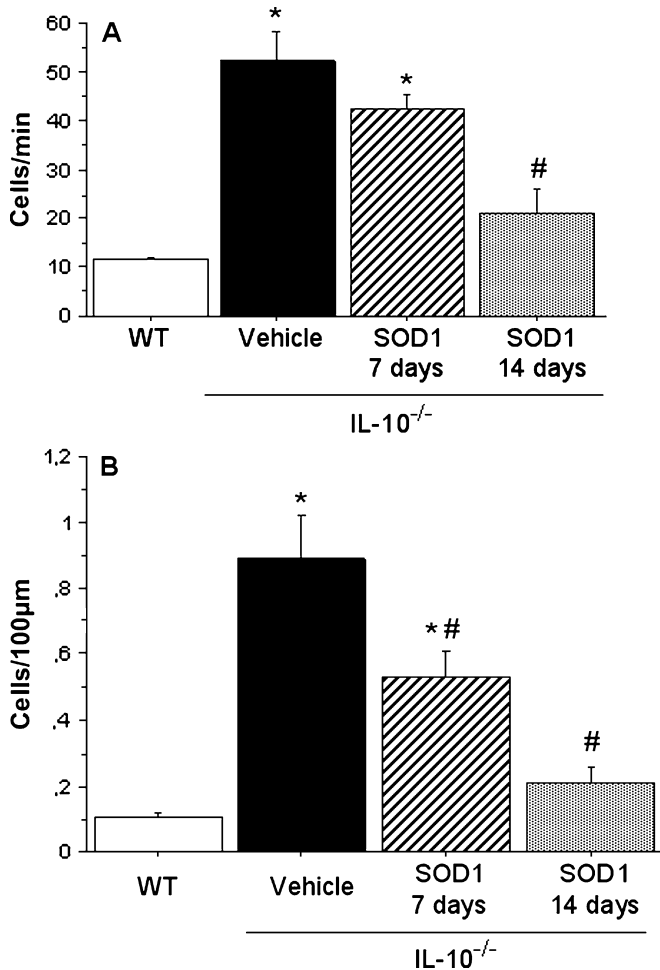


FIGURE 2. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on flux of rolling leukocytes (A) and number of rolling leukocytes (B) in colonic venules in animals treated for a period of 7 or 14 days. *, $P < 0.05$ versus WT animals; #, $P < 0.05$ versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

Few firmly adherent leukocytes were present in venules of control mice. In DSS colitic mice treated with vehicle, a 13-fold increase in the number of adherent leukocytes compared with control animals was observed. Treatment with SOD1 resulted in a significant reduction in the number of adherent leukocytes of about 60% (Table 4).

DISCUSSION

In this study, we provide evidence that modulation of oxidative stress in the inflamed intestine of colitic mice by means of treatment with SOD1 results in down-regulation of CAM expression, reduced leukocyte recruitment into the intestine, and amelioration of the severity of the intestinal inflammation in established colitis in the IL-10^{-/-} model, and that it is also effective as a preventive treatment in DSS-induced colitis.

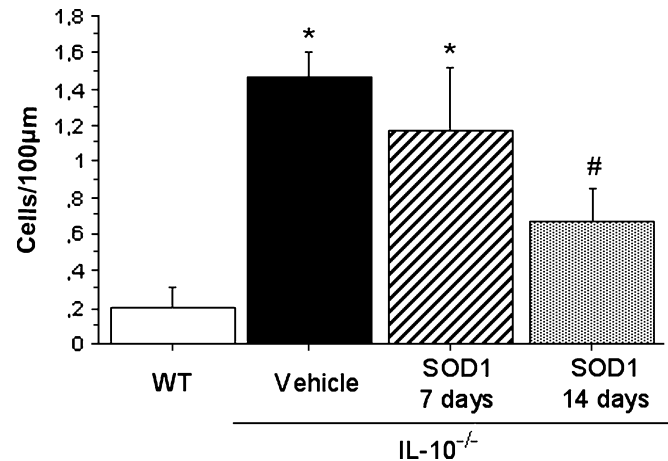


FIGURE 3. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on firm leukocyte adhesion in colonic venules in animals treated for a period of 7 or 14 days. *, $P < 0.05$ versus WT animals; #, $P < 0.05$ versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

Oxidative stress has been implicated in IBD pathogenesis; several studies have reported the presence of high concentration of ROS in chronic inflamed bowel both in humans and in animal models.^{15,33-36} Moreover, in vitro studies support the concept that endothelial cell adhesion molecules are modulated by ROS and that treatment with antioxidants significantly block leukocyte adhesion to endothelial cells, which depends on these molecules.^{13,37} VCAM-1 is 1 of the CAMs whose expression is modulated by ROS. Using SOD gene transfer, it was shown that SOD overexpression results in reduced VCAM-1 expression in response to irradiation³⁸ or hypertension³⁹ by decreasing superoxide levels. Paralleling these observations, it has been shown that treatment with SOD1 markedly attenuates VCAM-1 expression in TNBS-induced colitis rats,¹⁴ and this was followed by a significant reduction in the number of firmly adherent leukocytes and amelioration of colitis. In this study, we confirmed that modulation of oxidative stress in the context of colitis results in a significant reduction of VCAM-1 expression in colonic endothelium in a chronic immune-mediated model of colitis.

In this study, we further explored the possible effects of oxidative stress modulation on expression of other endothelial adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, namely MAdCAM-1, which has been suggested to play also a key role in leukocyte recruitment to the intestine. This analysis was based on previous evidence showing that treatment with antioxidants such as *N*-acetyl-L-cysteine or pyrrolidinedithiocarbamate results in significant down-regulation of TNF- α -induced MAdCAM-1 expression.¹³

MAdCAM-1 is up-regulated in the IL-10^{-/-} model of colitis⁴⁰ as well as in human IBD.⁴¹ Furthermore, immunoneutralization of MAdCAM-1 or its leukocyte counter-receptor, the integrin $\alpha 4\beta 7$, has been shown to afford significant clinical

TABLE 3. Macroscopic and Histological Changes in WT and IL-10^{-/-} Mice Treated with Either Saline or SOD1 for Either 7 or 14 Days

	WT	IL-10 ^{-/-} Vehicle	IL-10 ^{-/-} SOD1 7 days	IL-10 ^{-/-} SOD1 14 days
Colon length	9.08 ± 0.13	8.21 ± 0.15*	8.36 ± 0.29*	8.74 ± 0.20†
Colon weight to length ratio	28.00 ± 1.02	61.59 ± 4.04*	58.51 ± 1.47*	48.76 ± 5.93*†
Global histological score	0.66 ± 0.06	2.76 ± 0.08*	2.56 ± 0.21*	2.30 ± 0.10*†
Inflammatory cell score	0.64 ± 0.04	2.23 ± 0.10*	2.16 ± 0.26*	1.80 ± 0.20*†
Goblet cell score	0.42 ± 0.06	2.36 ± 0.11*	2.10 ± 0.24*	1.86 ± 0.22*†

*, *P* < 0.05 versus WT animals; †, *P* < 0.05 versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

benefit in experimental and human IBD.^{4,8,9} Here we provide evidence that treatment with SOD1 markedly reduced MAdCAM-1 expression throughout the gastrointestinal tract including stomach, jejunum, ileum, and colon. Of note, treatment with SOD1 reduced MAdCAM-1 expression to levels significantly lower than those observed in noncolitic WT mice in various segments of the gastrointestinal tract and particularly in the liver. These results suggest that oxidative stress is also involved in regulation of MAdCAM-1 expression under basal conditions.

The combined effects of SOD1 treatment on VCAM-1 and MAdCAM-1 expression in the inflamed intestine may be particularly relevant for its potential therapeutic effect. In that regard, a previous study showed that selective blockade of ICAM-1, VCAM-1, or α₄ integrins had no significant beneficial effect in a murine model of CD, but combined blockade of ICAM-1 and α₄ integrins, or ICAM-1 and VCAM-1, confers a beneficial effect.⁴²

We examined the effects that changes in expression of these 2 key adhesion molecules have on leukocyte recruitment

into the intestine. VCAM-1 and MAdCAM-1 may be involved in the initial rolling interactions of leukocytes along the venular endothelium, as well as in firm adhesion of these cells, which subsequently migrate to the interstitium of the inflamed tissue. Interestingly, in coincidence with down-regulation of VCAM-1 and MAdCAM-1 expression in response to treatment with SOD1, we observed a significant reduction in rolling interactions and in the number of leukocytes firmly adhered to the colonic venular endothelium in IL-10^{-/-} mice. Down-regulation of VCAM-1 expression may also affect the final process of leukocyte extravasation, because engagement of leukocyte α₄-integrin to endothelial cell VCAM-1 activates signals for the stimulation of the endothelial cell NADPH oxidase,⁴³ which generates extracellular ROS⁴⁴; those species activate local matrix metalloproteases,⁴⁵ which open an endothelial cell gate so that leukocytes can migrate between the endothelial cells. The reduction of leukocyte adhesion in response to SOD1 treatment in IL-10^{-/-} in mice was of lesser magnitude than that we obtained in previous studies using blocking antibodies against VCAM-1^{5,30} or MAdCAM-1,⁵

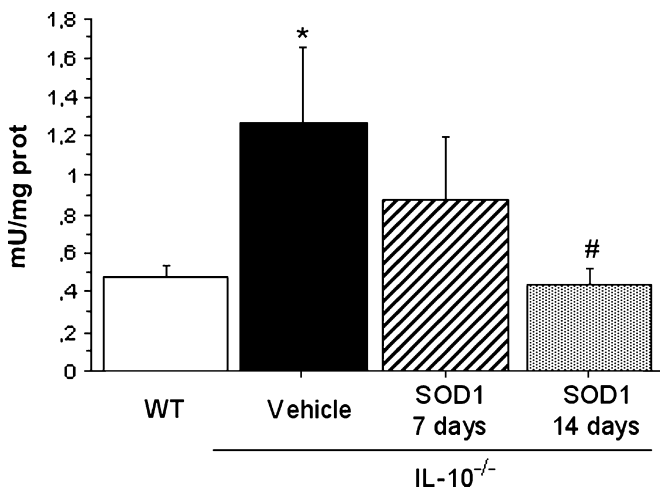


FIGURE 4. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on colonic MPO activity in animals treated for a period of 7 or 14 days. *, *P* < 0.05 versus WT animals; #, *P* < 0.05 versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

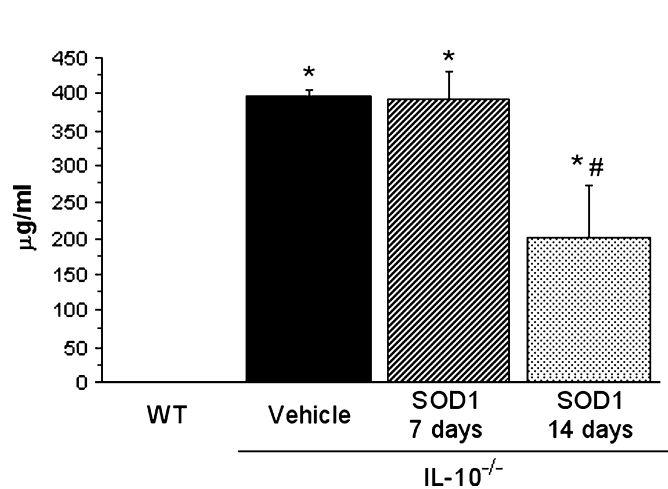


FIGURE 5. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on plasma levels of SAA in animals treated for a period of 7 or 14 days. *, *P* < 0.05 versus WT animals; #, *P* < 0.05 versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

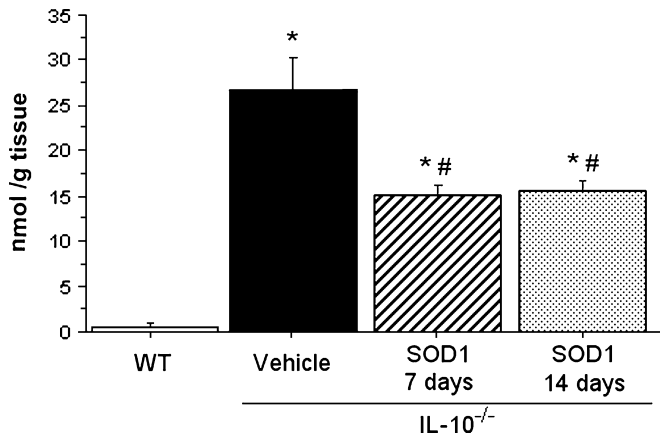


FIGURE 6. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) on concentration of LPOs in animals treated for a period of 7 or 14 days. *, $P < 0.05$ versus WT animals; #, $P < 0.05$ versus IL-10^{-/-} vehicle-treated animals.

because immunoneutralization of these adhesion molecules in murine experimental colitis brought the number of adherent leukocytes in colonic venules to levels similar to those of noncolitic animals, whereas in response to treatment with SOD1, leukocyte adhesion remained at levels still higher than those of noncolitic animals.

An interesting observation of this study is the effect of SOD treatment reducing plasma SAA levels. Levels of SAA increase and correlate with disease activity in both animal models⁴⁶ and human disease⁴⁷ and has been used as a biomarker of disease severity. However, SAA may have a modulatory effect on the immune response. In that regard, it has been shown that SAA promotes leukocyte chemotaxis and cellular adhesion,^{48–50} activates proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells,⁵¹ and increases metalloprotease secretion in various cell types.⁵²

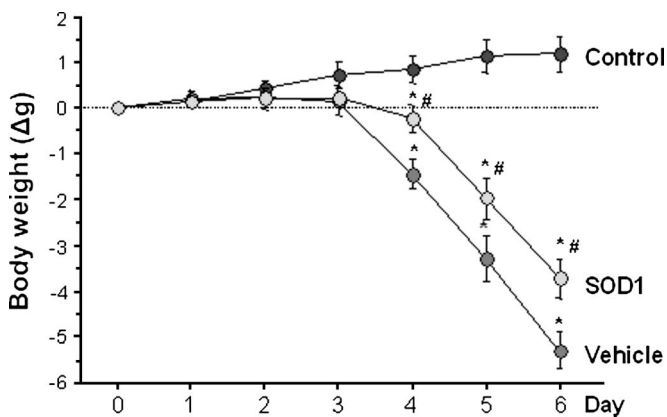


FIGURE 7. Effect of treatment with vehicle or SOD1 (13 mg/kg/d) as a preventive therapy on daily changes in body weight in colitic animals treated for a period of 7 days. *, $P < 0.05$ versus control noncolitic animals; #, $P < 0.05$ versus colitic vehicle-treated animals.

Therefore, reduction of circulating SAA in response to treatment with SOD1 may have an additive effect to down-regulation of VCAM-1 and MAdCAM-1 expression in reducing leukocyte recruitment into the inflamed intestine.

Measurements of LPO in colonic tissue confirm previous evidence, indicating that development of colitis is associated with a significant burst in ROS,^{14,15,33–36} and we show that treatment with SOD1 inhibits LPO in the inflamed intestine. This effect was already present 7 days after starting treatment with SOD1 and preceded the appearance of effects of treatment on clinical and histologic parameters of colitis severity. This may be related to the fact that hydroperoxidation of lipids is only one the effects of ROS, and SOD1 may have more delayed effects on other factors also sensitive to oxidative stress such as activation of adhesion molecule expression and the process of leukocyte recruitment. Beside the effects of ROS on CAM modulation and enhanced recruitment of leukocyte, treatment with antioxidants may also affect other components of the inflammatory response, such as production of inflammatory cytokines,^{14,53} apoptosis,⁵⁴ cell necrosis,⁵⁵ and endothelium-dependent vasodilation.⁵⁶ Moreover, ROS unbalance the equilibrium protease/antiprotease, present in physiological conditions in the gut interstitium, which produces cellular damage in intestinal epithelium.⁵⁷

The beneficial effects of SOD treatment on the clinical course of colitis was clear cut. A significant amelioration was observed both on macroscopic changes in the colon, in a biochemical measurement of neutrophil infiltration such as MPO, and in serum biomarkers of inflammatory activity such as SAA. However, changes in histologic severity of colitis, although significant, were of a modest magnitude in the IL-10^{-/-} model and absent in the DSS-induced model. Amelioration of the histology score of colitis is probably the most demanding parameter of treatment effectiveness. Several human and experimental studies have shown amelioration of clinical and sometimes also endoscopic parameters, with minor or no impact on histology scores.^{5,58} However, this study has a limitation for assessment of the true value of SOD in curing histology changes, which is the limited duration of the treatment period. It is conceivable that maintenance of treatment of longer than 14 days may afford additional benefit in terms of histology changes, and this aspect should be conveniently explored in future chronic studies.

The coincidence of amelioration of all parameters of colitis severity measured in response to treatment with SOD1 in 2 different models of experimental colitis in which this treatment was applied either in established chronic colitis or as a preventive therapeutic strategy, as well as previous evidence from our group showing also a beneficial effect of this treatment in a third experimental model of colitis, constitute a solid basis for the clinical development of this therapeutic approach. In our opinion, replication of therapeutic observations using SOD1 in different experimental models of colitis is

TABLE 4. Effects of Preventive Treatment with SOD1 on Parameters of Disease Severity and Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in DSS-induced Colitis

	Control	DSS-Saline	DSS-SOD1
Δ Body weight (g)	1.16 ± 0.39	-5.28 ± 0.40*	-3.71 ± 0.44*†
Diarrhea score	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00*	1.14 ± 0.26*†
Rectal bleeding	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00*	1.00 ± 0.22*†
Disease activity index	0.00 ± 0.00	2.75 ± 0.11*	1.64 ± 0.21*†
Microscopic score	3.42 ± 0.72	13.79 ± 2.02*	16.92 ± 1.43*
Colonic MPO activity (mU/mg protein)	0.40 ± 0.13	1.80 ± 0.26*	1.12 ± 0.25*†
Flux of rolling leukocytes (cells/min)	10.00 ± 2.58	57.40 ± 8.09*	15.88 ± 4.53*†
Number of rolling leukocytes (cells/100 μm)	0.46 ± 0.12	3.12 ± 0.44*	0.25 ± 0.09*†
Firm adherent leukocytes (cells/100 μm)	0.13 ± 0.13	1.67 ± 0.31*	0.61 ± 0.24*†

*, $P < 0.05$ versus control animals; †, $P < 0.05$ versus DSS-vehicle-treated animals.

an indication that we are affecting a key step of the intestinal inflammatory response, common to the pathophysiology of different types of inflammation, and therefore more likely to be also effective in intestinal inflammation affecting other spices. According to these results, SOD might be therapeutically effective in human IBD both for the induction of remission and for maintenance of remission, if a suitable pharmacologic preparation of the drug is made available for chronic treatment.

REFERENCES

- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346:425-434.
- Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol*. 1997;158:1825-1832.
- Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*. 1998;114:1066-1090.
- Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, et al. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *J Immunol*. 1997;158:2099-2106.
- Soriano A, Salas A, Salas A, et al. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest*. 2000;80:1541-1551.
- Feagan B, Greenberg G, Wild G, et al. A randomized controlled trial of a humanized alpha4beta7 antibody in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:S248-S249.
- Gordon FH, Hamilton MI, Donoghue S, et al. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:699-705.
- Feagan B, Greenberg G, Wild G, et al. Efficacy and safety of humanized alpha4beta7 antibody in active Chron's disease. *Gastroenterology*. 2003;124:A25-A26.
- Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:24-32.
- Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, et al. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem*. 1992;267:16323-16329.
- Neish AS, Khachigian LM, Park A, et al. Sp1 is a component of the cytokine-inducible enhancer in the promoter of vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem*. 1995;270:28903-28909.
- Sasaki M, Jordan P, Joh T, et al. Melatonin reduces TNF- α induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF- κ B. *BMC Gastroenterol*. 2002;2:9.
- Sasaki M, Ostanin D, Elrod JW, et al. TNF- α -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase dependent. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284:C422-C428.
- Segui J, Gironella M, Sans M, et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol*. 2004;76:537-544.
- Grisham MB, Volkmer C, Tso P, et al. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 1991;101:540-547.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263-274.
- Keelan E, Haskard DO. CAMs and anti-CAMs. The clinical potential of cell adhesion molecules. *J R Coll Physicians Lond*. 1992;26:17-24.
- Panés J, Perry MA, Anderson DC, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol*. 1995;269:H1955-H1964.
- Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, et al. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res*. 1996;79:560-569.
- Langley RR, Russell J, Eppihimer MJ, et al. Quantification of murine endothelial cell adhesion molecules in solid tumors. *Am J Physiol*. 1999;277:H1156-H1166.
- Closa D, Bulbena O, Rosello-Catafau J, et al. Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation*. 1993;17:563-571.
- Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*. 1996;98:945-953.
- Murthy SN, Cooper HS, Shim H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci*. 1993;38:1722-1734.
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993;69:238-249.
- Mihaljevic B, Katusin-Razem B, Razem D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med*. 1996;21:53-63.
- Granell S, Gironella M, Bulbena O, et al. Heparin mobilizes xanthine oxidase and induces lung inflammation in acute pancreatitis. *Crit Care Med*. 2003;31:525-530.
- Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramine. *Biochem Biophys Res*. 1978;80:849-856.

28. Panés J, Perry MA, Anderson DC, et al. Portal hypertension enhances endotoxin-induced intercellular adhesion molecule 1 up-regulation in the rat. *Gastroenterology*. 1996;110:866–874.
29. Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, et al. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol*. 1999;65:349–355.
30. Sans M, Panes J, Ardite E, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. 1999;116:874–883.
31. Davis MJ. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc Res*. 1987;34:223–230.
32. Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res*. 1978;43:738–749.
33. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, et al. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut*. 1990;31:786–790.
34. Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, et al. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology*. 1992;103:177–185.
35. Oshitani N, Kitano A, Okabe H, et al. Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy. *Gut*. 1993;34:936–938.
36. Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TRJ, et al. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1992;103:186–196.
37. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C719–C741.
38. Epperly MW, Sikora CA, DeFilippi SJ, et al. Pulmonary irradiation-induced expression of VCAM-I and ICAM-I is decreased by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8:175–187.
39. Li L, Crockett E, Wang DH, et al. Gene transfer of endothelial NO synthase and manganese superoxide dismutase on arterial vascular cell adhesion molecule-1 expression and superoxide production in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:249–255.
40. Kawachi S, Jennings S, Panés J, et al. Cytokine and endothelial cell adhesion molecule expression in interleukin-10-deficient mice. *Am J Physiol*. 2000;278:G734–G743.
41. Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, et al. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int*. 2002;52:367–374.
42. Burns RC, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, et al. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology*. 2001;121:1428–1436.
43. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*. 2000;164:6550–6559.
44. Tudor KS, Hess KL, Cook-Mills JM. Cytokines modulate endothelial cell intracellular signal transduction required for VCAM-1-dependent lymphocyte transendothelial migration. *Cytokine*. 2001;15:196–211.
45. Deem TL, Cook-Mills JM. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood*. 2004;104:2385–2393.
46. Singh UP, Singh S, Taub DD, et al. Inhibition of IFN-gamma-inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10^{-/-} mice. *J Immunol*. 2003;171:1401–1406.
47. Chambers RE, Stross P, Barry RE, et al. Serum amyloid A protein compared with C-reactive protein, alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-acid glycoprotein as a monitor of inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest*. 1987;17:460–467.
48. Olsson N, Siegbahn A, Nilsson G. Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254:143–146.
49. Badolato R, Johnston JA, Wang JM, et al. Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway. *J Immunol*. 1995;155:4004–4010.
50. Xu L, Badolato R, Murphy WJ, et al. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J Immunol*. 1995;155:1184–1190.
51. Jijon HB, Madsen KL, Walker JW, et al. Serum amyloid A activates NF-kappaB and proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:718–726.
52. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M, et al. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab Invest*. 1998;78:535–539.
53. Ndengele MM, Muscoli C, Wang ZQ, et al. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock*. 2005;23:186–193.
54. Zhai Q, Ji H, Zheng Z, et al. Copper induces apoptosis in BA/F3beta cells: Bax, reactive oxygen species, and NFkappaB are involved. *J Cell Physiol*. 2000;184:161–170.
55. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, et al. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 1996;98:136–141.
56. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, et al. Endotoxin-induced mesenteric microvascular changes involve iNOS-derived nitric oxide: results from a study using iNOS knock out mice. *Shock*. 2000;13:397–403.
57. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989;320:365–376.
58. Salas A, Gironella M, Salas A, et al. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest*. 2002;82:597–607.

8.- DISCUSIO

En els estudis que conformen la present Tesi Doctoral hem demostrat que la modulació de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració exògena de SOD causa una marcada atenuació, de manera dosi dependent, en la concentració de LPO en la colitis experimental, que s'associa a la disminució en l'expressió de CAMs en diferents òrgans del tracte digestiu, l'atenuació del reclutament leucocitari en les vècules de l'intestí inflammat i la millora de la gravetat de la inflamació intestinal establerta en el model de colitis induït per l'administració de TNBS i en la colitis en ratolins IL-10^{-/-}, i que, a més, també és efectiu en el tractament preventiu del desenvolupament de la colitis induïda per l'administració de DSS. Per tant, els resultats obtinguts en els estudis que conformen la present Tesi Doctoral, juntament amb evidències prèvies que avaluen l'efecte de l'administració exògena o la sobreexpressió de SOD en diferents models inflamatoris^{92;224;225;234;251;252}, demostren que l'administració de suplementos de SOD és una estratègia terapèutica efectiva per atenuar l'estrès oxidatiu i la gravetat de les lesions associades a la inflamació del còlon en la colitis experimental.

L'estrès oxidatiu s'ha implicat en la patogènesi de la MII, nombrosos estudis han demostrat la presència de concentracions marcadament elevades de MRO en el còlon crònicament inflammat tant en la malaltia en humans com en diferents models experimentals^{23;103-107}. La mesura dels nivells de LPO al teixit colònic confirma que el desenvolupament de la colitis està associat a un marcat increment de l'estrès oxidatiu al còlon en els estudis que conformen la present Tesi Doctoral. En concret, els nivells de LPO al còlon van ser 20 vegades superiors als presentats pel grup control en la colitis experimental induïda per TNBS i 27 vegades superiors als presentats pels ratolins de la soca salvatge en ratolins IL-10^{-/-}. El tractament amb SOD va atenuar significativament els nivells de LPO en el teixit intestinal de manera dosi dependent en ambdós models experimentals de colitis. En el primer estudi, l'administració de 4 mg/kg/dia i 13 mg/kg/dia de SOD va reduir significativament els nivells de LPO al còlon, en un 70%, respecte al grup colític tractat amb vehicle. En el segon estudi, el tractament amb 13 mg/kg/dia de SOD durant 7 i 14 dies va originar una marcada atenuació en els nivells de LPO al teixit colònic, en un 50%, respecte al valor presentat pel grup colític tractat amb vehicle.

L'aparent discrepància entre la millora dels nivells de LPO al teixit colònic en resposta al tractament amb 4 mg/kg/dia de SOD en el primer estudi i l'administració de 13 mg/kg/dia durant 7 dies en el segon estudi i el seu efecte lleu sobre altres paràmetres de gravetat de la colitis pot ser degut a que l'increment en els nivells de LPO al còlon és només un dels efectes dels MRO i que la dosi de SOD que afecta aquest procés pot ser menor, o pot precedir en el temps, els efectes sobre altres factors que són menys sensibles a l'estrès oxidatiu com el reclutament leucocitari i l'expressió de CAMs en la superfície de l'endoteli vascular.

En el primer estudi vam demostrar que l'administració de 4 mg/kg/dia de SOD va causar una marcada atenuació en el nombre de leucòcits en rodament en les vènules colòniques, mentre que l'adhesió leucocitària ferma es va reduir en un 30%, però no va assolir la significació estadística. En aquest estudi, a més, l'administració de 4 mg/kg/dia de SOD va atenuar significativament els nivells plasmàtics de IL-6 i l'activitat MPO al còlon, que es correlaciona amb la infiltració de neutròfils al teixit²⁵³, respecte al grup colíctic tractat amb vehicle. En el segon estudi, l'administració de 13 mg/kg/dia de SOD durant 7 dies va reduir significativament el nombre de leucòcits en rodament però no va afectar l'adhesió leucocitària ferma en les vènules colòniques. Aquest tractament, a més, va atenuar l'activitat MPO al còlon en un 30%, aquest darrer paràmetre, però, no va assolir la significació estadística. Aquestes dades suggereixen que el rodament leucocitari és un paràmetre particularment sensible al tractament amb antioxidants en ambdós models experimentals de colitis i que l'estrès oxidatiu pot jugar un paper determinant en el procés de reclutament de neutròfils al còlon en el model experimental colitis induït per l'administració de TNBS. L'estrès oxidatiu, a més, pot ser un factor determinant en la modulació de l'expressió dels nivells plasmàtics de citocines, com IL-6, en la colitis experimental per TNBS. L'administració de 13 mg/kg/dia de SOD en el model experimental de colitis per TNBS i el tractament amb aquesta dosi de SOD durant 14 dies en el model experimental de ratolins IL-10^{-/-} va originar una atenuació significativa en el rodament i l'adhesió leucocitària en les vènules colòniques que es va associar a una marcada disminució en l'expressió de CAMs i una millora significativa de tots els paràmetres clínics i histològics de gravetat de la colitis.

Dels resultats obtinguts en el primer estudi es desprèn que el tractament amb SOD millora la colitis establerta induïda per l'administració de TNBS d'una manera dosi dependent. Un estudi previ en aquest model experimental de colitis va demostrar que el tractament amb SOD redueix significativament les lesions macroscòpiques i la gravetat del dany histològic en el còlon ²⁵⁴. Tanmateix, aquest estudi va descriure que la millora de la gravetat de la colitis es produeix en la fase inicial del tractament, en concret, 24 hores després de començar el tractament. Aquest fet pot ser degut a que l'inici de l'administració de SOD va ser previ a la inducció de la colitis. En el nostre estudi, en canvi, vam escollir començar l'administració de SOD en la colitis establerta per dues raons: una és la major rellevància clínica d'aquesta estratègia degut a que el tractament de pacients és en la fase de malaltia activa i que una proporció important de tractaments útils en profilaxi de la colitis són ineficaços quan s'administren en la malaltia establerta. La segona raó és que el tractament amb un antioxidant abans de l'administració del TNBS podria interferir en els mecanismes d'acció de la inducció de colitis per part d'aquest agent. Un estudi previ va demostrar que la inflamació produïda per l'administració intracolònica de TNBS està mitjançada per un marcat increment en la concentració de MRO produït pel metabolisme de les cèl.lules de la mucosa intestinal ¹⁸⁸. En un estudi posterior en el nostre grup de treball vam caracteritzar els efectes de l'increment de la concentració d'aquestes espècies en funció del temps en el model experimental de colitis per TNBS i vam determinar que la major part dels efectes tòxics del TNBS s'originen entre els 30 minuts i les 4 hores posteriors a la seva administració i que no hi ha deplecció dels sistemes defensius enzimàtics antioxidants al còlon 4 hores després de l'administració de TNBS ²³⁵. Tenint en compte aquestes dades, per evitar la interferència de l'acció de la SOD en el desenvolupament de la colitis en el nostre estudi, el tractament va començar 4 hores després de l'administració de TNBS. Tot i això, per descartar que l'administració d'aquest fàrmac pugui interferir en la inducció de colitis vam estudiar els efectes del tractament amb SOD 24 hores després de l'administració de TNBS i vam determinar que el grup d'animals colítics tractats amb SOD va presentar el mateix grau de gravetat de les lesions inflamatores al còlon que el grup colíctic tractat amb vehicle.

Els resultats del segon estudi van confirmar que la reducció de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració de SOD és una estratègia efectiva en el tractament de la colitis establerta en el model experimental de ratolins IL-10^{-/-}. Tot i que en el primer estudi vam determinar l'impacte de la reducció de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració de SOD en la colitis experimental establerta, l'avaluació d'aquesta estratègia terapèutica en un model experimental immune de colitis establerta sembla convenient. Donat que cap model experimental de MII reproduceix completament les alteracions de la malaltia en humans, l'obtenció de resultats consistents en diferents models experimentals en resposta a una determinada estratègia terapèutica incrementa la probabilitat que aquesta estratègia sigui efectiva en la teràpia en humans.

Diferents treballs de caracterització del desenvolupament de la inflamació del còlon en funció del temps en el model experimental de ratolins IL-10^{-/-} en condicions d'establiment convencionals van determinar que aquests ratolins presenten una inflamació crònica establerta al còlon a les 16 setmanes de vida amb característiques semblants a la MC en humans^{204;205}. Per tant, en el segon estudi que forma part de la present Tesi Doctoral, el tractament amb SOD es va iniciar en la colitis establerta i no va interferir en el desenvolupament del procés inflamatori. En aquest treball, a més, vam aprofundir en l'estudi mecanístic de la teràpia antioxidant en el tractament de la colitis establerta, en concret, l'expressió de CAMs i el reclutament leucocitari, i vam determinar que l'atenuació de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració de SOD és una estratègia efectiva en el tractament preventiu de la colitis induïda per DSS.

El reclutament leucocitari des del torrent circulatori a l'espai extravascular és un event essencial en la fisiopatogènia del procés inflamatori. Hi ha dos factors clau implicats en la regulació d'aquest procés: l'estrès oxidatiu i l'expressió de CAMs. En l'actualitat, el mecanisme mitjançant el qual els MRO modulen el reclutament leucocitari no es coneix en profunditat. La hipòtesi més àmpliament acceptada és que els MRO actuen com a missatgers intracel·lulars en les cascades de transducció de senyal que modulen l'activitat dels factors de transcripció nuclears i promouen l'expressió de les CAMs. L'observació que els MRO poden activar diferents cascades de transducció de senyal, com la del Ca²⁺²⁵⁵, les proteïnquinases²⁵⁶, la de

les proteïnosfosfatases ²⁵⁷, i diferents factors de transcripció nuclear, com NF- κ B i AP-1 ⁹¹⁻⁹⁵, que estan implicats en l'activació de l'expressió de diferents gens que modulen la resposta immune i inflamatòria com citocines, proteases i CAMs, són concordants amb aquesta hipòtesi. En els estudis que formen part d'aquesta Tesi Doctoral no vam avaluar l'efecte de l'administració de SOD sobre l'activació de les cascades de transducció de senyal i l'activació de factors de transcripció nuclear. Tanmateix, vam demostrar que la disminució de la concentració de MRO en resposta a l'administració exògena de SOD atenua marcadament l'expressió endotelial de les CAMs al còlon i disminueix significativament l'adhesió leucocitària en el teixit inflammat. Els resultats dels nostres estudis suggereixen, per tant, que els MRO poden actuar com a mediadors en l'activació de les diferents cascades de transducció de senyal i en l'activació dels factors de transcripció nuclear que originen l'increment de l'expressió de les CAMs en la colitis experimental. La inhibició d'aquestes vies en resposta al tractament amb SOD, a més, podria ser el mecanisme que modula l'atenuació de diferents factors implicats en la resposta immune i inflamatòria, com els nivells plasmàtics IL-6 i SAA, en els estudis que formen part d'aquesta Tesi Doctoral.

Les interaccions de rodament leucocitari estan mitjançades per les selectines i els seus contrareceptors corresponents, les mucines, mentre que l'adhesió ferma dels leucòcits en la superfície de l'endoteli vascular està mitjançada per l'expressió de diferents molècules de la família de les immunoglobulines en la superfície endotelial i la interacció d'aquestes molècules amb les integrines, que són els contrareceptors leucocitaris corresponents. En un estudi previ en el nostre grup de treball vam avaluar l'immunobloqueig de les selectines en el tractament de la colitis experimental i vam demostrar que aquesta estratègia terapèutica origina una marcada disminució en el rodament leucocitari sense afectar el curs de la colitis ¹⁶⁴. De manera similar, els resultats obtinguts en els estudis clínics de bloqueig de l'activitat de les selectines com a estratègia terapèutica en el tractament de diferents patologies inflamatòries en humans són concordants amb els nostres resultats. Per exemple, un estudi clínic de tractament amb un agonista de les selectines, que va mostrar resultats positius en un model experimental de isquèmia i reperfussió, no va originar benefici clínic en la teràpia en humans ²⁵⁸. Per tant, l'estudi mecanístic de la millora dels paràmetres de severitat de la inflamació intestinal en resposta al tractament amb SOD la vam

enfocar en la modulació de l'expressió de les molècules que intervenen en l'adhesió leucocitària.

VCAM-1 i MAdCAM són CAMs de la família de les immunoglobulines amb un paper essencial en la mediació de l'adhesió leucocitària ferma a l'endoteli vascular en multitud de malalties inflamatòries agudes i cròniques²⁵⁹⁻²⁶¹. S'ha demostrat que ambdues CAMs es sobreexpressen tant en la colitis experimental^{143;169} com en la MII humana^{149;155;239;262}. La rellevància funcional de l'increment de l'expressió d'aquestes CAMs s'ha determinat mitjançant estudis d'immunobloqueig^{143;169}. Un estudi en el nostre grup de treball va demostrar que l'immunobloqueig de VCAM-1 té un important efecte beneficiós en la reducció del reclutament leucocitari en el model experimental de colitis induït per TNBS¹⁶⁹ i que l'efecte beneficiós d'aquesta estratègia és superior a l'immunobloqueig de ICAM-1. A més, en un estudi comparatiu d'immunobloqueig de les diferents CAMs vam demostrar que el bloqueig de VCAM-1 té un efecte més potent que el de ICAM-1 i MAdCAM-1 en la reducció de les lesions inflamatòries en la colitis experimental¹⁴³. Tot i que l'efectivitat d'aquesta estratègia terapèutica no ha estat avaluada directament en la MII humana, s'ha demostrat que l'immunobloqueig del contrarreceptor de VCAM-1 i MAdCAM-1, les integrines que contenen la subunitat α_4 , és una estratègia altament efectiva en el tractament de la MC i la CU^{160;179;228;231}.

L'anàlisi funcional del promotor humà de VCAM-1 va demostrar que diferents factors de transcripció sensibles a estrès oxidatiu estan relacionats amb l'activació de l'expressió del gen VCAM-1 en resposta a IL-1 β i TNF- α ⁷³⁻⁷⁵. Estudis *in vitro* van demostrar que l'expressió de SOD, però no de catalasa, per adenovirus disminueix l'acúmul d'ARNm de VCAM-1 induït per TNF- α ⁷³. La regulació de l'expressió de MAdCAM-1 *in vivo* no es coneix en profunditat. Tanmateix, diferents estudis *in vitro* van demostrar que MAdCAM-1 es sobreexpressa en resposta a l'estimulació amb TNF- α , i que la modulació d'aquest mediador és dependent dels MRO ja que el tractament amb antioxidants prevé la sobreexpressió de MAdCAM-1 induïda per TNF- α ^{70;76}.

En el primer estudi que forma part de la present Tesi Doctoral vam avaluar l'impacte de l'atenuació de l'estrès oxidatiu en resposta a l'administració de SOD sobre l'expressió de VCAM-1 al cec i al còlon en el model experimental de colitis per TNBS. L'expressió d'aquesta CAM en el grup colíctic tractat amb vehicle va ser 4 vegades superior respecte al grup control. Aquestes dades estan d'acord amb evidències prèvies del nostre grup de treball en aquest model experimental de colitis ¹⁶⁹. El tractament amb 13 mg/kg/dia de SOD es va associar a una marcada atenuació en l'expressió de VCAM-1 en el còlon en aquest model experimental de colitis. La disminució de l'expressió de VCAM-1 en resposta al tractament amb 13 mg/kg/dia de SOD es va correlacionar amb una marcada reducció en les lesions inflamatòries i una atenuació significativa en el rodament i l'adhesió leucocitària ferma en les vènules colòniques. Un estudi previ va demostrar que l'expressió de ICAM-1 i P-selectina al còlon estan significativament atenuades en resposta al tractament amb M40403, un mimètic de SOD, en el model experimental de colitis per TNBS ²²⁵. L'observació en el nostre treball que el tractament amb SOD va generar una marcada atenuació en el rodament leucocitari és concordant amb la possible reducció de l'expressió de P-selectina en resposta al tractament amb SOD en el nostre estudi. Tanmateix, la reducció de les interaccions de rodament leucocitari, probablement, no és el mecanisme responsable de l'efecte beneficiós del tractament amb SOD sobre la gravetat de la colitis ja que l'immobilització de les selectines, i consegüentment de les interaccions de rodament, no proporciona efecte beneficiós en la millora de les lesions inflamatòries en la colitis experimental induïda per TNBS ¹⁶⁴. El possible efecte beneficiós del tractament amb SOD sobre la disminució en l'expressió de ICAM-1 pot contribuir, en menor mesura que VCAM-1, a la reducció en l'adhesió leucocitària al còlon en el nostre estudi ja que l'atenuació de l'adhesió leucocitària ferma en resposta al immunobloqueig de VCAM-1 és molt superior a la reducció observada en resposta a l'administració d'un anticòs anti-ICAM-1 en la colitis experimental ²²⁵.

Diferents estudis *in vivo* amb antioxidants van demostrar que els MRO són mediadors necessaris en la inducció de l'expressió de les CAMs i que aquests tractaments bloquegen també la infiltració dels leucòcits en els teixits ^{69;70}. Dos estudis recents *in vivo* que utilitzen transferència de gen SOD van demostrar que la sobreexpressió de SOD causa una reducció en l'expressió de VCAM-1 mitjançada

per l'atenuació de l'estrès oxidatiu en dos models inflamatoris induïts per hipertensió i radiació ^{263;264}. De manera similar, en el nostre estudi vam demostrar que l'administració de suplementos de SOD va atenuar la sobreexpressió de VCAM-1 al còlon i es va associar a una marcada disminució del reclutament leucocitari en el model experimental de colitis per TNBS. En conjunt, aquestes observacions indiquen que la modulació de l'expressió de les CAMs de la família de les immunoglobulines en resposta al tractament amb antioxidants, com la SOD, és una estratègia efectiva en la regulació del procés inflamatori.

L'immunobloqueig de les CAMs que modulen l'adhesió ferma dels leucòcits a l'endoteli vascular sembla ser una estratègia efectiva en el tractament de malalties inflamatòries en humans. Tanmateix, els resultats obtinguts en els estudis clínics han demostrat que l'immunobloqueig de les selectines i les integrines leucocitàries que contenen la subunitat β_2 , que media la interacció dels leucòcits a ICAM-1, han tingut un efecte limitat en el tractament de diferents patologies inflamatòries ^{183;265}. Tenint en compte les funcions solapades de les CAMs que estan implicades en l'extravassació leucocitària poden haver rutes alternatives que modulen l'adhesió leucocitària i la migració a l'interior del teixit ²⁶⁶. Per tant, la inhibició selectiva d'una CAM pot no ser suficient en la prevenció del reclutament leucocitari, mentre que l'immunobloqueig combinat de més d'una CAM pot constituir una estratègia efectiva en el tractament de la MII. Diferents estudis *in vivo* corroboren aquesta hipòtesi. Per exemple, s'ha demostrat que el bloqueig selectiu de VCAM-1, ICAM-1 o la integrina α_4 no té un efecte beneficiós en un model experimental de la MC. En canvi, el tractament de bloqueig combinat de ICAM-1 i la integrina α_4 , o ICAM-1 i VCAM-1, origina un efecte beneficiós ²⁶⁷. Diferents estudis han demostrat que l'immunobloqueig de la integrina amb subunitat α_4 , que media la interacció dels leucòcits a VCAM-1 i MAdCAM-1, és una estratègia efectiva en el tractament de la MII ^{160;179;228;231}. A partir d'aquestes dades ens vam proposar aprofundir en l'estudi de l'efecte combinat del tractament amb SOD sobre la modulació de l'expressió les CAMs en l'intestí inflamat. Aquesta estratègia pot ser particularment rellevant pel seu potencial efecte terapèutic.

En el segon estudi que forma part de la present Tesi Doctoral vam avaluar els possibles efectes de la modulació de l'estrès oxidatiu sobre la disminució de l'expressió de VCAM-1 i una altra CAM de la família de les immunoglobulines, MAdCAM-1, que s'ha suggerit que pot desenvolupar un paper important en el reclutament leucocitari a l'intestí. MAdCAM-1 es sobreexpresa tant en la MII humana²⁶² com en el model experimental de colitis IL-10^{-/-}¹⁶⁵. A més, la immunoneutralització de MAdCAM-1 o el seu contrarreceptor leucocitari, la integrina $\alpha_4\beta_7$, proporciona una millora significativa clínica tan en colitis experimental com en la MII humana^{160;179;228;231}. En aquest estudi vam demostrar que MAdCAM-1 es sobreexpresa en tot el tracte digestiu en ratolins IL-10^{-/-} i que el tractament amb SOD redueix marcadament l'expressió d'aquesta CAM en tots els seus segments. En alguns casos, l'administració de SOD va reduir l'expressió endotelial de MAdCAM-1 a nivells significativament més baixos que els observats en ratolins no colítics de la soca salvatge en alguns segments del tracte digestiu. En particular al fetge on SOD inhibeix completament l'expressió basal de MAdCAM-1. Aquesta dada suggereix que l'estrès oxidatiu està implicat en la regulació de l'expressió de MAdCAM-1 en condicions basals. En aquest treball, a més, vam confirmar que l'expressió de VCAM-1 està incrementada en el tracte digestiu de ratolins IL-10^{-/-} i que el tractament amb SOD atenua significativament l'expressió de VCAM-1 en el còlon en el model experimental de colitis IL-10^{-/-}.

La sobreexpressió de VCAM-1 i MAdCAM-1 pot estar implicada tant en les interaccions de rodament com en l'adhesió ferma dels leucòcits a l'endoteli vascular que posteriorment migren a l'interstici del teixit inflammat. L'atenuació significativa de l'expressió endotelial d'ambdues CAMs en resposta al tractament amb SOD va coincidir amb una marcada reducció del rodament i l'adhesió ferma dels leucòcits a l'entoteli de les vènules del còlon de ratolins IL-10^{-/-}. Tanmateix, la reducció de l'adhesió leucocitària en resposta al tractament amb SOD en aquest model experimental va ser de menor magnitud que l'obtinguda en estudis previs d'immunobloqueig de VCAM-1^{143;169} i MAdCAM-1¹⁴³ en la colitis experimental, que va originar una reducció en l'adhesió leucocitària ferma en les vènules colòniques a nivells similars als valors que presenten els ratolins control. En canvi, l'atenuació

l'adhesió leucocitària ferma en resposta al tractament amb SOD és significativament superior a la presentada per animals no colítics de la soca salvatge.

La disminució de l'expressió de VCAM-1 en resposta al tractament amb SOD en ambdós estudis pot afectar el procés final d'extravasació leucocitària. Un estudi previ va demostrar que l'acoblament de la integrina leucocitària α_4 a VCAM-1 activa senyals per a l'estimulació de NADPHox de les cèl.lules endotelials⁸⁴ que lliuren MRO al medi extracel.lular⁸⁵, que actuen com a espècies activadores de les metaloproteases de la matriu local⁸⁶ que degraden la matriu extracel.lular i obren "portes" intercel.lulars que possibiliten la migració leucocitària entre les cèl.lules endotelials.

En la present Tesi Doctoral ens hem centrat en l'avaluació de l'impacte de l'atenuació de l'estrès oxidatiu sobre l'expressió de CAMs i el reclutament leucocitari. Tanmateix, hi ha altres mecanismes mitjançant els quals els MRO poden influenciar l'adhesió leucocitària ferma a través de mecanismes que no alteren l'expressió de CAMs en la superfície endotelial. Per exemple, hi ha evidències que suggereixen que els MRO promouen l'adhesió leucocitària mitjançant la inducció de canvis estructurals en les cèl.lules endotelials i la redistribució de les CAMs en la superfície endotelial. S'ha demostrat que l'exposició de cèl.lules endotelials a concentracions elevades de MRO i condicions oxidants, com TNF- α , origina la formació de microfilaments d'actina denominats "fibres d'estrès"^{268;269} i la redistribució de les CAMs en les unions intracel.lulars en la superfície endotelial²⁷⁰. L'adhesió leucocitària es produeix preferentment en la superfície de la membrana cel.lular on es localitzen les terminacions de les fibres d'estrès i on les CAMs es troben agrupades²⁷¹ suggerint la importància d'aquest fenomen en resposta a l'estrès oxidatiu.

Un factor addicional que pot contribuir als efectes beneficiosos de l'administració de SOD sobre el reclutament leucocitari en la inflamació intestinal sense alterar la producció de CAMs pot estar relacionat amb la disminució de la concentració de ONOO⁻ a l'espai extracel.lular que es produeix en resposta a l'administració d'un mimètic de SOD²⁷². ONOO⁻ es genera en condicions de inflamació com a resultat de

la reacció entre O_2^- i NO ^{17;273}. S'ha demostrat que la biodisponibilitat de NO és prolonga en resposta l'administració exògena de SOD, però no de catalasa ^{15;16}. NO promou la vasodilatació ¹² i s'ha suggerit que atenua el reclutament leucocitari a través de mecanismes que no alteren l'expressió de CAMs ²⁷⁴. Per exemple, s'ha demostrat que la inhibició de la síntesi de NO per L-NAME incrementa l'expressió de les integrines leucocitàries β_2 , i que l'immunobloqueig d'aquesta integrina inhibeix el reclutament leucocitari induït per L-NAME ^{275;276}. De manera similar, els ratolins deficients en iNOS presenten un increment en les interaccions leucòcit-endoteli en resposta a endotoxèmia sense alterar l'expressió de les CAMs ^{275;276}. Per altra banda, s'ha demostrat que $ONOO^-$ actua com a precursor de la espècie radicalària OH^- ²¹ i que l'administració de *scavengers* de OH^- origina un efecte beneficiós en l'atenuació del reclutament de neutròfils induïda per estímuls oxidatius en les cèl.lules endotelials de la vena umbilical humana ²⁷⁷.

En conjunt, la possible atenuació de l'adhesió leucocitària ferma a través de mecanismes que no alteren l'expressió de CAMs, com la inducció de canvis estructurals en les cèl.lules endotelials i la redistribució de les CAMs en la superfície de les cèl.lules endotelials en resposta l'increment de l'estrès oxidatiu, i l'efecte beneficiós de l'atenuació dels nivells de $ONOO^-$ i OH^- sobre el reclutament leucocitari en resposta a l'atenuació de l'estrès oxidatiu poden constituir un efecte additiu en la reducció de les interaccions leucòcit-endoteli en la colitis experimental en resposta a l'administració de SOD en els estudis que conformen la present Tesi Doctoral.

Una observació interessant dels resultats del segon estudi que forma part de la present Tesi Doctoral és l'efecte del tractament amb SOD sobre l'atenuació dels nivells plasmàtics de SAA. La concentració plasmàtica d'aquesta proteïna sèrica es correlaciona amb l'activitat de la malaltia tant en la colitis experimental com en la malaltia humana ^{165;248}, i s'ha utilitzat com a biomarcador de l'activitat de la malaltia. Tanmateix, s'ha demostrat que SAA pot tenir un efecte modulador de la resposta immune i inflamatòria. En concret, s'ha suggerit que SAA indueix la quimiotaxi leucocitària i l'adhesió leucocitària ²⁷⁸⁻²⁸³, activa el factor de transcripció NF- κ B i l'expressió de gens proinflamatoris en cèl.lules epitelials intestinals en humans i en ratolí ²⁸⁴, i incrementa la secreció de metaloproteases per part de diferents tipus

cel.lulars^{284;285}. Per tant, la disminució significativa dels nivells d'aquesta proteïna sèrica en resposta al tractament amb SOD pot tenir un efecte additiu en la modulació de la resposta immune i pot contribuir a la reducció del reclutament leucocitari i l'atenuació de l'expressió endotelial de MAdCAM-1 i VCAM-1 en l'intestí inflammat.

A més dels efectes del tractament amb antioxidants sobre la modulació de l'expressió de CAMs i el reclutament leucocitari, aquesta estratègia terapèutica també pot afectar altres components de la resposta inflamatoria i immune com la producció de citocines proinflamatòries⁹¹, la vasodilatació²⁸⁶, l'equilibri de la relació proteasa/antiproteasa present a l'intestí de la mucosa intestinal en condicions fisiològiques³⁴, l'apoptosi⁸⁸ i la necrosi cel.lular⁸⁷, entre altres. La inhibició de la resposta immune i inflamatòria en resposta a l'administració de SOD pot contribuir a l'atenuació de la severitat del dany inflamatori en la colitis experimental.

En conjunt, en els estudis que conformen la present Tesi Doctoral vam determinar els efectes beneficiosos del tractament amb SOD en el curs clínic de la colitis experimental. L'administració de SOD va causar una millora significativa dels paràmetres macroscòpics al còlon, de marcadors bioquímics de infiltració de neutròfils al còlon inflammat mesurats per l'activitat MPO al teixit, de biomarcadors plasmàtics d'activitat de la malaltia, com els nivells sèrics de SAA i IL-6, i de la valoració de la gravetat del dany histològic al teixit en resposta al tractament amb SOD. Tanmateix, els canvis observats en la gravetat del dany histològic en resposta a l'administració de SOD en el model experimental de colitis IL-10^{-/-}, tot i ser significatius, van ser modestos en magnitud i absents en el model de inducció de colitis per DSS. La millora de la gravetat del dany histològic en la colitis és, probablement, el paràmetre més exigent d'efectivitat de tractament. Diferents estudis experimentals i en humans han descrit una millora en paràmetres clínics i de vegades endoscòpics en resposta al tractament sense afectar o afectant mínimament la valoració de la severitat histològica^{143;287}. Tanmateix, aquest estudi té una limitació per la valoració de l'impacte real de l'administració de suplementes de SOD en la curació del dany histològic, que és la duració limitada del període de tractament. És esperable que la resposta al manteniment del tractament amb SOD durant períodes de temps superiors a 14 dies produeixi una millora més marcada en

la valoració de la gravetat del dany histològic, paràmetre que serà convenientment estudiat en futurs tractaments crònics de la malaltia.

La coincidència en la millora dels paràmetres de severitat de la colitis mesurats en resposta al tractament amb SOD en dos models experimentals de colitis establerta i en el tractament preventiu del desenvolupament de la colitis en un tercer model experimental de la malaltia, constitueix una base sòlida per al desenvolupament clínic d'aquesta aproximació terapèutica en la MII humana. En la nostra opinió, la replicació de les observacions terapèutiques de l'administració de SOD en diferents models experimentals de colitis és un indicador de que afectem un procés clau en la resposta inflamatòria intestinal que és comú en la fisiopatologia dels diferents models inflamatoris i, per tant, és probable que també sigui efectiu en el tractament de la inflamació intestinal en altres espècies. Segons aquests resultats, l'administració de SOD pot ser una estratègia terapèuticament efectiva en el tractament de la MII humana tant en la inducció com en el manteniment de la remissió si es desenvolupa una nova preparació farmacèutica adequada per al tractament crònic.

En resum, l'efecte protector de SOD demostrat en aquests estudis aporten noves evidències per al coneixement del paper que desenvolupa l'estrès oxidatiu, l'expressió de CAMs i el reclutament leucocitari en la patogènia de la inflamació intestinal. Les nostres dades suggereixen que el tractament amb SOD redueix la generació de MRO i l'estrès oxidatiu i, per tant, inhibeix l'activació endotelial i demostra que la modulació de factors que intervenen en la sobreexpressió de CAMs i el reclutament leucocitari, com els antioxidants, poden constituir noves estratègies per al tractament de la MII en humans.

9.- CONCLUSIONS

1. El tractament amb SOD és eficaç en el tractament de la inflamació intestinal en models experimentals de colitis establerta.
2. L'efecte beneficiós de la SOD en el tractament de la colitis experimental és dosi-depenent
3. L'administració de SOD indueix una significativa disminució de l'estrés oxidatiu associat a la presència d'inflamació intestinal, mesurat com a peroxidació lipídica.
4. El tractament amb SOD disminueix l'expressió de molècules d'adhesió implicades en el reclutament de leucòcits cap a l'intestí inflammat, incloent VCAM-1 i MAdCAM-1
5. La disminució de l'estrés oxidatiu i de l'expressió de molècules d'adhesió resulta en una marcada disminució de les interaccions leucòcit endoteli, tant de rodament com d'adhesió.
6. La disminució de la infiltració de l'intestí per cèl·lules inflamatòries resulta en una significativa milloria de la colitis en quant a símptomes, biomarcadors d'activitat inflamatòria, lesions macroscòpiques i lesions histològiques.
7. El tractament amb SOD administrat de manera profilàctica és també eficaç per prevenir el desenvolupament de lesions inflamatories en un model experimental de colitis.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Brullet E, Bonfill X, Urrutia G et al. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease. *Med Clin* 1998;110:651-56.
2. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986;137:3295-98.
3. Lum H, Barr DA, Shaffer JR et al. Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant-dependent mechanisms. *Circ Res* 1992;70:991-98.
4. Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4046-50.
5. Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA et al. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1990;143:21-25.
6. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
7. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276-87.

8. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
9. Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 1993;268:22369-76.
10. Muzykantov VR. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release* 2001;71:1-21.
11. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-26.
12. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:1494-98.
13. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 1989;257:H33-H37.
14. Katusic ZS, Schugel J, Cosentino F et al. Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am-J-Physiol* 1993;264:859-64.

15. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
16. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-H827.
17. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-C1437.
18. Radi R, Beckman JS, Bush KM et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
19. Radi R, Beckman JS, Bush KM et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481-87.
20. Zhu L, Gunn C, Beckman JS. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:452-57.
21. Beckman JS, Bechman TW, Chen J et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-4.

22. Conner EM, Brand SJ, Davis JM et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: Toxins, mediators, and modulators of gene expression. *Inflammatory Bowel Dis* 1996;2:133-47.
23. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;344:859-61.
24. Harris ML, Schiller HJ, Reilly PM et al. Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon? *Pharmacol Ther* 1992;53:375-408.
25. Liochev SI, Fridovich I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994;16:29-33.
26. Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 1986;67:1504-7.
27. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 1978;298:659-68.
28. Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1976;251:1371-74.
29. Heinecke JW, Li W, Francis GA et al. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 1993;91:2866-72.

30. Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM et al. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest* 1996;98:1283-89.
31. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;391:393-97.
32. Hazen SL, Zhang R, Shen Z et al. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ Res* 1999;85:950-958.
33. Foote CS, Goyne TE, Lehrer RI. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* 1983;301:715-16.
34. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
35. van d, V, Eiserich JP, Halliwell B et al. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997;272:7617-25.
36. Heinecke JW, Li W, Daehnke HL, III et al. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem* 1993;268:4069-77.

37. Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990;265:5666-70.
38. Metodiewa D, Dunford HB. The role of myeloperoxidase in the oxidation of biologically active polyhydroxyphenols (substituted catechols). *Eur J Biochem* 1990;193:445-48.
39. Klebanoff SJ. Estrogen binding by leukocytes during phagocytosis. *J Exp Med* 1977;145:983-98.
40. Svensson BE. Involvement of cysteine, serotonin and their analogues in peroxidase-oxidase reactions. *Chem Biol Interact* 1989;70:305-21.
41. Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1994;269:20394-400.
42. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF et al. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:1547-60.
43. Schmitt D, Shen Z, Zhang R et al. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry* 1999;38:16904-15.

44. Eiserich JP, Cross CE, Jones AD et al. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 1996;271:19199-208.
45. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin luminescence as a measure of intracellular superoxide dismutase activity in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2891-96.
46. Dolphin D, Forman A, Borg DC et al. Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:614-18.
47. Reid TJ, III, Murthy MR, Sicignano A et al. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4767-71.
48. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 1987;262:660-666.
49. Fita I, Rossmann MG. The NADPH binding site on beef liver catalase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:1604-8.
50. Claiborne A, Malinowski DP, Fridovich I. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 1979;254:11664-68.

51. Claiborne A, Fridovich I. Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *J Biol Chem* 1979;254:4245-52.
52. Heimberger A, Eisenstark A. Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:392-97.
53. Perry AC, Jones R, Niang LS et al. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* 1992;285 (Pt 3):863-70.
54. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985;839:62-70.
55. Robertson P, Jr., Fridovich SE, Misra HP et al. Cyanide catalyzes the oxidation of alpha-hydroxyaldehydes and related compounds: monitored as the reduction of dioxygen, cytochrome c, and nitroblue tetrazolium. *Arch Biochem Biophys* 1981;207:282-89.
56. Mashino T, Fridovich I. Mechanism of the cyanide-catalyzed oxidation of alpha-ketoaldehydes and alpha-ketoalcohols. *Arch Biochem Biophys* 1987;252:163-70.
57. Mashino T, Fridovich I. Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:547-51.

58. Cannella C, Berni R. Interaction of rhodanese with intermediates of oxygen reduction. *FEBS Lett* 1983;162:180-184.
59. Hicks M, Delbridge L, Yue DK et al. Catalysis of lipid peroxidation by glucose and glycosylated collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:649-55.
60. Smith PR, Thornalley PJ. Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycosylated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)hippuryl-lysine. *Eur J Biochem* 1992;210:729-39.
61. Farr SB, D'Ari R, Touati D. Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8268-72.
62. Cathcart R, Schwieters E, Saul RL et al. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5633-37.
63. Adelman R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2706-8.
64. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:6465-67.
65. Park EM, Shigenaga MK, Degan P et al. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from

biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3375-79.

66. Wagner JR, Hu CC, Ames BN. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3380-3384.
67. Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-90.
68. Rattan V, Sultana C, Shen Y et al. Oxidant stress-induced transendothelial migration of monocytes is linked to phosphorylation of PECAM-1. *Am J Physiol* 1997;273:E453-E461.
69. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C719-C741.
70. Sasaki M, Ostanin D, Elrod JW et al. TNF-alpha -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase dependent. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C422-C428.
71. Gaboury JP, Anderson DC, Kubes P. Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Am J Physiol* 1994;266:H637-H642.

72. Hotter G, Closa D, Prats N et al. Free radical enhancement promotes leukocyte recruitment through a PAF and LTB₄ dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 1997;22:947-54.
73. Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD et al. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 1992;267:16323-29.
74. Neish AS, Khachigian LM, Park A et al. Sp1 is a component of the cytokine-inducible enhancer in the promoter of vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 1995;270:28903-9.
75. Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ et al. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 1992;176:1583-93.
76. Sasaki M, Jordan P, Joh T et al. Melatonin reduces TNF- α induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF- κ B. *BMC Gastroenterol* 2002;2:9.
77. Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V et al. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* 1995;270:18966-74.
78. Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor

necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 1992;267:12030-12035.

79. Ledebur HC, Parks TP. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* 1995;270:933-43.
80. Schindler U, Baichwal VR. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 1994;14:5820-31.
81. Jou TS, Stewart DB, Stappert J et al. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5067-71.
82. Barnard ML, Matalon S. Mechanisms of extracellular reactive oxygen species injury to the pulmonary microvasculature. *J Appl Physiol* 1992;72:1724-29.
83. Seeger W, Hansen T, Rossig R et al. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability--effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res* 1995;50:1-17.
84. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol* 2000;164:6550-6559.

85. Tudor KS, Hess KL, Cook-Mills JM. Cytokines modulate endothelial cell intracellular signal transduction required for VCAM-1-dependent lymphocyte transendothelial migration. *Cytokine* 2001;15:196-211.
86. Deem TL, Cook-Mills JM. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood* 2004;104:2385-93.
87. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD et al. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996;98:136-41.
88. Zhai Q, Ji H, Zheng Z et al. Copper induces apoptosis in BA/F3beta cells: Bax, reactive oxygen species, and NFkappaB are involved. *J Cell Physiol* 2000;184:161-70.
89. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990;76:655-63.
90. Thomas EL, Jefferson MM, Bennett JJ et al. Mutagenic activity of chloramines. *Mutat Res* 1987;188:35-43.
91. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C et al. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-26.

92. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L et al. Superoxide-related signaling cascade mediates nuclear factor-kappaB activation in acute inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:699-704.
93. Ndengele MM, Muscoli C, Wang ZQ et al. Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages. *Shock* 2005;23:186-93.
94. Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ et al. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* 1995;269:L829-L836.
95. Carballo M, Conde M, El Bekay R et al. Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J Biol Chem* 1999;274:17580-17586.
96. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994;269:4705-8.
97. Hoyos B, Ballard DW, Bohnlein E et al. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 1989;244:457-60.
98. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990;10:2327-34.

99. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P et al. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990;171:35-47.
100. Bern MJ, Sturbaum CW, Karayalcin SS et al. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. *J Clin Invest* 1989;83:1810-1820.
101. Tamari H, Kachur JF, Baron DA et al. Monochloramine, a neutrophil-derived oxidant, stimulates rat colonic secretion. *J Pharm Exp Ther* 1991;257:887-94.
102. Moumami C, Gullikson GW, Grisham MB et al. Differential effects of reactive oxygen metabolites on neurally stimulated and nonstimulated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:266-71.
103. Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:720-728.
104. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S et al. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 1990;31:786-90.
105. Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J et al. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 1992;103:177-85.

106. Oshitani N, Kitano A, Okabe H et al. Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy. *Gut* 1993;34:936-38.
107. Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TRJ et al. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;103:186-96.
108. Ahnfelt-Ronne I, Neilson OH, Christensen A et al. Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* 1990;98:1162-69.
109. Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidants defences in inflammatory bowel disease. *Free Radicals Biol Med* 1995;19:991-98.
110. McKenzie SJ, Buffinton GD, Baker MS et al. Colonic epithelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) is a target of oxidative injury in inflammatory bowel disease (IBD). *Gastroenterology* 1993;104:A741.
111. Kitahora T, Suzuki K, Asakura H et al. Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:951-55.
112. Rugtveit J, Haraldsen G, Hogasen AK et al. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995;37:367-73.

113. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB et al. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003;201:28-36.
114. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W et al. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:17-27.
115. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41:2078-86.
116. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W et al. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:7-16.
117. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34.
118. Tedder TF, Steeber DA, Chen A et al. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866-73.
119. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343:757-60.

120. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1992;267:15176-83.
121. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM et al. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992;80:795-800.
122. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL et al. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9238-42.
123. Issekutz AC, Lopes N. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon-gamma. *Immunology* 1993;79:600-607.
124. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC et al. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996;79:560-9.
125. Jutila MA, Rorr L, Berg EL et al. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: Comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989;143:3318-24.
126. Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2244-48.

127. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL et al. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245:1238-41.
128. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992;117:895-902.
129. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D et al. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-38.
130. Moore KL, Stults NL, Diaz S et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992;118:445-56.
131. Sako D, Chang XJ, Barone KM et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75:1179-86.
132. Ohmori K, Takada A, Yoneda T et al. Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. *Blood* 1993;81:101-11.
133. Cordell JL, Pulford K, Turley H et al. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 1994;47:143-47.

134. Panés J, Perry MA, Anderson DC et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995;269:H1955-H1964.
135. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61-64.
136. Elices MJ, Osborn L, Takada Y et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577-84.
137. Strauch UG, Lifka A, Gossler U et al. Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *Int Immunol* 1994;6:263-75.
138. Streeter PR, Berg EL, Rouse BTN et al. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in leukocyte homing. *Nature* 1988;331:41-6.
139. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C et al. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 1993;366:695-98.
140. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993;74:185-95.

141. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH et al. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1990;110:1227-37.
142. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A et al. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 1996;184:229-39.
143. Soriano A, Salas A, Salas A et al. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2000;80:1541-51.
144. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). *Cell* 1987;51:813-19.
145. Allavena P, Paganin C, Martin-Padura I et al. Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* 1991;173:439-48.
146. Bell RG, Issekutz T. Expression of a protective intestinal immune response can be inhibited at three distinct sites by treatment with anti-alpha 4 integrin. *J Immunol* 1993;151:4790-802.

147. Holzmann B, McIntyre BW, Weissman IL. Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an alpha chain homologous to human VLA-4 alpha. *Cell* 1989;56:37-46.
148. Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M et al. α_4 integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in Peyer's patches of rats. *Intl Immunol* 1996;8:287-95.
149. Jones SC, Banks RE, Haidar A et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;36:724-30.
150. Koizumi M, King N, Lobb R et al. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;103:840-7.
151. Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y et al. In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab Invest* 1993;69:77-85.
152. Oshitani N, Campbell A, Bloom S et al. Adhesion molecule expression on vascular endothelium and nitroblue tetrazolium reducing activity in human colonic mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:915-20.
153. Patel RT, Pall AA, Adu D et al. Circulating soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:1037-41.

154. Schuermann GM, Aber Bishop AE, Facer P et al. Altered expression of cell adhesion molecules in uninvolved gut in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:341-7.
155. Briskin M, Winsor Hines D, Shyjan A et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997;151:97-110.
156. Souza HS, Elia CC, Spencer J et al. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1999;45:856-63.
157. Salmi M, Granfors K, MacDermott R et al. Aberrant binding of lamina propria lymphocytes to vascular endothelium in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 1994;106:596-605.
158. Liu ZX, Hiwatashi N, Noguchi M et al. Increased expression of costimulatory molecules on peripheral blood monocytes in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1241-6.
159. Bernstein CN, Sargent M, Gallatin WM. Beta2 integrin/ICAM expression in Crohn's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:147-60.
160. Picarella D, Hurlbut P, Rottman J et al. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1)

- reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *J Immunol* 1997;158:2099-106.
161. Podolsky DK, Lobb R, King N et al. Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti-alpha 4 integrin monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1993;92:372-80.
162. Hesterberg PE, Winsor Hines D, Briskin MJ et al. Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin α 4 β 7. *Gastroenterology* 1996;111:1373-80.
163. Wong PY, Yue G, Yin K et al. Antibodies to intercellular adhesion molecule-1 ameliorate the inflammatory response in acetic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:475-80.
164. Sans M, Salas A, Soriano A et al. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology* 2001;120:1162-72.
165. Kawachi S, Jennings S, Panes J et al. Cytokine and endothelial cell adhesion molecules expression in interleukin-10-deficient mice. *Am J Physiol* 2000;278 (in press).
166. Kawachi S, Morise Z, Jennings SR et al. Cytokine and adhesion molecule expression in SCID mice reconstituted with CD4+ T cells [In Process Citation]. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:171-80.

167. Gironella M, Molla M, Salas A et al. The role of P-selectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. *J Leukoc Biol*, in press 2002.
168. McCafferty DM, Smith CW, Granger DN et al. Intestinal inflammation in adhesion molecule-deficient mice: an assessment of P-selectin alone and in combination with ICAM-1 or E-selectin. *J Leukoc Biol* 1999;66:67-74.
169. Sans M, Panes J, Ardite E et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999;116:874-83.
170. Soriano-Izquierdo A, Gironella M, Massaguer A et al. Effect of cyclosporin A on cell adhesion molecules and leukocyte-endothelial cell interactions in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:789-800.
171. Collins T, Read MA, Neish AS et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909.
172. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW et al. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995;2:493-506.

173. Conner EM, Brand S, Davis JM et al. Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1615-22.
174. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH et al. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine* 1996;2:998-1004.
175. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
176. Ardite E, Panés J, Miranda M et al. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor κ B in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998;124:431-3.
177. Binion DG, West GA, Volk EE et al. Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1998;352:1742-46.
178. Sans M, Ardite E, Elizalde JI et al. ICAM-1 and VCAM-1 expression in experimental colitis: relation with nuclear factor kappa B activation. *Gastroenterology* 1998;114:A1076.
179. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:24-32.

180. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med* 2005;352:2499-507.
181. Yacyshyn BR, Bowen Yacyshyn MB, Jewell L et al. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;114:1133-42.
182. van Deventer SJ, Tami JA, Wedel MK. A randomised, controlled, double blind, escalating dose study of alicaforsen enema in active ulcerative colitis. *Gut* 2004;53:1646-51.
183. Schreiber S, Nikolaus S, Malchow H et al. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;120:1339-46.
184. Morris GP, Beck PL, Herridge MS et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
185. Hathaway CA, Appleyard CB, Percy WH et al. Experimental colitis increases blood-brain barrier permeability in rabbits. *Am J Physiol* 1999;276:G1174-G1180.
186. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-67.

187. Yamada Y, Marshall S, Specian RD et al. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992;102:1524-34.
188. Grisham MB, Volkmer C, Tso P et al. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991;101:540-547.
189. Dianda L, Hanby AM, Wright NA et al. T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997;150:91-97.
190. Sadlack B, Merz H, Schorle H et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253-61.
191. Sartor RB. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol* 1997;148:567-76.
192. Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK et al. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999;276:G1461-G1472.
193. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224-31.

194. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;180:2359-64.
195. Sher A, Fiorentino D, Caspar P et al. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 1991;147:2713-16.
196. O'Garra A, Chang R, Go N et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992;22:711-17.
197. Mosmann TR. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol Res* 1991;10:183-88.
198. de Waal MR, Abrams J, Bennett B et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
199. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.
200. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.

201. Dokka S, Shi X, Leonard S et al. Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1196-L1202.
202. Laichalk LL, Danforth JM, Standiford TJ. Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;15:181-87.
203. Kuga S, Otsuka T, Niuro H et al. Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Exp Hematol* 1996;24:151-57.
204. Kuhn R, Lohler J, Rennick D et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
205. Kennedy RJ, Hoper M, Deodhar K et al. Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 2000;87:1346-51.
206. Mac Donald TT. Gastrointestinal inflammation. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr Biol* 1994;4:261-63.
207. Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J Leukoc Biol* 1997;61:389-96.

208. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;98:1010-1020.
209. Rennick D, Davidson N, Berg D. Interleukin-10 gene knock-out mice: a model of chronic inflammation. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76:S174-S178.
210. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
211. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-49.
212. Mahler M, Bristol IJ, Leiter EH et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 1998;274:G544-G551.
213. Goussev AV, Zhang Z, Anderson DC et al. P-selectin antibody reduces hemorrhage and infarct volume resulting from MCA occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1998;161:16-22.
214. Carvalho-Tavares J, Fox-Robichaud A, Kubes P. Assessment of the mechanism of juxtacrine activation and adhesion of leukocytes in liver microcirculation. *Am J Physiol* 1999;276:G828-G834.

215. Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty DM et al. Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol* 1999;162:1137-43.
216. Elizalde JI, Panés J, Gómez J et al. Helicobacter pylori infection induces the formation of leukocyte-platelet aggregates in the gastric microvasculature. (Abstract). *Gastroenterology* 1996;110:A903.
217. Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I et al. Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Am J Physiol* 1996;271:282-92.
218. Elizalde JI, Gómez J, Panés J et al. Platelet activation in mice and human *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* 1997;100:996-1005.
219. Komatsu S, Panes J, Russell JM et al. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29:683-9.
220. Salas A, Panés J, Elizalde JI et al. Mechanisms responsible for enhanced inflammatory response to ischemia-reperfusion in diabetes. *Am J Physiol* 1998;275:H1773-H1781.
221. Panes J, Perez-del-Pulgar S, Casadevall M et al. Impaired mesenteric leukocyte recruitment in experimental portal hypertension in the rat. *Hepatology* 1999;30:445-53.

222. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002;359:1541-49.
223. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.
224. Xia B, Deng CS, Chen DJ et al. Role of copper zinc superoxide dismutase in the short-term treatment of acetic acid-induced colitis in rats. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1996;26:227-30.
225. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L et al. Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. *Eur J Pharmacol* 2001;432:79-89.
226. Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS et al. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-18.
227. Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I et al. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:753-65.
228. Feagan B, Greenberg G, Wild G et al. Efficacy and safety of humanized alpha4beta7 antibody in active Chron's disease. *Gastroenterology* 2003;124:A25-A26.

229. Farrell RJ, Shah SA, Lodhavia PJ et al. Clinical experience with infliximab therapy in 100 patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3490-3497.
230. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158:1825-32.
231. Feagan B, Greenberg G, Wild G et al. A randomized controlled trial of a humanized alpha4beta7 antibody in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:S248-S249.
232. Gordon FH, Hamilton MI, Donoghue S et al. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:699-705.
233. Mollà M, Gironella M, Gimeno M et al. The protective effect of superoxide dismutase (SOD) in radiation-induced intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;122:A401.
234. Closa D, Bulbena O, Rosello-Catafau J et al. Effect of prostaglandins and superoxide dismutase administration on oxygen free radical production in experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1993;17:563-71.
235. Ardite E, Sans M, Panes J et al. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000;80:735-44.

236. Mourelle M, Guarner F, Malagelada JR. Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model of colitis. *Gastroenterology* 1996;110:1093-7.
237. Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol* 1995;269:G119-G125.
238. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945-53.
239. Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z et al. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol* 1999;65:349-55.
240. Panés J, Perry MA, Anderson DC et al. Portal hypertension enhances endotoxin-induced intercellular adhesion molecule 1 up-regulation in the rat. *Gastroenterology* 1996;110:866-74.
241. Murthy SN, Cooper HS, Shim H et al. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 1993;38:1722-34.
242. Holtkamp W, Stollberg T, Reis HE. Serum interleukin-6 is related to disease activity but not disease specificity in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1995;20:123-26.

243. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J et al. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;30 Suppl 8:56-60.
244. Gross V, Andus T, Caesar I et al. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;102:514-9.
245. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A et al. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut* 1991;32:1531-4.
246. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996;16:144-50.
247. Scheinin T, Butler DM, Salway F et al. Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;133:38-43.
248. Fukushima K, Ogawa H, Kitayama T et al. Epithelial induction of serum amyloid A in experimental mucosal inflammation. *Dig Dis Sci* 2002;47:1438-46.
249. Chambers RE, Stross P, Barry RE et al. Serum amyloid A protein compared with C-reactive protein, alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-acid

- glycoprotein as a monitor of inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 1987;17:460-467.
250. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B et al. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1997;44:90-107.
251. Emerit J, Pelletier S, Tosoni-Verilgnae D et al. Phase II trial of copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in treatment of Crohn's disease. *Free Radicals Biol Med* 1989;7:145-49.
252. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 1999;286:304-6.
253. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
254. Yavuz Y, Yuksel M, Yegen BC et al. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1999;199:101-10.
255. Doan TN, Gentry DL, Taylor AA et al. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca(2+)-flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem J* 1994;297 (Pt 1):209-15.

256. Gozin A, Franzini E, Andrieu V et al. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin and p130cas tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1021-32.
257. Huot J, Houle F, Marceau F et al. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997;80:383-92.
258. Lefer DJ. Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:283-94.
259. Hanninen A, Jaakkola I, Jalkanen S. Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998;160:6018-25.
260. Sagara H, Matsuda H, Wada N et al. A monoclonal antibody against very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation and late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:287-94.
261. Chin JE, Hatfield CA, Winterrowd GE et al. Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *Am J Physiol* 1997;272:L219-L229.

262. Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M et al. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int* 2002;52:367-74.
263. Epperly MW, Sikora CA, DeFilippi SJ et al. Pulmonary irradiation-induced expression of VCAM-I and ICAM-I is decreased by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (MnSOD-PL) gene therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:175-87.
264. Li L, Crockett E, Wang DH et al. Gene transfer of endothelial NO synthase and manganese superoxide dismutase on arterial vascular cell adhesion molecule-1 expression and superoxide production in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:249-55.
265. Zhu GD, Arendsen DL, Gunawardana IW et al. Selective inhibition of ICAM-1 and E-selectin expression in human endothelial cells. 2. Aryl modifications of 4-(aryloxy)thieno[2,3-c]pyridines with fine-tuning at C-2 carbamides. *J Med Chem* 2001;44:3469-87.
266. Ley K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res* 2001;24:87-95.
267. Burns RC, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA et al. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* 2001;121:1428-36.

268. Huot J, Houle F, Marceau F et al. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997;80:383-92.
269. d'Alessio P, Moutet M, Coudrier E et al. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 1998;24:979-87.
270. Wang Q, Pfeiffer GR, Stevens T et al. Lung microvascular and arterial endothelial cells differ in their responses to intercellular adhesion molecule-1 ligation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:872-77.
271. Turner CE, Burridge K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:849-53.
272. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ et al. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999;127:685-92.
273. Yue G, Lai PS, Yin K et al. Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxynitrite production. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:915-25.

274. Sethi S, Singh MP, Dikshit M. Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation. *Blood* 1999;93:333-40.
275. Mitchell DJ, Yu J, Tyml K. Local L-NAME decreases blood flow and increases leukocyte adhesion via CD18. *Am J Physiol* 1998;274:H1264-H1268.
276. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-55.
277. Franzini E, Sellak H, Marquetty C et al. Inhibition of human neutrophil binding to hydrogen peroxide-treated endothelial cells by cAMP and hydroxyl radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 1996;21:15-23.
278. Olsson N, Siegbahn A, Nilsson G. Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:143-46.
279. Badolato R, Johnston JA, Wang JM et al. Serum amyloid A induces calcium mobilization and chemotaxis of human monocytes by activating a pertussis toxin-sensitive signaling pathway. *J Immunol* 1995;155:4004-10.
280. Xu L, Badolato R, Murphy WJ et al. A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion. *J Immunol* 1995;155:1184-90.

281. Su SB, Gong W, Gao JL et al. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med* 1999;189:395-402.
282. Gatt ME, Urieli-Shoval S, Preciado-Patt L et al. Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. *J Lab Clin Med* 1998;132:414-20.
283. Badolato R, Wang JM, Stornello SL et al. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J Leukoc Biol* 2000;67:381-86.
284. Jijon HB, Madsen KL, Walker JW et al. Serum amyloid A activates NF-kappaB and proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2005;35:718-26.
285. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M et al. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab Invest* 1998;78:535-39.
286. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S et al. Endotoxin-induced mesenteric microvascular changes involve iNOS-derived nitric oxide: results from a study using iNOS knock out mice. *Shock* 2000;13:397-403.
287. Salas A, Gironella M, Salas A et al. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002;82:597-607.

