

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS MECANISMOS PROTECTORES EN LA
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE Y HAPTOGLOBINA.**

Autor: LUCÍA MÁRQUEZ MOSQUERA

**Directores: MONTSERRAT ANDREU GARCÍA
ADOLFO DÍEZ PÉREZ**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA. FACULTAT DE MEDICINA.
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA. 2012.**

ÍNDICE

1	AGRADECIMIENTOS.....	2
2	PRESENTACIÓN	3
3	PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL	4
4	COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL	5
5	AYUDAS RECIBIDAS.....	7
6	ABREVIATURAS	8
7	INTRODUCCIÓN.....	10
7.1	ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	10
7.1.1	Introducción general	10
7.1.2	Fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....	12
7.2	Sistema Endocannabinoide	21
7.2.1	Introducción.....	21
7.2.2	Endocannabinoides, tracto gastrointestinal e inflamación.....	22
7.3	HAPTOGLOBINA	27
7.3.1	Introducción.....	27
7.3.2	Haptoglobina, respuesta inmunológica y Enfermedad Inflamatoria Intestinal	29
8	OBJETIVOS	30
8.1	Objetivo general	30
8.2	Objetivos estudio 1: Sistema Endocannabinoide y Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....	30
8.3	Objetivos estudio 2: Haptoglobina y Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....	30
9	PUBLICACIONES ORIGINALES.....	31
10	DISCUSIÓN.....	54
11	CONCLUSIONES.....	60
12	BIBLIOGRAFÍA.....	62

1 AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Montserrat Andreu, por su tesón, espíritu crítico y apoyo durante todos estos años, sin la que no habría sido posible la realización de esta tesis.

Al Dr. Adolfo Díez, por su disponibilidad y por haber facilitado todo lo necesario para la redacción de esta tesis.

A todos los componentes del equipo del Dr. Fernando Rodríguez en la Fundación IMABIS-Laboratorio de Medicina Regenerativa del Hospital Carlos Haya, en especial a Javier y a Juan, que me acogieron con entusiasmo y con los que di mis primeros pasos en el laboratorio.

A Mar Iglesias, por su paciencia y explicaciones durante la revisión histológica de todas las muestras.

A todos los miembros de la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Hospital de Gasthuisberg, en Leuven, con el Prof. Paul Rutgeerts y la Prof. Severine Vermiere a la cabeza, por acogerme con entusiasmo y hacerme sentir como un miembro más de su equipo desde el primer día. Especialmente a Isabelle, por tantas horas compartidas buceando en la genética de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. A Marie, por su entusiasmo y afecto. A Sophie y a Karolien, por su paciencia durante mis primeras semanas en el laboratorio. A mis compañeros de despacho Matthias, Wouter y David, por tantas horas de trabajo, risas y canciones del día.

A todos mis compañeros del Servicio de Digestivo del Hospital del Mar, que hacen que sea un placer ir a trabajar cada día. En especial a Xavi Bessa por su soporte científico y estadístico, y por el transporte diario. A Donald Vázquez, Isabel Cirera y Agustín Seoane, con los que di mis primeros pasos durante la residencia. A Susanna Coll, que me recibió cuando llegué de Galicia y me animó a la realización de esta tesis casi desde el primer día. A mis compañeros de sección y amigos, Cristina y Lucas, por tantas horas de trabajo y risas compartidas.

A todos mis compañeros de residencia, especialmente a Belén y a Nuria, por su apoyo, paciencia y horas de terapia durante estos años.

A mis padres, tan honestos y generosos como para educar a sus hijas en libertad y con curiosidad por descubrir el mundo. A Eva, siempre a mi lado.

A Carles, el mejor compañero en este y en cualquier otro viaje.

2 PRESENTACIÓN

La presente Tesis Doctoral está estructurada siguiendo las directrices de la normativa vigente para la presentación de tesis doctorales como un compendio de publicaciones, aprobada por el Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Los estudios que conforman esta Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación, dirigida a caracterizar el papel del Sistema Endocannabinoide y de la Haptoglobina en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Los resultados de estos estudios han aportado información relevante y novedosa en este campo, y han sido recogidos en dos artículos originales publicados en revistas de difusión internacional, con un factor de impacto global de 14.929.

3 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

Los resultados de los estudios que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

- **L. Márquez**, S. Abanades, M. Andreu. Sistema endocannabinoide e inflamación intestinal. Med Clin (Barc). Octubre 2008 18; 131(13):513-7.

- **Márquez L**, Suárez J, Iglesias M, Bermudez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, Andreu M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. PLoS One. 2009 Sep 4; 4(9):e6893.

- **L Márquez**, C Shen , I. Cleynen, K. Machiels, C. Perrier, V. Ballet, S. Organe, M. Ferrante, L. Henckaerts, P. Rutgeerts, JL. Ceuppens and S. Vermeire. Role of Haptoglobin polymorphisms in susceptibility to IBD and in triggering murine colitis. Gut 2011.Publicado on line en Sept 2011.

4 COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LOS TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL

Los resultados de los trabajos que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido presentados en los congresos citados a continuación:

- **L. Márquez**, J. Suarez, M. Iglesias, FJ Bermudez-Silva, F. Rodríguez, M. Andreu. “Endocannabinoid system in colonic mucosa of onset and quiescent ulcerative colitis. Differences with normal tissue”. 16th Union European Digestive Week (UEGW). Octubre 2008. **(Póster)**

- **L. Márquez**, J. Suarez, M. Iglesias, FJ Bermudez-Silva, F. Rodríguez, M. Andreu. “Expresión del sistema endocannabinoide en tejido colónico normal: un potencial papel protector en la colitis ulcerosa?”. XII Congreso de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, Marzo 2009. **(Comunicación oral)**

- **L. Márquez**, J. Suarez, M. Iglesias, FJ Bermudez-Silva, F. Rodríguez, M. Andreu. “Expression of the endocannabinoid system in human colonic tissue: a potential protective role in ulcerative colitis”. Digestive Disease Week. Chicago 2009. **(Póster)**

- **L. Márquez**, I Cleynen, K Machiels, S Organe, M Ferrante, L Henkaerts, V Ballet, P Rutgeerts, S Vermeire. Haptoglobin polymorphisms are associated with ulcerative colitis and Crohn’s disease. Belgian Week of Gastroenterology. Amberes, 2010. **(Comunicación oral)**

- **L. Márquez**, I Cleynen, K Machiels, S Organe, M Ferrante, L Henkaerts, V Ballet, P Rutgeerts, S Vermeire. Los polimorfismos en el gen de la Haptoglobina están asociados a la Colitis Ulcerosa y a la Enfermedad de Crohn. XIII Congreso de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, 2010. **(Comunicación oral)**

- **L. Márquez**, I Cleynen, S Organe, M Ferrante, V Ballet, P Rutgeerts, S Vermeire. El estudio de loci asociados a enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa identifica genes comunes en la vía Th17 y en la inmunidad innata. XIII Congreso de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, 2010. **(Comunicación oral)**

- **L. Márquez**, I Cleynen, K Machiels, S Organe, M Ferrante, L Henkaerts, V Ballet, P Rutgeerts, S Vermeire. Haptoglobin polymorphisms are associated with ulcerative colitis and Crohn’s disease. Digestive Disease Week. New Orleans. 2010. **(Póster)**

- **L Márquez**, I Cleynen, S Organe, M Ferrante, V Ballet, P Rutgeerts, S Vermeire. Investigation of Crohn's disease associated loci in Ulcerative Colitis points towards common susceptibility genes in the Th17 pathway and innate immunity. Digestive Disease Week. New Orleans 2010. **(Póster)**

- **L Márquez**, I Cleynen, K Machiels, S. Organe, V Ballet, L Henckaerts, M Ferrante, P Rutgeerts, S Vermeire. Haptoglobin polymorphism is associated with Ulcerative Colitis, Crohn's disease and Primary Schlerosing Cholangitis. 18th United European Gastroenterology Week. Barcelona, 2010. **(Comunicación oral)**

- **L. Márquez**, I. Cleynen, K. Machiels, S. Organe, V. Ballet, L. Henckaerts, M. Ferrante, P. Rutgeerts, S. Vermeire. Role of Haptoglobin in susceptibility of IBD and in triggering murin colitis. Digestive Disease Week. Chicago 2011. **(Comunicación oral).**

5 AYUDAS RECIBIDAS

Los trabajos que constituyen la base de la presente Tesis Doctoral han sido efectuados con el soporte de las siguientes ayudas:

- Beca de *“Iniciació a la recerca”* de la Societat Catalana de Digestologia, Junio 2007. Proyecto: “Sistema Endocannabinoide y EII”.

- Beca de *“Formació a l’estranger”* de la Societat Catalana de Digestologia, Junio 2009. Proyecto: “Determinantes genéticos en la Colitis Ulcerosa. Correlación genotipo-fenotipo”.

- Contrato de formación en investigación para profesionales sanitarios (Contrato Río Hortega). Instituto Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Febrero 2008-Febrero 2011.

6 ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

AEA: Anandamida

2-AG: 2-araquidonil glicerol

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

5-ASA: aminosalicilatos

ATP: adenosín trifosfato

CEP: Colangitis Esclerosante Primaria

CU: Colitis Ulcerosa

CB1/2: receptor endocannabinoide tipo 1/2

DAGL-: diacilglicerol lipasa

DM: Diabetes Mellitus

DSS: sulfato sódico dextrano

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

EC: enfermedad de Crohn

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FAAH: aminohidrolasa de ácidos grasos

GWAS: Genome wide association studies

Hp: Haptoglobina

IL: interleuquina

INF γ : interferon gamma

JAK: janus-quinasa

KO: knock-out

LPS: lipopolisacárido

MAGL: monoacilglicerol lipasa

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NAPE-PLD: n-acilfosfatidiletanolamina específica-fosfolipasa D

NF- κ B: factor nuclear κ B

OXA: oxazolona

PEA: n-palmitoil-etanolamina

PMN: polimorfonucleares

STAT 3: transductor de señal y activador de la transcripción 3

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

Th: linfocitos T "helper" o efectores

TNBS: ácido sulfónico trinitrobenceno

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

WT: wild-type

7 INTRODUCCIÓN

7.1 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

7.1.1 Introducción general

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es una enfermedad crónica, compleja y de presentación clínica heterogénea, que incluye dos entidades fundamentales: la enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Ulcerosa (CU). Se trata de enfermedades crónicas, de curso recurrente, que afectan al tracto gastrointestinal y para las que en estos momentos no existe ningún tratamiento curativo.

En los últimos años se ha producido un incremento progresivo de su diagnóstico en países occidentales, con una incidencia de EC de 5.9/100.000 habitantes-año y de CU de 9.75/100.000 habitantes-año¹. Existe una mayor incidencia y prevalencia de la EII en las poblaciones del norte de Europa y América del Norte, mientras que la menor prevalencia se sitúa en Asia continental. El ambiente y estilo de vida occidentalizado está vinculado a la aparición de la EII, que se asocia con el tabaquismo, las dietas altas en grasas y azúcar, la utilización de fármacos, el estrés y el status socioeconómico elevado. La EII también se ha asociado con los antecedentes de apendicectomía. El tabaquismo y la apendicectomía previa en pacientes con CU se asocian con formas más leves de la enfermedad, menor necesidad de hospitalizaciones y mejor respuesta terapéutica, al contrario que en los pacientes con EC.²

La EII presenta un primer pico de incidencia entre los 15 y los 30 años y otro posterior entre los 50 y los 70 años³.

Numerosos estudios han demostrado que existe agregación familiar, con índices de concordancia en gemelos monocigotos de 10% en CU y de 37% en EC⁴. En pacientes con un familiar de primer grado con EII, el riesgo de padecer CU es 8-15 veces superior al de la población general, y el de padecer EC 20-30 veces superior al de la población general⁵.

Se trata de enfermedades complejas y poligénicas, de etiología multifactorial, cuya fisiopatología no es del todo conocida. En los últimos años, se han producido importantes avances en la comprensión de la patogénesis de la EII. En primer lugar, el descubrimiento de nuevos genes de susceptibilidad, que han permitido demostrar la importancia de la función de barrera del epitelio intestinal, así como las alteraciones en los mecanismos tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En segundo lugar, la identificación de factores ambientales que implican a las bacterias

comensales (o sus productos), como los inductores de la desregulación de la respuesta inmunológica. En tercer lugar, el estudio de modelos murinos de CU, en los que la enfermedad se desarrolla sólo en presencia de bacterias⁶.

En resumen, existe una alteración de la respuesta inmunológica normal a las bacterias comensales debido a factores ambientales en un individuo genéticamente susceptible. Por lo tanto, la patogénesis de la EII se debe a una combinación de factores genéticos, inmunológicos, bacterianos y ambientales⁷.

Las manifestaciones clínicas son, fundamentalmente, el dolor abdominal y la diarrea con sangre (en el caso de la afectación colónica), asociadas a un deterioro del estado general (pérdida de peso, fiebre, anemia). A las manifestaciones clínicas propias de la afectación intestinal pueden añadirse las derivadas de las muy frecuentes complicaciones extraintestinales. Prácticamente casi todos los sistemas pueden estar afectados, principalmente los ojos, piel, articulaciones, riñones, hígado y vías biliares y sistema vascular. Las manifestaciones extraintestinales en la EII se relacionan con alteraciones inmunológicas y se clasifican en dos grandes grupos:

- manifestaciones asociadas a inflamación intestinal activa, con las que comparte un mecanismo patogénico común (artritis, Eritema Nodoso, Pioderma Gangrenoso, Iritis Aftosa, estomatitis, uveítis)
- enfermedades autoinmunes independientes de la EII (Espondilitis Anquilosante, Cirrosis Biliar Primaria, Alopecia Areata, Tiroiditis Autoinmune), que reflejan únicamente una mayor susceptibilidad al desarrollo de mecanismos autoinmunes. A excepción de la Colangitis Esclerosante Primaria (CEP), no se consideran como específicas de la EII, si no como enfermedades autoinmunes asociadas.⁸

La CU se caracteriza por una afectación continua, de extensión variable, de la mucosa de colon y recto. El hallazgo histológico característico es la presencia de abscesos de cripta, además de alteraciones arquitecturales y depleción de moco y células "goblet", frecuentes también en la EC⁹.

La EC se caracteriza por la afectación de cualquier punto del tracto digestivo, aunque la localización más frecuente es la ileo-colónica. Se trata de una afectación discontinua y transmural, por lo que en ocasiones se presenta asociada a fístulas, estenosis y abscesos. El hallazgo histológico característico es la presencia de granulomas no caseificantes en la lámina propia¹⁰.

No existe ningún hallazgo patognomónico de la enfermedad, por lo que el diagnóstico de EII se establece por la presencia de una combinación de criterios clínicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos.

El tratamiento incluye un grupo heterogéneo de fármacos (derivados de 5-ASA, corticoides tópicos y sistémicos, tiopurinas, anti-TNF α) con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, que en muchos casos controlan los síntomas y resuelven la lesión aguda, pero no curan la enfermedad, además de presentar efectos secundarios a corto y largo plazo¹¹.

A pesar de la aparición de nuevos tratamientos en los últimos años, como los fármacos anti-TNF α , todavía entre un 20-30% de los pacientes requieren tratamiento quirúrgico¹¹.

Por lo tanto, profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y conocer los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inflamatoria permitirá la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos más específicos.

7.1.2 Fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

EC y CU son enfermedades complejas y poligénicas, que presentan alteraciones en múltiples genes, cada uno de ellos con una modesta contribución a la fisiopatología de la enfermedad. Se acepta que la EII es la consecuencia de una respuesta inflamatoria inapropiada a bacterias comensales del tracto gastrointestinal en un individuo genéticamente susceptible⁷.

El mantenimiento de la homeostasis intestinal es un equilibrio entre la compleja interacción de factores genéticos, inmunológicos, bacterianos y otros factores ambientales, como el tabaco, con un papel protector en la CU y favorecedor en la EC (probablemente en relación con la alteración en los mecanismos de autofagia)¹².

La permeabilidad de la barrera intestinal permite la entrada de microorganismos que, en condiciones normales, son detectados por el sistema inmune innato que orchestra una respuesta inmunológica apropiada, tolerogénica, inflamatoria y reparadora, reclutando otros componentes, que incluyen también células del sistema inmunológico adaptativo¹².

En la EII se produce un desequilibrio en los mecanismos que mantienen la homeostasis intestinal, en la compleja coordinación de la actividad de las células inmunológicas epiteliales y de los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa.

FACTORES GENÉTICOS

Los recientes progresos en la comprensión de la fisiopatología de la EII nos ofrecen información sobre cómo los factores genéticos interactúan con las señales microbianas y el medio ambiente dentro de los tejidos, los puntos de control biológico que intervienen, los cambios selectivos que se producen durante el curso de la enfermedad y la diferente respuesta biológica según el fenotipo de la enfermedad.

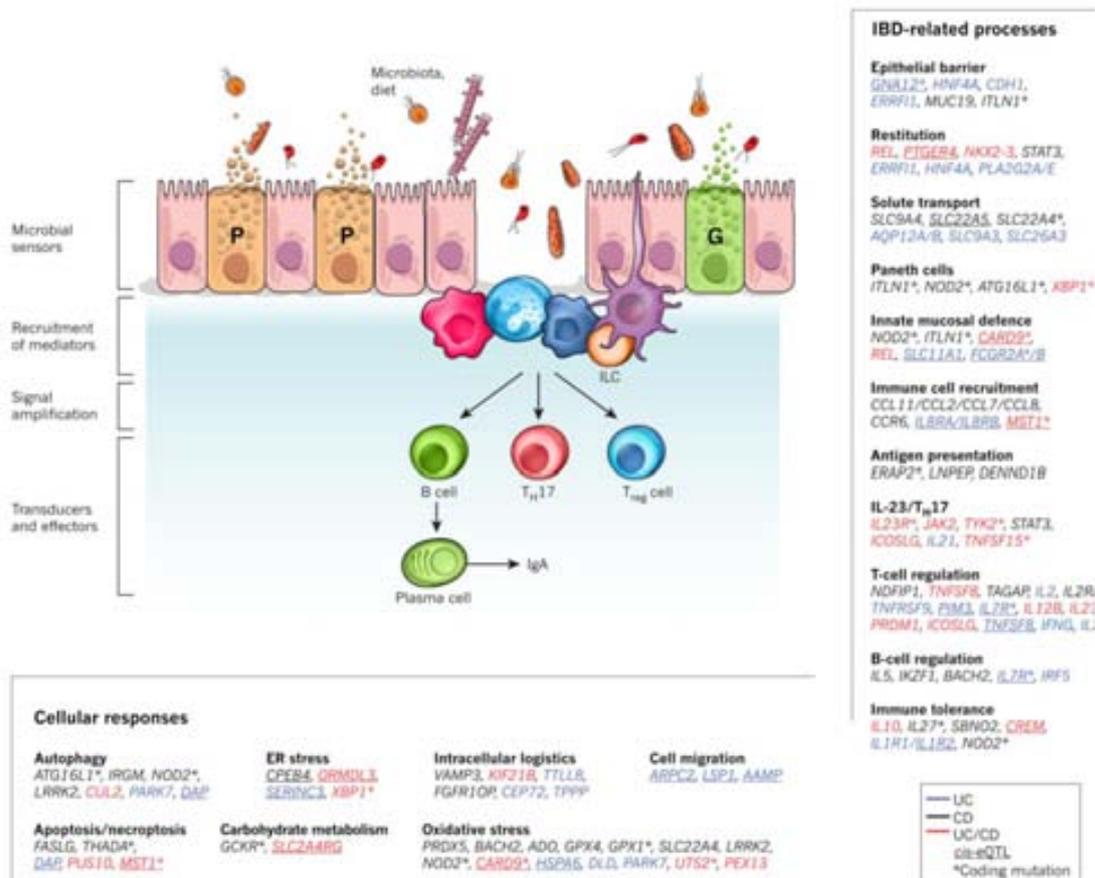
Coincidiendo con la aparición de los estudios de asociación “Genome wide” (GWAs), se han identificado más de 90 loci de riesgo relacionados con la EII. Más de un 30% de ellos se asocian tanto a la CU como a la EC, lo que refuerza la idea de la existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes entre ambas enfermedades¹³⁻¹⁵.

También se han observado un 50% de polimorfismos comunes entre EC, CU y otras enfermedades de base inmunológica (DM tipo 1 y 2, Artritis Reumatoide, Espondilitis Anquilosante, Esclerosis Múltiple, Psoriasis, enfermedad de Behçet, Asma, Vitíligo, Lupus Eritematoso Sistémico), lo que subraya la presencia de vías patogénicas comunes¹⁶.

A estos hallazgos, habría que añadir los resultados del estudio de variantes genéticas raras (presentes en menos de un 1% de la población), de la secuenciación de exomas y de la identificación de microRNA.

Mediante todos estos estudios genéticos ha sido posible identificar nuevos mecanismos patogénicos en la EII, gracias a la descripción de diversos polimorfismos en genes implicados en puntos clave del mantenimiento de la homeostasis intestinal, que incluyen genes relacionados con la función de la barrera epitelial, mecanismos de reparación epitelial, defensa microbiana, regulación de la inmunidad innata y adaptativa, autofagia, apoptosis, estrés del retículo endoplasmático y otras vías metabólicas relacionadas con la homeostasis celular⁶.

Figura 1. Vías fisiopatológicas de la EII, basado en los resultados de GWAS⁶



De entre todos ellos, podemos destacar:

- **CARD9** (Caspase recruitment domain-containing protein 9): fue uno de los primeros genes identificados en la EII. Su función es la de integrar las señales procedentes de los mecanismos de la inmunidad adaptativa en respuesta a bacterias, virus y hongos. Dependiendo del tipo de estímulo, CARD9 activa diferentes mecanismos para modular la liberación de citoquinas. En la EII CARD9 activa la vía de NF-κB, aumentando la producción de linfocitos Th17 y la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL1β e IL23^{6,17}.

- **NOD 2** (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2): fue el primer gen implicado en la EII y es, hasta el momento, el gen asociado a la EC que confiere un mayor riesgo relativo de padecer la enfermedad. El NOD2 es un sensor intracelular de peptidoglicanos bacterianos, ya que reconoce secuencias de muramil-dipéptidos presentes en la membrana celular de múltiples bacterias. Se han identificado 3 polimorfismos en este gen, de los que al menos uno de ellos está presente en el 30%

de los pacientes europeos con EC^{14,18}. Los pacientes con alguno de estos polimorfismos tienen mayores posibilidades de presentar afectación ileal y un patrón estenosante, que implica mayor necesidad de tratamiento quirúrgico¹⁹. Las células epiteliales, las células de Paneth y las células endoteliales expresan NO2. En condiciones normales, la interacción de la proteína NOD2 con los peptidoglicanos de la pared bacteriana activa las vías NF-κB y MAP-quinasas que inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos. En los pacientes portadores de polimorfismos en el gen NOD2, la liberación de citoquinas proinflamatorias y la activación de la vía NF-κB están disminuidas, lo que implica una alteración de la respuesta a los peptidoglicanos bacterianos²⁰.

- **ATGL16L1 e IGRM:** ambos genes están implicados en la regulación de la autofagia, mecanismo celular que permite la degradación de componentes intracelulares, incluyendo patógenos, cuerpos apoptóticos y organelas. Su asociación con la EC supone una disminución de los mecanismos de autofagia en estos pacientes. Además, los pacientes que presentan el polimorfismo del gen ATGL16L1 tienen células de Paneth anormales, lo que conlleva una alteración en la secreción de péptidos antimicrobianos y , por lo tanto, una respuesta defectuosa a la presencia de patógenos intestinales²¹⁻²³.

- **IL-10:** el polimorfismo en el gen de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y su receptor se han asociado con la CU, tanto en los recientes estudios GWAS como en estudios de familias con EII^{13,24,25}. La IL-10 es expresada por células del sistema inmune innato (macrófagos, mastocitos, células “natural killer”) y adaptativo (linfocitos Th1, Th2, Th17). Tiene efectos pleiotrópicos sobre las células B y T y limita la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF-α e IL-12^{26,27}. La respuesta celular está mediada por un receptor específico, que activa la vía de señalización intracelular STAT3. Las primeras referencias sobre el papel de la IL-10 en la colitis experimental, proceden del estudio de ratones KO para IL-10 en los que se ha observado el desarrollo de colitis de forma espontánea^{27,28}. Además la transferencia de linfocitos T reguladores a ratones inmunodeficientes parece prevenir o incluso curar la colitis²⁹.

La importancia de los defectos en este gen ha sido subrayada por la identificación de mutaciones recesivas que implican una pérdida de función en los componentes IL10RA e IL10RB del receptor de la IL-10, asociándose a la aparición de CU en la infancia²⁵. Estas mutaciones causan una ausencia de IL-10R2, por lo que no se produce la fosforilación de STAT3 y se bloquea esta vía de señalización intracelular²⁶.

- **Región HLA:** esta región situada en el cromosoma 6 y que contiene los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es el área de la que se disponen de evidencias más sólidas de su asociación con la EII^{30,31}. Comprende genes implicados en la respuesta inmune a péptidos exógenos y endógenos.

La asociación más consistente hasta el momento es con el alelo HLA DRB1*0103, una variante rara del HLA tipo 2. Se ha relacionado con colitis extensas, con mala respuesta al tratamiento, mayor necesidad de colectomías y con la presencia de manifestaciones extraintestinales^{32,33}. También se ha asociado a pacientes con EC, pero con afectación únicamente colónica³⁴.

- **IL23R:** la identificación de polimorfismos en el gen del receptor de IL23, tanto en pacientes con EC como en pacientes con CU, ha destacado el papel de la desregulación de los linfocitos Th17 en la fisiopatología de la EII. La IL23 es el eje fundamental de la activación de linfocitos Th17 efectoras, y por lo tanto, clave en la respuesta inmunológica adquirida, y en la subsecuente activación de mecanismos de señalización intracelular (JAK2-STAT3)³⁵.

Pero todos estos hallazgos explican únicamente el 23% en EC y el 16% en CU de la heredabilidad en la EII, lo que implica que no sólo los factores genéticos, sino los factores epigenéticos y ambientales tienen un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad.

MICROBIOTA INTESTINAL

El intestino está poblado por una gran variedad de microorganismos que colonizan al individuo poco después del nacimiento, cambia durante el primer año de vida y, en condiciones normales, permanece estable durante el resto de la vida. La microbiota intestinal tiene un papel fundamental en el desarrollo y posterior modulación de la respuesta inmune y en la metabolización de nutrientes.

Múltiples estudios genéticos, inmunológicos y microbiológicos han destacado la importancia de la composición de la microbiota y la alteración de sus interacciones con el huésped en la patogénesis de la EII.

Modelos murinos han demostrado que se requiere la presencia de bacterias intestinales para que se produzca inflamación³⁶. Además, cambios en el equilibrio microbiológico (por antibióticos o colitis infecciosa) pueden favorecer el desarrollo de EII o desencadenar brotes³⁷.

Hasta el momento, no se ha identificado una bacteria causante de la enfermedad, pero en pacientes con EII se ha descrito una disminución de la diversidad microbiológica intestinal y un desequilibrio entre bacterias con propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias (disbiosis). Se ha observado una disminución de la presencia de especies de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, ambos grupos con propiedades antiinflamatorias. Por el contrario, existe una mayor presencia de *Enterobacteriaceae*, fundamentalmente *E. Coli*, con propiedades proinflamatorias³⁸. La disbiosis observada en los pacientes con EII, puede estar causada por la colonización por patógenos entéricos, por la desregulación de los mecanismos de inmunidad innata y adaptativa o por la combinación de ambas³⁹. Pero por el momento no está claro si la disbiosis favorece el desarrollo de EII o si es una consecuencia de misma.

Por lo tanto, y a pesar de que no se ha conseguido identificar un patógeno único implicado en el desarrollo de la EC o de la CU, existen patógenos asociados a la EC pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad en huéspedes genéticamente susceptibles con defectos en los mecanismos de la inmunidad innata o adquirida y/o en la barrera intestinal. Así pues, además de estudios dirigidos a la identificación de factores de susceptibilidad del huésped, será necesario identificar cambios en la composición de la microbiota intestinal y perfiles metabólicos de los pacientes con EII, que aportarán más información sobre la patogénesis de la EII y permitirán nuevas aproximaciones terapéuticas.

BARRERA INTESTINAL

La barrera intestinal constituye la separación física entre microbiota intestinal, circulación sanguínea y tejido linfoide secundario, y es necesaria para la regulación de la entrada de bacterias de la luz intestinal a la circulación.

La barrera intestinal está formada por células epiteliales y células especializadas: células “goblet” productoras de moco y relacionadas con mecanismos de reparación epitelial, y células de Paneth, que secretan péptidos antimicrobianos, como las α -defensinas, entre ellas, y con un papel central en la regulación de la permeabilidad intestinal están las uniones intercelulares (espacios paracelulares) y “tight junctions”.

En la EII existe una disfunción epitelial en la que se producen defectos en el desarrollo y proliferación de las células especializadas de la barrera intestinal, y disminuyen los mecanismos reparadores del epitelio en respuesta a la agresión. Se produce además

una mala regulación de las “tight junctions” y un aumento de los espacios paracelulares⁴⁰.

Todo esto se traduce en un aumento de la permeabilidad intestinal y una disminución de la primera línea de defensa contra microorganismos, lo que conlleva un incremento de la entrada de bacterias que se ponen en contacto con las células presentadoras de antígenos, desencadenando la respuesta inmunológica innata y adaptativa⁴⁰.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA Y ADAPTATIVA

En la EII se produce una ruptura del equilibrio entre inmunotolerancia y defensa frente a patógenos, que desencadena una respuesta inflamatoria descontrolada. Se produce una infiltración de la lámina propia por células de la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células “natural-killer”), además de células inmunológicas adaptativas (fundamentalmente linfocitos T), con elevación de los niveles locales de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL 1 β , INF γ , citoquinas de la vía IL23/Th17,...)⁷.

Las células de la inmunidad innata tienen receptores que reconocen secuencias de la pared bacteriana (“pattern recognize receptors”: receptores “toll-like”/ proteínas NOD 2), que proporcionan una respuesta inmunológica rápida mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias⁴¹.

En condiciones normales, esta respuesta inmunológica protege contra antígenos presentes en la luz intestinal, pero también induce mecanismos de tolerancia que mantienen la homeostasis inmune en el intestino.

Las células de la inmunidad innata, fundamentalmente las células dendríticas, presentan antígenos a linfocitos T CD4 *naive* desencadenando la respuesta inmunológica adaptativa. Inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia linfocitos T reguladores o efectores (“helper”) Th1, Th2, Th17, que migran hacia la lámina propia, donde producen la liberación de más citoquinas y estimulan la aparición de linfocitos B de memoria^{7,36}.

Factores como el fenotipo de las células presentadoras de antígenos, las citoquinas presentes en el medio, factores microbianos o alteraciones metabólicas modulan la diferenciación hacia células reguladoras, que secretan interleuquinas antiinflamatorias, o hacia células T efectoras.

Estas células efectoras son esenciales para la defensa frente a patógenos, pero en la EII un desequilibrio en la expansión de los linfocitos T efectoras y la disminución de las

células T reguladoras pueden llevar al desarrollo de mecanismos de inflamación intestinal deletéreos para la mucosa.

Clásicamente, la respuesta inmunológica adaptativa se había atribuido en EC a la activación de linfocitos Th1 y en la CU a la activación de linfocitos Th2. Pero en los últimos años se han descrito nuevos mecanismos fisiopatológicos que sugieren un complejo solapamiento entre ambas enfermedades, a través de la activación de linfocitos Th17³⁵.

El resultado final es una respuesta inmunológica inapropiada, tanto innata como adquirida, a la presencia de bacterias comensales y otros antígenos lumbinales. La liberación de citoquinas proinflamatorias a su vez estimula a los macrófagos, que a su vez producen nuevas citoquinas, y se activa una cascada inflamatoria que ocasiona un aumento de la permeabilidad epitelial y daño tisular.

En resumen, en la EII se produce una alteración en diferentes puntos de la homeostasis intestinal, consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales, implicados en la alteración de la barrera intestinal, de los mecanismos de inmunidad innata y adquirida y en la composición y diversidad de la microbiota intestinal. En individuos sanos, la lámina propia contiene una gran cantidad de células del sistema inmune y citoquinas, que incluyen mediadores antiinflamatorios (TGF- β , IL-10, fundamentalmente), que regulan y limitan la respuesta inflamatoria, y mediadores proinflamatorios procedentes de células de la inmunidad innata y adaptativa, que limitan la excesiva entrada de bacterias y nos defienden frente a los patógenos. En condiciones normales existe un equilibrio entre las células T reguladoras y las células T efectoras (Th1, Th2, Th17).

En los pacientes con EII, múltiples factores contribuyen al incremento de la exposición a las bacterias de la luz intestinal, incluyendo la disrupción de la barrera mucosa, la desregulación de las "tight junctions", el aumento de la permeabilidad intestinal y el aumento de la adherencia de las bacterias a las células epiteliales. Además, las células implicadas en la respuesta inmune innata producen mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias, como TNF α , IL-1 β , IL12 e IL23 y factores quimiotácticos. Existe una expansión de las poblaciones de linfocitos T efectoras que a su vez inducen una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos, que tienen como consecuencia una respuesta inflamatoria no controlada que acaba por lesionar la mucosa intestinal.

El sistema endocannabinoide (SE) es un sistema endógeno y ubicuo, por lo que sus componentes también se expresan en el tracto gastrointestinal y han sido implicados

en numerosos procesos fisiológicos gastrointestinales. Estudios previos en pacientes con EII y modelos experimentales de colitis en animales, han demostrado que el SE favorece la disminución de la motilidad e hipersensibilidad intestinal y los mecanismos de reparación epitelial. Tiene además un papel inmunomodulador, fundamentalmente a través de la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de linfocitos T efectores y macrófagos.

Modelos experimentales murinos de colitis han observado un aumento de los niveles de endocannabinoides como respuesta a la inflamación. Además, la utilización de fármacos que bloquean los inhibidores de los enzimas de degradación de endocannabinoides tiene como consecuencia una disminución de la motilidad intestinal y del daño epitelial.

Por lo tanto, las modificaciones de la expresión de los diferentes componentes del SE durante la inflamación y su posible papel protector mediante la disminución de la motilidad intestinal, su participación en los mecanismos de reparación epitelial y la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias, hacen interesante el estudio de su comportamiento en condiciones normales y en pacientes con EII.

La Haptoglobina (Hp) es una proteína reactante de fase aguda que, además de desempeñar un papel protector durante la hemólisis, tiene un papel regulador importante en los mecanismos de la inmunidad, tanto innata como adaptativa. Estudios previos *in vitro* y en modelos animales han evidenciado su papel en la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias y factores quimiotácticos, en la inhibición de la adhesión y migración de linfocitos, y en la modificación del balance Th1-Th2-Th17.

Además, modelos experimentales animales de otras enfermedades de base inmunológica, como la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) y la Diabetes Mellitus (DM), han demostrado que la ausencia del gen de la Hp predispone al desarrollo de formas más graves de estas enfermedades.

Así pues, existen evidencias sobre el papel inmunomodulador y protector de la Hp tanto en procesos inflamatorios *in vitro* como en otras enfermedades de base inmunológica, que comparten mecanismos fisiopatológicos con la EII. Todo ello, junto con la presencia de resultados contradictorios en la EII, hacen que sea interesante profundizar en la caracterización del papel genético y funcional de la Hp en la EII.

7.2 Sistema Endocannabinoide

7.2.1 Introducción

La planta del cáñamo o Cannabis sativa contiene más de 420 compuestos químicos, de los que 60 son hidrocarburos aromáticos exclusivos de esta especie vegetal y se denominan cannabinoides. Entre ellos se encuentran: Δ -9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC), principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta; el cannabidiol (CBD), precursor del THC, que se encuentra en mayor proporción en el hachís, y no posee propiedades psicoactivas, pese a que se postula que potencia los efectos del Δ 9-THC; o el cannabinol (CBN), que se forma espontáneamente desde el Δ 9-THC. Además, se han identificado otros cannabinoides, entre ellos, Δ -8-tetrahidrocannabinol (Δ 8-THC), con similares propiedades que el Δ 9-THC, cannabigerol (CBG), cannabicrómeno (CBC), cannabiciol (CBL), cannabielsoina, cannabiodiol (CBDL) o cannabitriol (CBTL)⁴².

Existen múltiples referencias sobre su utilización en la medicina popular desde hace más de 4.000 años, tanto por sus efectos psicoactivos como por su acción sobre la estimulación del apetito, inhibición de la emesis y disminución de la motilidad intestinal.

El SE es un sistema endógeno que regula múltiples funciones del organismo de los vertebrados. Se han identificado dos receptores transmembrana específicos, CB1 y CB2, que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G, a través de los que los cannabinoides ejercen su efecto⁴³.

- Los receptores tipo I o CB1 se expresan fundamentalmente en el sistema nervioso central y periférico, aunque también se ha identificado en otros tejidos como el hepático, cardíaco, adiposo y vascular. En el tracto gastrointestinal se localizan principalmente en plexos mientérico y submucoso, lo que sugiere su implicación en la inhibición del peristaltismo y en la contracción gastrointestinal⁴⁴.

- Los receptores tipo II o CB2 se localizan fundamentalmente en bazo, timo, órganos linfáticos, y en diferentes células inmunes, por lo que se cree que este sistema puede tener un papel inmunomodulador. Estos receptores se expresan sobre todo en los linfocitos B, y moderadamente en monocitos y neutrófilos. Recientemente se han aislado receptores CB2 en células de la microglía que representan el sistema mononuclear fagocítico del sistema nervioso central^{45,46}.

Los endocannabinoides pueden interactuar además con otros tipos de receptores como los receptores vanilloides, opioides y serotoninérgicos⁴³.

Pero el SE incluye, además, a los agonistas de estos receptores, que son ligandos endógenos denominados endocannabinoides. Son compuestos derivados del ácido araquidónico conjugado con etanolamida o glicerol: la etanolamida del ácido araquidónico o anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). La N-palmitoil-etanolamina (PEA), se considera un subtipo particular de endocannabinoide, ya que se produce e inactiva en las células y ejerce acciones biológicas relacionadas con la inhibición de la inflamación, aunque no está claro a través de qué tipo de receptor cannabinoide actúa⁴².

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides no se almacenan en forma de vesículas, si no que son sintetizados a demanda a partir de precursores fosfolipídicos presentes en la membrana celular. Rápidamente son inactivados, primero por un transportador de membrana y posteriormente hidrolizados por enzimas intracelulares específicos: la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) en el caso de la AEA, y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) para el 2-AG^{47,48}.

Tras el acoplamiento de los endocannabinoides a los receptores-proteína G de membrana, las tres subunidades del receptor se disocian en dos grupos:

la subunidad $\beta\gamma$, que se acopla a otros efectores como canales de potasio y Ca^{2+} . Estas acciones modulan la liberación de transmisores en la neurona presináptica y disminuyen la excitabilidad celular⁴⁹.

la subunidad α , que se acopla a la adenil-ciclasa, que cataliza la conversión de ATP en cAMP o a la Fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidil inositol que se disocia en diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP)⁵⁰.

Todas estas modificaciones en los segundos mensajeros intracelulares (AMPc, inositoles fosfato y calcio, ceramidas) activan nuevos enzimas y proteínas, iniciando mecanismos de transducción y amplificación de la señal (proteín- quinasas activadas por mitógenos, quinasas PI3K/PDK/PKBa, óxido nítrico sintetasa, y fosfolipasa D y A2)⁴⁹.

7.2.2 Endocannabinoides, tracto gastrointestinal e inflamación.

El SE está presente en el sistema nervioso entérico y tiene un importante papel en la fisiología del tracto gastrointestinal, aunque sus mecanismos de acción celular son todavía poco conocidos. Está implicado en la regulación de la motilidad intestinal, el retraso del vaciamiento gástrico, la inhibición de la secreción gástrica y tiene además un papel inmunomodulador.

Los receptores CB1 se encuentran fundamentalmente en plexos mientérico y submucoso, fundamentalmente en neuronas presinápticas, en relación con la liberación de determinados neurotransmisores, como la acetilcolina (Ach). Recientemente se ha demostrado también su presencia en las células epiteliales y en los microvilli⁵¹. En el sistema nervioso entérico se expresan fundamentalmente en las neuronas presinápticas, modulando la liberación de otros neurotransmisores⁴³.

Existen varios modelos experimentales animales que evidencian el aumento de expresión de receptores CB1 en relación con la inducción de colitis^{52,53}.

Además, aquellos ratones con un déficit genético de receptor CB1 o aquellos tratados con un antagonista de CB1 (SR141716) desarrollaban colitis más graves⁵³.

Los receptores CB2 se expresan en células inmunes como macrófagos, células dendríticas y células B, y modifican tanto la producción como liberación de citoquinas⁵⁴.

En la EII intestinal los receptores CB2 están pobremente expresados en el epitelio intestinal normal, pero son muy evidentes en la membrana apical de los márgenes ulcerados. En la lámina propia se expresan en las células plasmáticas y en los macrófagos activados. Esta expresión se ve incrementada en los casos de EII intestinal, sin estar claro su significado⁵¹.

La utilización de agonistas de receptores cannabinoides CB2 en determinadas líneas celulares epiteliales de colon inhibe la formación de TNF- α , que a su vez disminuye la liberación de IL-8, lo que refuerza la hipótesis del efecto antiinflamatorio de CB2⁵⁵.

Así pues, aunque todavía no se ha determinado con claridad cuál es el papel fisiológico del SE en la homeostasis autoinmune, existen suficientes evidencias que confirman un papel preeminente en la disminución de la inflamación a través de la disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias⁵⁶.

Según sugiere el estudio de Mathison y col, los receptores CB2 también podrían estar implicados en la regulación de la motilidad intestinal. Tras la administración intraperitoneal de un lipopolisacárido (LPS), la utilización de un agonista selectivo CB2 (JWH-133) reducía el tiempo de tránsito intestinal, pero no era efectivo en el grupo control⁵⁷. Por el contrario la utilización de un agonista selectivo CB1 (ACEA, araquidonil-2-cloroetilamida) disminuía el tiempo de tránsito intestinal en el grupo control, pero no en las ratas tratadas con LPS⁵⁷. Todo ello apoya la hipótesis de una activación de los receptores CB2 como mecanismo para restablecer el tránsito intestinal normal tras el estímulo inflamatorio.

Los receptores cannabinoides y, particularmente, los receptores CB2 tienen un papel relevante en la regulación de la sensibilidad visceral en el tracto digestivo, con efecto antinociceptivo y también en la disminución de la hipersensibilidad intestinal. Sanson y col. constataron una reducción de la hipersensibilidad inducida por la distensión del colon y recto en ratones, tanto en condiciones basales y como en la colitis inducida por TNBS, a los que administraron agonistas de receptores CB1 y CB2⁵⁸. Paralelamente, Hillsey y col. demostraron una inhibición de la respuesta a la bradiquinina en neuronas mesentéricas aferentes en ratones tratados con agonistas CB2, y el bloqueo de esta inhibición tras la administración de antagonistas CB2⁵⁹.

Existen pocos estudios centrados en determinar los niveles de endocannabinoides en el tejido colónico de pacientes con CU. Darmani y col observaron un aumento significativo de PEA en las biopsias de 8 pacientes con colitis ulcerosa con respecto a tejido colónico normal⁶⁰. Posteriormente, se demostró que los niveles de anandamida estaban elevados en la mucosa de los pacientes con CU.⁶¹

Existen numerosos modelos experimentales de EII en animales que han demostrado un aumento de los niveles de endocannabinoides, o bien de la expresión de sus receptores, o bien ambos procesos de forma simultánea. Además, agonistas sintéticos de estos receptores o inhibidores de FAAH disminuyen la motilidad y el daño epitelial causados por la inflamación^{56,62}.

En resumen, los endocannabinoides y sus receptores CB1 y CB2 estarían regulados al alza en la inflamación intestinal, es decir, existiría un aumento del tono endocannabinoide como respuesta a la agresión inflamatoria. El aumento de la expresión de receptores CB1, localizados fundamentalmente en neuronas de los plexos mientérico y submucoso y en células epiteliales, conferiría protección contra el aumento de la motilidad (a través de la inhibición de la liberación de Ach en la placa motora) y el daño epitelial presentes en la inflamación intestinal. El aumento de receptores CB2, expresados por las células inmunes, fundamentalmente macrófagos, jugaría un importante papel en la inhibición de la liberación de TNF- α y de citoquinas proinflamatorias y, por lo tanto, en la recuperación de la homeostasis inmune tras el estímulo inflamatorio⁶³. (Figuras 2 y 3).

Por lo tanto, el SE tiene capacidad para responder con rapidez a la agresión inflamatoria, mediante la síntesis *de novo* de sus componentes, para contribuir al restablecimiento de la homeostasis intestinal. Así pues, el SE parece tener un papel protector en la homeostasis en la EII. Un mejor conocimiento de la distribución, mecanismos de acción y efectos del SE en el tracto gastrointestinal permitiría avanzar

en la terapéutica de aquellas enfermedades que cursan con inflamación, como es la EII⁶⁴.

Figura 2: Actividad del sistema endocannabinoide en respuesta a la agresión inflamatoria. El estímulo inflamatorio induce la liberación de endocannabinoides mediante la estimulación de las enzimas de síntesis NAPE-PLD y fosfatidil inositol fosfolipasa C específica (PLC) y de la inhibición de las enzimas inactivadoras FAAH y MAGL. Su interacción con receptores CB1, localizados fundamentalmente en los plexos mientérico y submucoso y en las células epiteliales, disminuyen la motilidad y la secreción intestinales y la lesión epitelial. A través de los receptores CB2, expresados fundamentalmente por células inmunitarias, disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias.

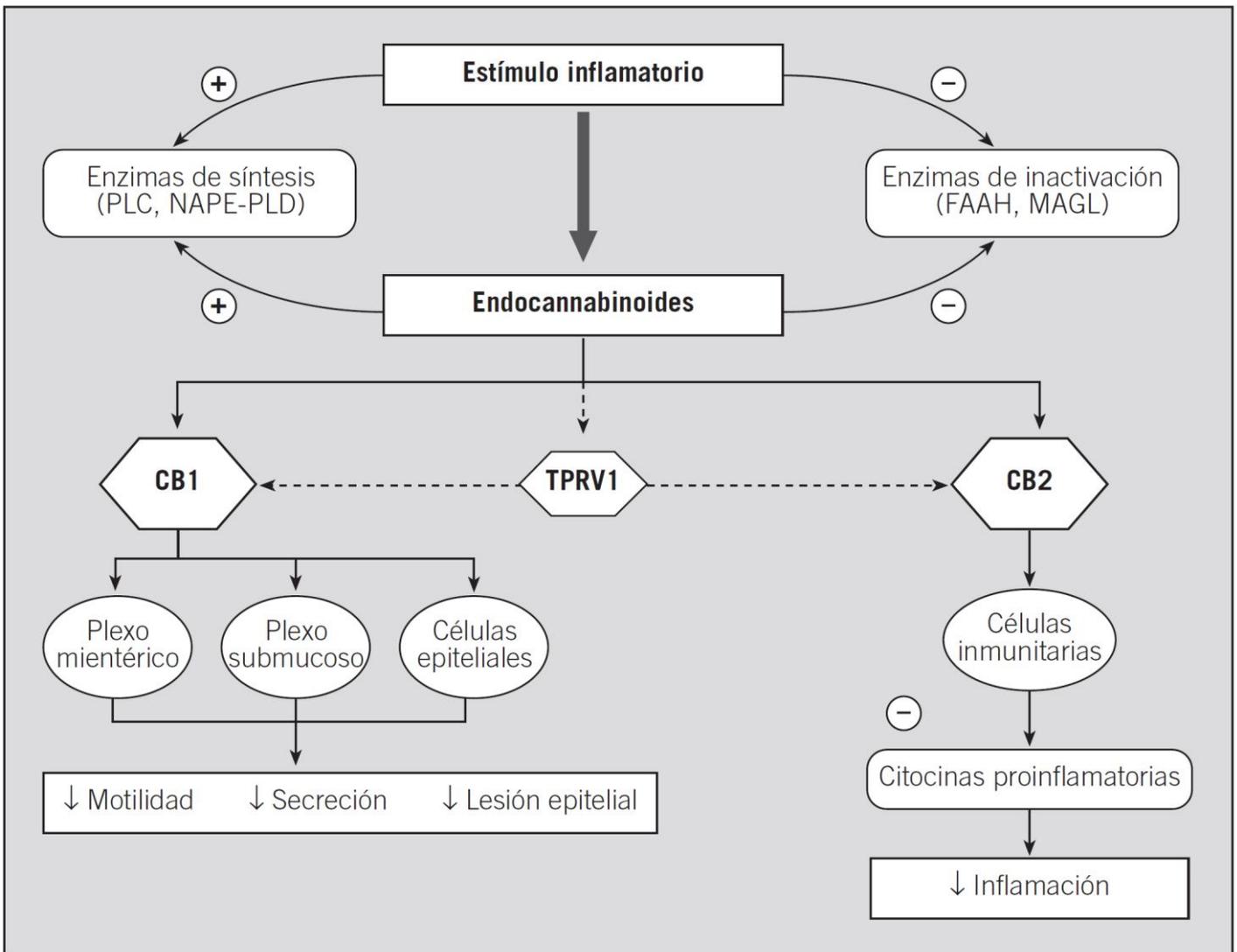
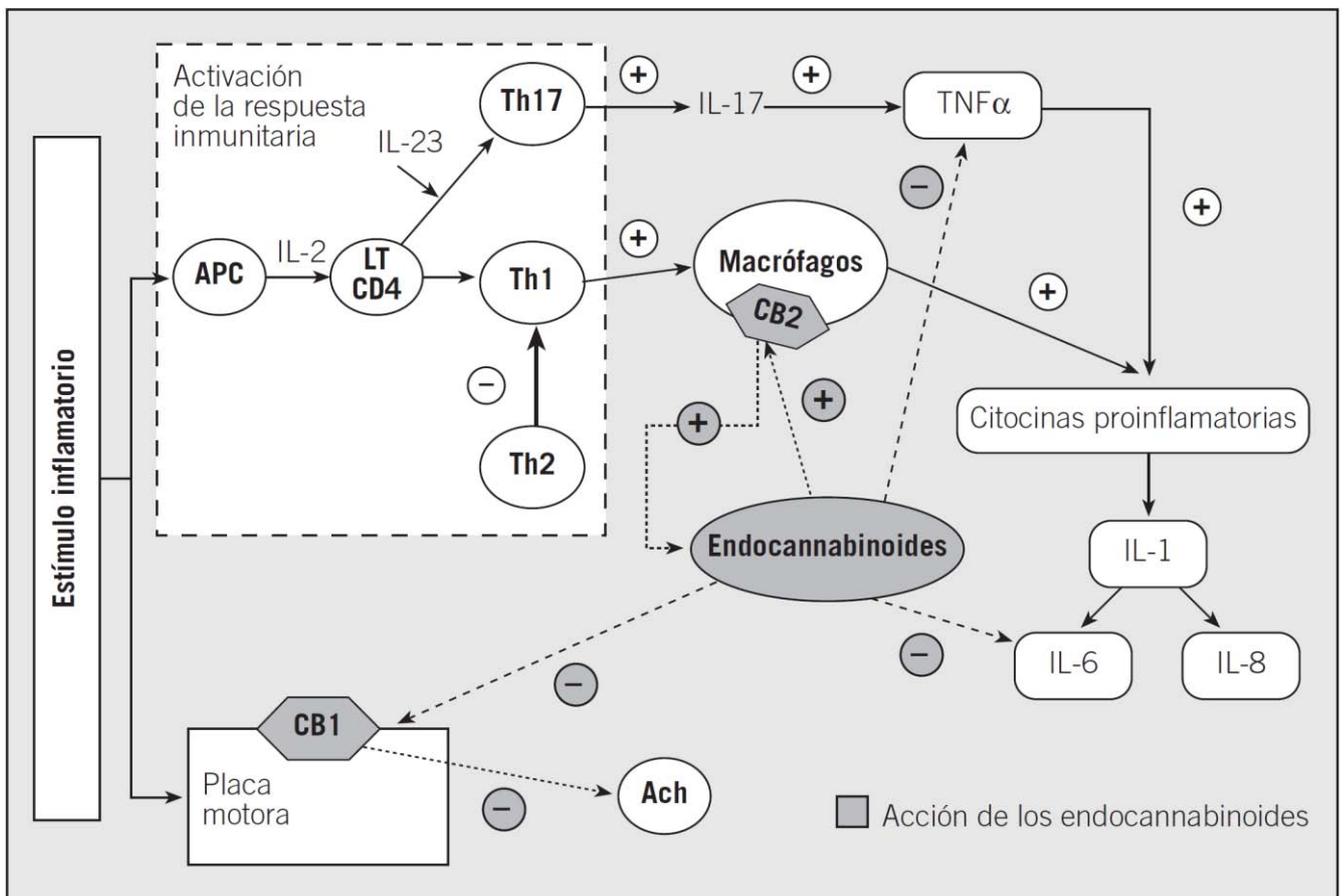


Figura 3: Posible papel de los endocannabinoides en la fisiopatología de la EII. Tras el estímulo inflamatorio se activan linfocitos Th (Th2, Th1 y Th17) que, a su vez, ya sea directamente o a través de la activación de macrófagos, estimulan la producción de TNF- α y citoquinas proinflamatorias. Los macrófagos activados producen endocannabinoides que inhibirían la producción tanto de TNF- α como de IL-8 y, a través de receptores CB2, de manera autocrina estimularían la liberación de más endocannabinoides. Además, actúan sobre receptores CB1 situados en la placa motora con lo que se produce una disminución de la liberación de Ach y, por lo tanto, de la motilidad intestinal.



7.3 HAPTOGLOBINA

7.3.1 Introducción

La Hp es una α -glicoproteína, sintetizada fundamentalmente por los hepatocitos, aunque tras un estímulo inflamatorio, puede ser sintetizada también por otros tejidos como el pulmonar, cerebral, intestinal, cutáneo,...⁶⁵

Su síntesis es estimulada fundamentalmente por IL6, IL1 y TNF⁶⁶.

Es una proteína reactante de fase aguda, con capacidad para unirse a la Hemoglobina con gran afinidad, para evitar la pérdida de hierro y la lesión renal durante la hemólisis, tanto intra como extravascular⁶⁵. Se forman complejos Hp-Hb que se unen al receptor CD163 presente en la membrana de macrófagos y monocitos y se degradan intracelularmente⁶⁶.

Tiene además propiedades inmunomoduladoras, con un papel relevante tanto en los mecanismos de respuesta inmunológica innata como adquirida^{67,68}.

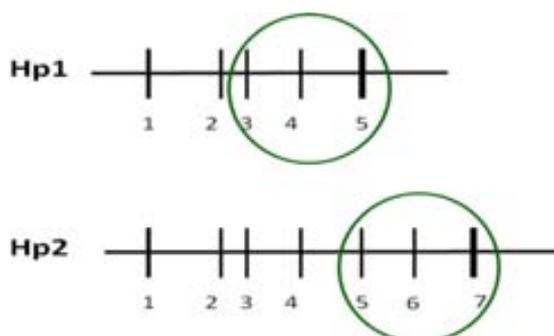
La Hp inhibe la respuesta quimiotáctica de granulocitos y la fagocitosis; disminuye la capacidad bactericida intracelular; se une a neutrófilos y bloquea la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y la formación de especies oxígeno-reactivas; y bloquea la adhesión, migración y diferenciación de monocitos⁶⁹.

Inhibe la proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 modificando el balance Th1/Th2 y , dependiendo de su concentración, modifica la proliferación de células B en respuesta a endotoxinas bacterianas⁷⁰.

El gen de la Hp está situado en el brazo largo del cromosoma 16 (Crom 16q22) en el que existe un polimorfismo con dos alelos: Hp1 y Hp2. Hp es el resultado de una duplicación intragénica de los exones 3 y 4 del alelo Hp1. (Figura 4)⁷¹.

Existen 3 genotipos: genotipo Hp11, genotipo Hp 21, genotipo Hp 22, que codifican la síntesis de tres fenotipos de Hp: Hp 11, Hp 21, Hp 22^{72,73}.

Figura 4. Alelos Hp1 y Hp 2 del gen de la Hp. Hp2 es una duplicación de los exones 3 y 4 del alelo Hp1.



A pesar de que el gen de la Hp está presente en todos los mamíferos, el polimorfismo del gen de la Hp sólo ha sido descrito en humanos⁶⁶.

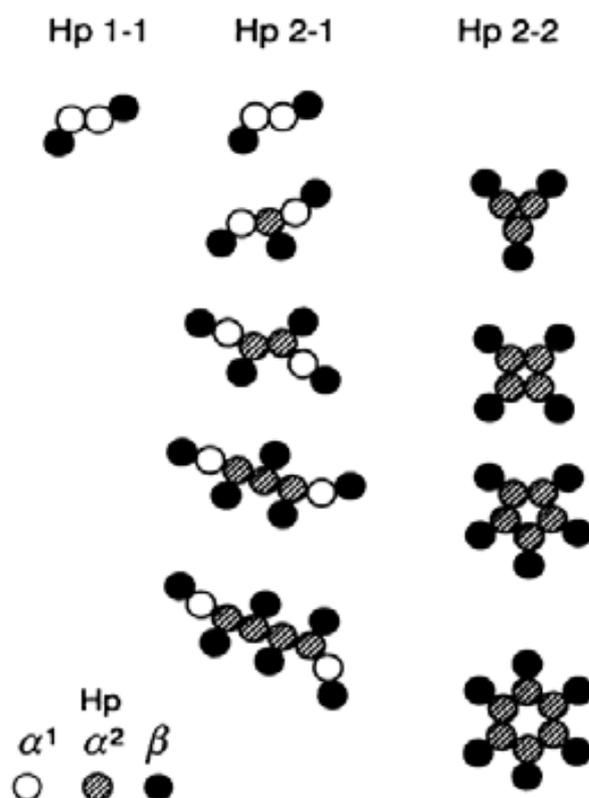
La Hp está formada por dos tipos de cadenas polipeptídicas^{72,73}:

- cadena β : común para los 3 fenotipos
- cadena α : α^1 o α^2 , que diferencia Hp11 de Hp 22.

Por lo tanto, los 3 fenotipos de Hp son (Figura 5)^{72,73}:

- Hp 11: dímeros formados por cadenas α^1 y cadenas β
- Hp 21: polímeros lineales formados por cadenas α^1/α^2 y cadenas β
- Hp 22: polímeros circulares formados por cadenas α^2 y cadenas β

Figura 5. Diferentes fenotipos de la Hp: Hp 11, Hp21, Hp 22⁷⁴.



La distribución mundial de estos alelos y genotipos es variable. En países de Europa Occidental el alelo minor es Hp1, con una frecuencia de 0.4. La distribución de los genotipos es la siguiente: genotipo Hp 11 16%, genotipo Hp 21 48%, genotipo Hp 22 36%⁶⁵.

Se han descrito algunas diferencias funcionales entre los productos proteicos de los alelos Hp1 y Hp2. Estudios in vitro han demostrado que los productos alélicos de Hp1 tienen mayor capacidad antioxidante y antiinflamatoria que los de Hp2. Además, el genotipo Hp11 induce una mayor producción de IL10 que el genotipo Hp 22^{69,70,75}.

Pero el papel funcional de este polimorfismo no está todavía bien definido ni sus mecanismos moleculares completamente aclarados.

7.3.2 Haptoglobina, respuesta inmunológica y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Dadas las propiedades inmunomoduladoras de Hp y las diferencias funcionales descritas para este polimorfismo, el gen de la Hp ha sido estudiado como un gen candidato en otras enfermedades de base inmune, como la Artritis Reumatoide, el Lupus Eritematoso Sistémico, la CEP y la DM tipo 2. En todas ellas, se ha observado una sobreexpresión del alelo 2 y del genotipo 22⁷⁶⁻⁷⁸.

Varios modelos experimentales de estas enfermedades han evidenciado un posible efecto protector de la Hp. En un modelo animal de Esclerosis Múltiple, la EAE, se ha observado que los ratones deficientes para el gen de la Hp desarrollan una encefalomiелitis mucho más severa que los que conservan el gen de la Hp⁶⁷. También modelos murinos de DM han demostrado que la ausencia del gen de la Hp predispone al desarrollo de formas más severas de DM y de más complicaciones macro y microvasculares⁷⁶.

Respecto a la EII, únicamente han sido publicados dos estudios hasta la fecha, con resultados contradictorios. En el estudio de Papp y col. se analizó el polimorfismo de la Hp en 489 pacientes con EC y los resultados se compararon con los de 384 controles sanos. Se observó que el alelo Hp1 era más frecuente en los pacientes con EC, que genotipo Hp 21 estaba asociado al patrón inflamatorio y el genotipo 22 a la asociación de EII y CEP⁷⁹. El segundo estudio, realizado por Maza y col, determinó el genotipo de 382 pacientes con EC y lo comparó con el de 3243 controles sanos. Se evidenció una menor presencia del genotipo 11 en los pacientes con EC y no fue posible establecer ninguna relación con las características clínicas de la enfermedad⁸⁰.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de nuevos mecanismos fisiopatológicos en la EII que han demostrado, en estudios *in vitro* y modelos experimentales en animales, que pueden tener un potencial papel protector en el desarrollo de la CU y la EC.

8.2 Objetivos estudio 1: Sistema Endocannabinoide y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

- Describir la expresión y localización de todos los componentes del SE en tejido colónico normal: receptores (CB1 y CB2), enzimas de síntesis (NAPE-PLD, DAGL- α y DAGL β) y enzimas de degradación (MAGL y FAAH).
- Estudiar las diferencias en la expresión de todos los componentes del SE en tejido colónico de pacientes con CU en fase activa, previa al inicio del tratamiento, y en fase quiescente.

8.3 Objetivos estudio 2: Haptoglobina y Enfermedad Inflamatoria Intestinal

- Caracterizar el polimorfismo de la Hp en pacientes con EC, CU y CEP, mediante la determinación de la distribución de los alelos Hp1 y Hp2 y de los genotipos Hp 11, Hp 21 y Hp22.
- Determinar los niveles circulantes séricos de Hp en relación con los diferentes genotipos de la Hp.
- Estudiar el efecto de la Hp en dos modelos murinos de colitis experimental: colitis inducida por DSS y OXA en ratones deficientes para el gen de la Hp.

9 PUBLICACIONES ORIGINALES

- **Márquez L**, Suárez J, Iglesias M, Bermudez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, Andreu M. Ulcerative colitis induces changes on the expression of the endocannabinoid system in the human colonic tissue. PLoS One. 2009 Sep 4; 4(9):e6893.
- **L Márquez**, C Shen , I. Cleynen, K. Machiels, C. Perrier, V. Ballet, S. Organe, M. Ferrante, L. Henckaerts, P. Rutgeerts, JL. Ceuppens and S. Vermeire. Role of Haptoglobin polymorphisms in susceptibility to IBD and in triggering murine colitis. Gut 2011.Publicado on line en Sept 2011.

Ulcerative Colitis Induces Changes on the Expression of the Endocannabinoid System in the Human Colonic Tissue

Lucia Marquéz¹*, Juan Suárez²*, Mar Iglesias³, Francisco Javier Bermudez-Silva², Fernando Rodríguez de Fonseca²†*, Montserrat Andreu¹‡

1 Department of Gastroenterology, Hospital del Mar, Universidad Autónoma, Barcelona, Spain, **2** Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS, Málaga, Spain, **3** Department of Pathology, Hospital del Mar, Universidad Autónoma, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Recent studies suggest potential roles of the endocannabinoid system in gastrointestinal inflammation. Although cannabinoid CB₂ receptor expression is increased in inflammatory disorders, the presence and function of the remaining proteins of the endocannabinoid system in the colonic tissue is not well characterized.

Methodology: Cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, the enzymes for endocannabinoid biosynthesis DAGL α , DAGL β and NAPE-PLD, and the endocannabinoid-degradating enzymes FAAH and MAGL were analysed in both acute untreated active ulcerative pancolitis and treated quiescent patients in comparison with healthy human colonic tissue by immunocytochemistry. Analyses were carried out according to clinical criteria, taking into account the severity at onset and treatment received.

Principal Findings: Western blot and immunocytochemistry indicated that the endocannabinoid system is present in the colonic tissue, but it shows a differential distribution in epithelium, lamina propria, smooth muscle and enteric plexi. Quantification of epithelial immunoreactivity showed an increase of CB₂ receptor, DAGL α and MAGL expression, mainly in mild and moderate pancolitis patients. In contrast, NAPE-PLD expression decreased in moderate and severe pancolitis patients. During quiescent pancolitis, CB₁, CB₂ and DAGL α expression dropped, while NAPE-PLD expression rose, mainly in patients treated with 5-ASA or 5-ASA+corticosteroids. The number of immune cells containing MAGL and FAAH in the lamina propria increased in acute pancolitis patients, but dropped after treatment.

Conclusions: Endocannabinoids signaling pathway, through CB₂ receptor, may reduce colitis-associated inflammation suggesting a potential drugable target for the treatment of inflammatory bowel diseases.

Citation: Marquéz L, Suárez J, Iglesias M, Bermudez-Silva FJ, Rodríguez de Fonseca F, et al. (2009) Ulcerative Colitis Induces Changes on the Expression of the Endocannabinoid System in the Human Colonic Tissue. PLoS ONE 4(9): e6893. doi:10.1371/journal.pone.0006893

Editor: Stefan Bereswill, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

Received: July 24, 2009; **Accepted:** August 4, 2009; **Published:** September 4, 2009

Copyright: © 2009 Marquéz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by FIS07/0880 and FIS07/1226; Proyectos de Excelencia, Consejería de Innovación de la Junta de Andalucía; Marato TV3 2005/060; RTICS RD 06/001; Beca Iniciación a la Recerca 2008. Societat Catalana Digestologia. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fernando.rodriguez@fundacionimabis.org

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

The endocannabinoid system (ECS) has been described in the gastrointestinal tract in the epithelial, immune and neural compartments. It is involved in many physiological and physiopathological actions (peristalsis/contraction, secretion, gastric emptying, emesis, satiety and immunomodulation/inflammation and pain).[1–6] ECS roles comprise main facets of the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease (IBD) in humans, a disease that is likely to result from multiple factors, especially a dysregulation of intestinal immune system and an inappropriate response to commensal bacteria or other luminal antigens.[7–9]

Components of ECS include cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, their endogenous lipid ligands (2-arachidonyl glycerol 2-AG;

anandamide - AEA) and enzymes involved in their biosynthesis and release (DAGL α and DAGL β for 2-AG; NAPE-PLD for AEA)[10–15], as well as mechanisms for cellular uptake and degradation, such as fatty acid amide hydrolase (FAAH) for AEA and monoacylglycerol lipase (MAGL) for 2-AG.[16,17] The role of endocannabinoids and its derivatives in IBD is not completely known[18–22], although cannabinoid CB₁ receptors have been proposed to participate in the epithelial wound healing during intestinal inflammation.[1–4,20] Additionally, cannabinoid CB₂ receptors are expressed in intestinal lamina propria suggesting a role in immunomodulation.[19,20,22]

Data from animal model and human studies have suggested an upregulation of the ECS in inflammation processes either by increased receptor expression or by an enhancement of endocannabinoid

production.[23–27] Treatment with CB₁ agonists, FAAH antagonists, inhibitors of endocannabinoid membrane transport, or genetic ablation of FAAH reduced inflammation.[23,25,28] Additionally, cannabinoid CB₂ agonists cause inhibition of proinflammatory cytokines such as tumoral necrosis factor alpha (TNF α) and IL8.[29] Thus, ECS is positioned to exert a protective role in many of the points where homeostasis breaks in IBD, although this antiinflammatory role of the ECS remains to be conclusively determined in humans.[25,30]

The aim of the present study is to analyse, by immunocytochemistry, the expression of components of the endocannabinoid system such as cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors and the enzymes involved in cannabinoid degradation (FAAH and MAGL) and biosynthesis (DAGL α , DAGL β and NAPE-PLD), in normal human colonic tissue in comparison with untreated active ulcerative pancolitis at disease onset and after achieving remission, according to clinic and endoscopic criteria, and depending on severity of flare and treatment received.

Methods

Ethics statement

Biopsies and colonic resection samples were obtained after a written inform consent from all the patients, as requested by the clinical guides of Hospital del Mar. Research procedures were approved by the Hospital del Mar Clinical Research and Ethics Committee and were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Subjects

Human colonic endoscopic biopsies were selected from 24 patients with a first ever flare of extensive Ulcerative Colitis (UC) diagnosed by clinical, endoscopic and pathological criteria (E3, Montreal classification).[31] In each patient rectal mucosal samples were obtained at onset, at first colonoscopy, before any treatment (acute group) and after achieving clinical (Truelove and Witts score <6 points)[32] and endoscopic remission (Mayo clinic score 0)[33], (quiescent group).

Twenty-two rectal samples were removed from colonic tissue of patients underwent colonic resections for colorectal cancer, at least 10 cm from the tumour (control group). In the control group, we confirmed histopathologically the absence of microscopic alterations. The analysis of the immunostaining patterns was carried out at transmural planes of the normal colonic tissue by comparing it with H&E staining.

Colonic samples were retrieved from tissue bank of Pathology Service at the Hospital del Mar from Barcelona, Spain. Data from each patient were collected retrospectively from medical records including age, sex, smoke and alcohol history, Body Mass Index (BMI) and comorbidity. In UC patients we recorded date of diagnosis, disease location (Montreal classification), endoscopic (Mayo clinic score) and clinical score (Truelove and Witts score: mild, moderate and severe) at onset, histological features and treatments received since initial diagnostic (5-aminosalicylates (5-ASA); corticosteroids; and/or the immunomodulators (CyclosporineA and/or Azathioprine). Table 1 shows some of these records that characterize each UC patients.

Immunohistochemistry

We analyzed the distribution of CB₁ and CB₂ receptors, FAAH, MAGL, DAGL α , DAGL β , and NAPE-PLD in the normal colonic tissue and in the acute and quiescent UC mucosa by immunohistochemistry, following methods previously described[34,35]. Tissue blocks were fixed in 4% (w/v) buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Blocks were cut into longitudinal 5- μ m-thick sections using a Microm HM325 microtome (MICROM,

Walldorf, Germany). Sections were mounted on glass slides with the positively charged surface (DAKO Real, ref. S2024, Glostrup, Germany) and air-dried. After the sections were dewaxed, antigen retrieval was achieved through incubating in H₂O₂ containing 50 mM sodium citrate (pH 9) for 15 minutes at 80°C, followed by washes in 0,1M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Then incubation in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 20 minutes was achieved to inactivate the endogenous peroxidase. Later, sections were blocked in 10% donkey serum in PBS and 0.1% NaN₃ for 1 hour, and incubated overnight at room temperature with the following antibodies³⁴: anti-CB₁ receptor (diluted 1:100; ABR, cat. no. PA1-745, lot. no. 424-121); anti-CB₂ receptor (diluted 1:100; ABR, cat. no. PA1-746A, lot. no. 452-114); anti-FAAH (diluted 1:100; Cayman, cat. no. 101600, lot. no. 157878); anti-MAGL (diluted 1:100; Cayman, cat. no. 100035, lot. no. 163084); anti-NAPE-PLD, diluted 1:100; anti-DAGL α , diluted 1:50; and anti-DAGL β , diluted 1:50 (supporting information S1). Then, the sections were incubated in a biotinylated donkey anti-rabbit immunoglobulin (Amersham) diluted 1:500 for 1 hour, and incubated in ExtrAvidin peroxidase (Sigma) diluted 1:2000 for 1 hour. We revealed immunolabeling with 0.05% diaminobenzidine (DAB; Sigma), 0.05% nickel ammonium sulphate, and 0.03% H₂O₂ in PBS. All steps were carried out in PBS with gently agitation at room temperature. Sections were dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with Eukitt mounting medium (Kindler GmbH and Co., Freiburg, Germany).

Digital high-resolution microphotographs were taken under the same conditions of light and brightness/contrast by an Olympus BX41 microscope equipped with an Olympus DP70 digital camera (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany). Digital images were mounted and labelled using Adobe PageMaker (San Jose, CA, USA).

Western blotting

We collected prospectively 8 rectal samples of control patients underwent colonic resection biopsies, processed as previously described [34,35], to evaluated the presence of CB₁ and CB₂ receptors, FAAH, MAGL, DAGL α , DAGL β and NAPE-PLD by Western blotting. Samples from were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Membrane extracts of colon tissue were prepared in HEPES 50 mM (pH 8)-sucrose 0.32 M buffer by using a homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800 xg for 10 minutes at 4°C and the supernatant was centrifuged at 40000 xg for 30 minutes. The pellet was suspended in HEPES 50 mM buffer and potterized using a homogenizer.

For immunoblotting, equivalent amounts of membrane proteins (20 μ g) were separated by 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), electroblotted onto nitrocellulose membranes, and controlled by Ponceau red staining. Blots were preincubated with a blocking buffer containing PBS, 0.1% Tween 20 and 2% albumin fraction V from bovine serum (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) for 1 h at room temperature. For protein detection, each blotted membrane lane was incubated separately with the specific CB₁ (1:250), CB₂ (1:300), FAAH (1:200), MAGL (1:200), DAGL α (1:200), DAGL β (1:200) and NAPE-PLD (1:100) antibodies, diluted in the blocking buffer, overnight at 4°C. After extensive washing in PBS containing 1% Tween 20 (PBS-T), a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Promega, Madison, WI, USA) was added (1:10000) for 1 h at room temperature. Biotinylated marker proteins with defined molecular weights were used for molecular weight determination in Western blots (ECLTM Western Blotting Molecular Weight Markers, Amersham/GE

Table 1. Clinical characteristics of UC patients¹.

Patient UC N°	Age	Sex	Smoker	BMI	Clinic Score	Endosc. Score	Histol. Score	UC Treatment
1	35	W	No	24,97	Moderate	2	Mild	5-ASA + cortic
2	29	W	No	26,1	Moderate	2	Moderate-Severe	5-ASA + cortic + IMM
3	29	M	15 cig/day	21,88	Severe	3	Moderate	5-ASA + cortic + IMM
4	28	M	Smoker	30,86	Moderate	2	Moderate	5-ASA + cortic
5	46	M	30 cig/day	28	Moderate	3	Severe	5- ASA + cortic
6	38	W	No	23,87	Mild	1	Severe	5-ASA
7	69	M	Ex-smoker	22	Mild	1	Mild	5-ASA + cortic
8	20	M	No	22,98	Severe	2	Mild	5-ASA + cortic + IMM
9	23	M	No	25,01	Moderate	2	Moderate	5-ASA + cortic + IMM
10	26	W	6 cig/day	23,42	Severe	3	Moderate-Severe	5-ASA + cortic
11	37	M	No	22	Mild	1	Mild	5-ASA
12	48	M	No	21,24	Moderate	2	Severe	5-ASA + cortic
13	34	M	Ex-smoker	22,86	Severe	2	Severe	5-ASA + cortic
14	61	M	Ex-smoker	23,26	Severe	2	Mild-moderate	5-ASA + cortic
15	28	W	No	23,05	Mild	2	Moderate	5-ASA
16	26	M	No	24,3	Moderate	2	Mild	5-ASA + cortic
17	39	M	No	22,52	Moderate	2	Mild	5-ASA + cortic
18	17	M	Smoker	22,53	Moderate	2	Severe	5-ASA + cortic
19	62	M	4 cig/day	25,27	Moderate	3	Mild	5-ASA + cortic
20	30	M	No	22,86	Moderate	2	Severe	Cortic + AZA
21	42	W	No	27,34	Mild	2	Severe	5-ASA + cortic
22	73	M	20 cig/day	26,95	Moderate	2	Mild	5-ASA + cortic
23	44	M	Ex-smoker	23,98	Moderate	2	Severe	5-ASA + cortic + IMM
24	62	W	No	24,22	Mild	2	Moderate	5-ASA + cortic

¹Data from each patient were collected retrospectively from medical records including age, sex, smoke history, Body Index Mass (BMI), endoscopic (Mayo clinic score) and clinical score (Truelove and Witts score: mild, moderate and severe) at onset, histological features and treatments received since initial diagnostic (5-aminosalicylates, 5-ASA; corticosteroids; and/or the immunomodulators, IMM, Cyclosporine A and/or Azathioprine). doi:10.1371/journal.pone.0006893.t001

Healthcare, Buckinghamshire, UK). Membranes were subjected to repeated washing in PBS-T and the specific protein bands were visualized using the enhanced chemiluminescence technique (ECL, Amersham) and Auto-Biochemi™ Imaging System (LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg/Bodensee, Germany). Western Blots showed that each primary antibody detects a protein of the expected molecular size.

As controls, we incubated blotted membrane lanes with the primary antibody preadsorbed with the immunizing peptides (Table 2): CB₁ and CB₂ (both at 20 µg/ml; kindly donated by Dr. K. Mackie), FAAH (10 µg/ml; Cayman, lot. no. 301600), MAGL (5 µg/ml; Cayman, lot. no. 300014), DAGL α , DAGL β and NAPE-PLD (25 µg/ml, 100 µg/ml and 25 µg/ml respectively; JPT, Berlin, Germany). We did not detect staining under these conditions.

Quantification of mucosa immunostaining

One immunostaining batch contained 70 tissue sections of all experimental groups, thus slices corresponding to the three experimental groups were stained simultaneously. For each primary antibody and for each subject, 2–3 different batches were run. On each tissue section we focussed on epithelium and lamina propria of the mucosa. For epithelium, we carried out a densitometrical quantification for each component of the ECS. For lamina propria, we evaluated the type and the number of immunostained immune cells for each 100 cells observed by hematoxylin-eosin (H&E)

staining. In addition, ECS quantification was segregated depending on UC severity scored to mild, moderate and severe (Truelove and Witts score), and by the treatment received (5-ASA, corticosteroids, and/or the immunomodulators).

Digital high-resolution microphotographs were taken with the 10× objective of an Olympus BX41 microscope under the same

Table 2. Immunizing peptides used in this study.

Proteins	Peptides sequences	GenPept accession number
CB₁	MKSILDGLADTTFRITIT TDLLYVGSNDIQYEDIK GDMASKLGYFPQKFLPT SFRGSPFQEKMTA GDNSPLVPAGDTT	NP_036916.1
CB₂	MAGCRELELTNGSNGG LEFNPMKEYMILSDAQ	NP_065418.2
NAPE-PLD	MDENSCDKAFEET	NP_955413.1
DAGLα	CGASPTKQDDLVISAR	NP_001005886.1
DAGLβ	SSDSPLDSPTKYPTLC	NP_001100590.1
FAAH	CLRFMREVEQLMTPQKQPS	NP_077046.1
MAGL	SSPRRTPQNVPPYQDL	Q8R431.1

doi:10.1371/journal.pone.0006893.t002

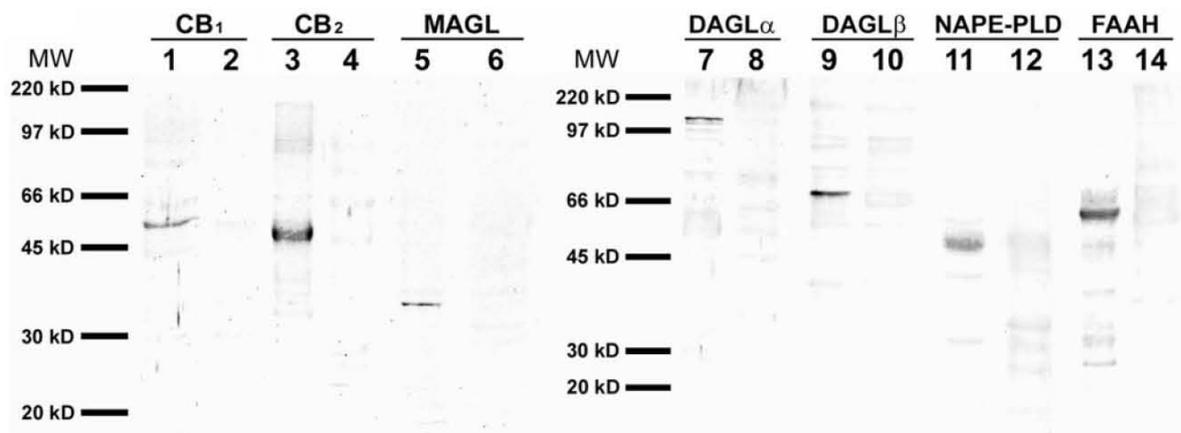


Figure 1. Western blots of membrane extracts from human colonic tissue. They showed prominent immunoreactive bands of the expected size for the ECS proteins. See text. Positions of molecular markers (MW) are indicated at the left.
doi:10.1371/journal.pone.0006893.g001

conditions of light and brightness/contrast. Quantification of immunostaining was carried out by measuring densitometry of the selected areas using the analysis software ImageJ 1.38x (Rasband, W.S., ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 15.0 software (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, Illinois, USA). Results are expressed as mean ± SEM. Differences between groups were evaluated using U Mann Witney and Wilcoxon tests for non parametric observations. A P value of P<0.05 was considered statistically significant.

Results

Presence of the endocannabinoid system in the normal human colonic tissue: Western blot analysis

Western blot analysis of membrane proteins from normal human colon tissue revealed the presence of all ECS proteins studied. They appeared as prominent bands of 53 kD for CB1, (fig. 1, lane 1), 50 kD for CB2 (fig. 1, lane 3), 35 kD for MAGL (fig. 1, lane 5), 120 and 73 kD for DAGLα and DAGLβ respectively (fig. 1, lanes 7 and 9), and 46 and 63 kD for NAPE-

PLD and FAAH respectively (fig. 1, lanes 11 and 13). In each case, the immunoreactive bands were abolished after adsorption with the immunizing peptides (fig. 1, lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14).

Immunohistochemical distribution of the endocannabinoid system in the normal human colonic tissue

Results for the immunohistochemical distribution were summarized in a rating scale (Table 3). Intense CB1 immunoreactivity is showed in the epithelial cells of the crypts (C), being prominent in the absorptive cells, mainly on the apical surface facing the lumen (fig. 2D, E, arrows). We observe CB1 immunoreactivity in some plasma cells of the lamina propria (LP; fig. 2E, inset). A low/moderate staining was detected in the muscularis mucosae (MM), including the smooth muscle of the blood vessels, but intensely staining characterized inner circular (CSM) and outer longitudinal (LSM) smooth muscle layers (fig. 2D, F). Of note, the varicose aspect of CB1 immunoreactivity on the muscle cells that probably consist of nerve terminals (fig. 2F, inset). We observed faintly immunostaining in the parasympathetic nervous cells of both Meissner's and myenteric plexi (MP), except of some scattered fibers (fig. 2F). Some CB1+ connective cells were also detected in the serosa layer.

CB2 immunoreactivity was detected in the colonic epithelium of both absorptive and goblet cells (fig. 2H). Of note, a stronger CB2

Table 3. Immunoreactivity of endocannabinoid system in normal colonic tissue (n=22)¹.

	Epithelium Glands	Lamina propria	Smooth muscle	Myenteric plexus
CB ₁	+++		++	
CB ₂	+++	+	+	++++
FAAH	++	++		++++
MAGL	++	++		++
NAPE-PLD	+++	++	+++	
DAGL _α	+++	++	++++	++
DAGL _β	++++	++	+++	++++

¹Gray-scale values measured in single epithelium, lamina propria, muscular layers and plexi are represented on an arbitrary rating scale of the immunoreactivity of each structure. Symbols are as follows: very high (++++), high (+++), low (++) and without immunoreactivity ().
doi:10.1371/journal.pone.0006893.t003

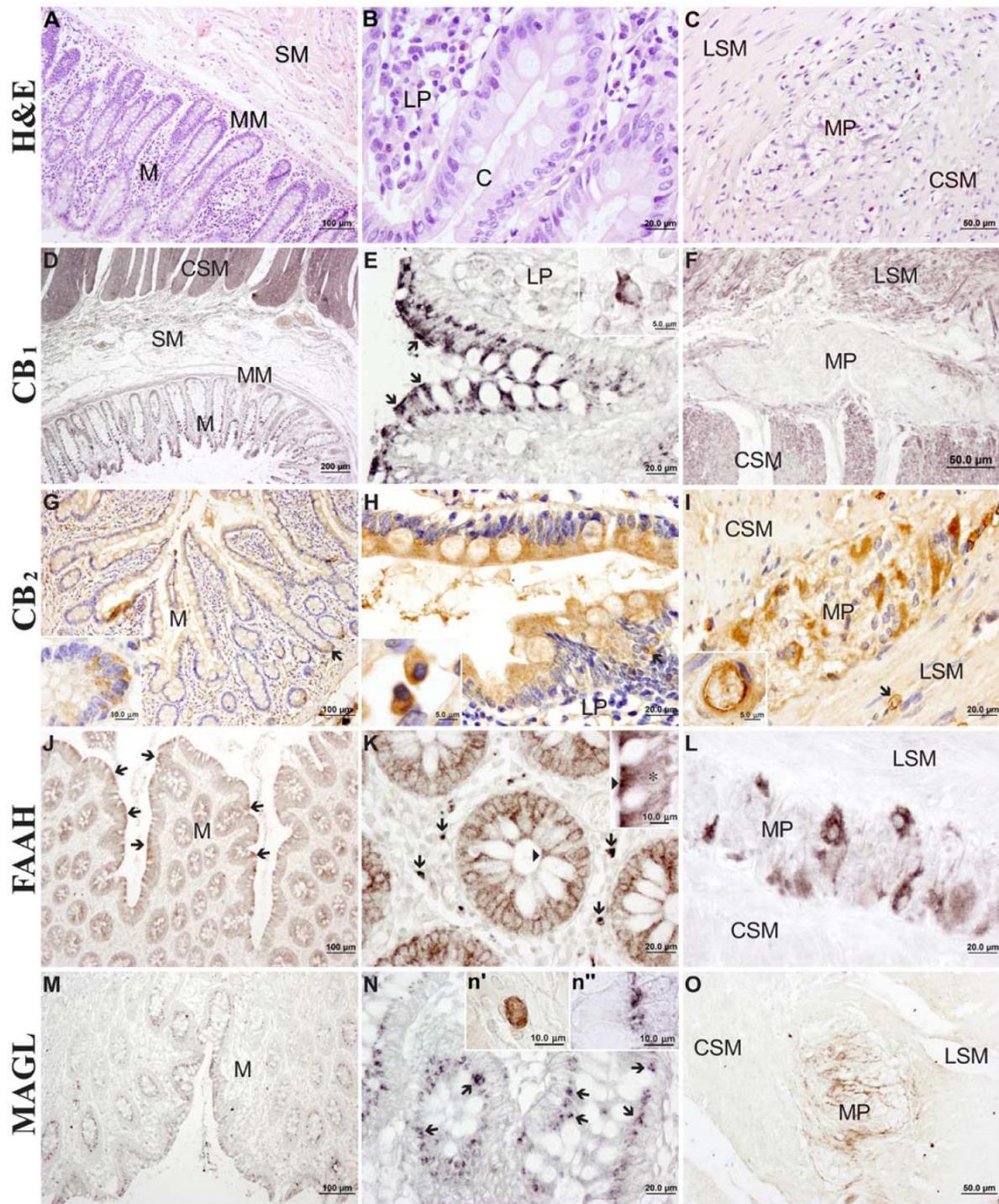


Figure 2. Immunohistochemistry for CB₁ and CB₂ receptors, FAAH and MAGL in human colonic tissue. Morphology of normal human colon, stained with H&E (A–C). General views of transverse sections through the colon (A, D, G, J, M). High-magnification photomicrographs of the colonic epithelium and lamina propria (B, E, H, K, N), smooth muscle and myenteric plexus (C, F, I, L, O). *Abbreviations:* C, crypt; CSM, circular smooth muscle; LP, lamina propria; LSM, longitudinal smooth muscle; M, mucosa; MM, muscularis mucosae, MP, myenteric plexus; SM, submucosa. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g002

immunoreactivity in the Paneth cells, at the bottom of the crypts, than in the remaining colonic epithelium (fig. 2G inset). A number of subepithelial CB₂⁺ plasma cells and probably some macrophages were detected in the lamina propria (fig. 2H arrow, inset). We also observed weak CB₂ immunoreactivity in the muscularis mucosae and muscularis externa whereas intense staining was located in the endothelial cells of the blood vessels (fig. 2I arrow, inset). Numerous CB₂⁺ ganglion cells and fibers were evident in the myenteric plexus (fig. 2I) and the submucosal plexi.

FAAH immunostaining disposed in the epithelial cells, being prominent in the apical one third and perinuclear portions of the absorptive cells (fig. 2J, K inset, asterisk). The brush border of the microvilli was nearly absent of staining (fig. 2K inset, arrowheads). We detected few scattered FAAH⁺ immune plasma cells in the lamina propria. No staining was observed neither in the muscularis mucosae, muscularis externa or serosa, whereas intense staining was observed in some ganglion cells and fibers of the myenteric plexus (fig. 2L).

MAGL immunoreactivity was located in the central portion of the epithelial cells, thus, apical to the nucleus of the absorptive cells and basal to the mucus droplets of the goblet cells (fig. 2M, N, inset n^o). A number of immunoreactive polymorphonuclear cells was distinguished in the lamina propria (fig. 2N, inset n^o). No staining

was detected in both muscularis mucosae and externa. The myenteric plexus was characterized by a meshwork of MAGL⁺ fibers that disposed surrounding unstained parasympathetic nervous cells (fig. 2O).

Strong NAPE-PLD immunoreactivity in the apical surface of the epithelial border of the crypts (fig. 3A) and numerous positive plasma cells was observed (fig. 3B, inset). Intense NAPE-PLD immunostaining characterized both layers of muscularis externa (fig. 3C). Numerous immunoreactive fibers, but not cell bodies, disposed in the myenteric plexus (fig. 3C).

We observed a similar DAGL α staining pattern in the colonic tissue to that of CB₁ and NAPE-PLD proteins (fig. 3D). An intense immunoreactivity characterized the apical surface of epithelial border facing to lumen (arrows in fig. 3E, inset e^o). We observed some DAGL α ⁺ plasma cells in the lamina propria (fig. 3E, inset e^o). Muscularis mucosae and externa showed an intense DAGL α immunoreactivity (fig. 3F) in a similar granular aspect to that of CB₁ immunoreactivity. Numerous DAGL α ⁺ fibers disposed surrounding unstained ganglion cells in the myenteric plexus (fig. 3F, inset).

Intense DAGL β expression was mainly located surrounding the nucleus of the epithelial cells (fig. 3G, H, inset h^o). A number of scattered plasma cells also showed intense DAGL β staining

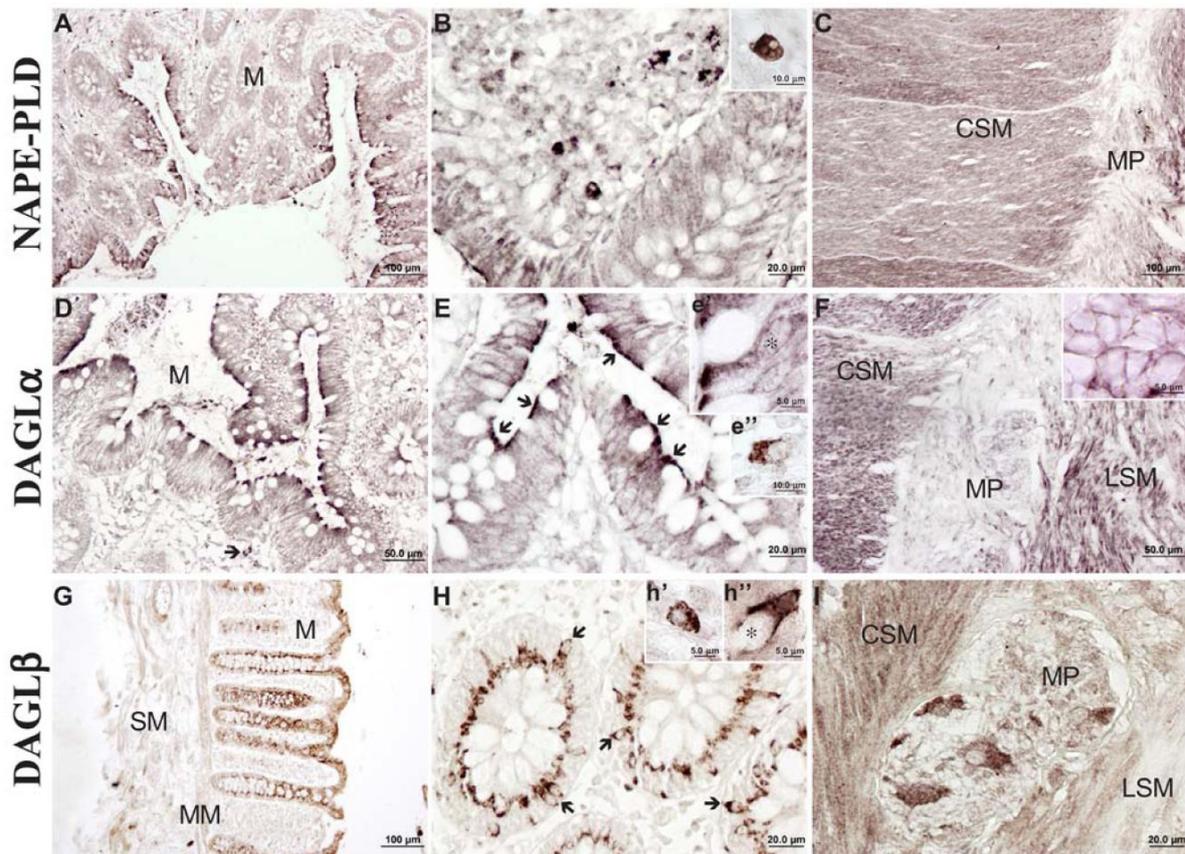


Figure 3. Immunohistochemistry for NAPE-PLD, DAGL α and DAGL β in human colonic tissue. General views of transmural sections through the colon (A, D, G). High-magnification photomicrographs of the colonic epithelium and lamina propria (B, E, H), smooth muscle and myenteric plexus (C, F, I). doi:10.1371/journal.pone.0006893.g003

(fig. 3H, inset h'). Muscularis mucosae appeared positive, but strongly DAGL β expression was evident in both layers of the muscularis externa, mainly in the inner one (fig. 3I). The myenteric plexus was characterized by strongly DAGL β + ganglion cells and a dense fibre network (fig. 3I).

Densitometrical quantification of ECS immunoreactivity in the colonic epithelium

Microphotographs showing qualitative differences of the immunoreactivity for each ECS component in the epithelium of control, acute and quiescent groups are shown in figure 4.

Quantification of epithelial immunoreactivity for ECS components is shown in figure 5. CB $_1$ expression was maintained in acute group [49.18 \pm 1.44 vs 49.37 \pm 1.62 ($\times 10^3$)] but, in quiescent group, was lower than in control one [44.75 \pm 1.22 vs 49.18 \pm 1.44 ($\times 10^3$); $p < 0.001$], as well as when was compared with the acute one [44.75 \pm 1.22 vs 49.37 \pm 1.62 ($\times 10^3$); $p < 0.01$], suggesting that CB $_1$ receptor may be downregulated by the treatment. We detected an increase of CB $_2$ expression in acute group comparing with the control one [61.09 \pm 2.54 vs 53.30 \pm 1.27 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. In contrast, increased CB $_2$ expression was reversed in quiescent group [61.09 \pm 2.54 vs 55.15 \pm 1.69 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. These data may indicate an overexpression of CB $_2$ receptor during the acute inflammation but, once controlled by the treatment, restored to basal levels. However, the increased ratio in acute samples was due to an increase of CB $_2$ receptors [1.22 \pm 0.04 vs 1.06 \pm 0.02; $p < 0.01$] whereas in quiescent samples it was derived from a downregulation of CB $_1$ receptors [1.23 \pm 0.039 vs 1.06 \pm 0.02; $p < 0.001$].

Enzymes of 2-AG pathway were overexpressed in UC patients; in acute and quiescent groups in comparison with control one. DAGL α and MAGL were significantly increased in acute group regarding control one [62.79 \pm 3.71 vs 53.79 \pm 1.29 ($\times 10^3$) for DAGL α ; 65.81 \pm 1.99 vs 60.81 \pm 0.94 ($\times 10^3$) for MAGL; $p < 0.05$]. However, DAGL α increase in quiescent group did not reach statistical significance when compared with control group [58.22 \pm 2.16 vs 53.79 \pm 1.29 ($\times 10^3$); $p = 0.06$]. In contrast, MAGL increase was statistically maintained between quiescent and control groups [65.85 \pm 1.64 vs 60.81 \pm 0.94 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. These data suggest an increase of 2-AG turnover during the inflammation and a decrease after achieving remission. No statistical differences in DAGL β expression were observed between control, acute and quiescent groups. However, the DAGL α + β /MAGL ratio, an estimation of the balance of 2-AG levels, did not change either in acute or quiescent patients.

NAPE-PLD immunoreactivity was significantly decreased in acute group in comparison with control one [49.46 \pm 1.38 vs 54.63 \pm 1.56 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. NAPE-PLD expression in quiescent group recovered to control levels [53.11 \pm 1.46 vs 54.63 \pm 1.56 ($\times 10^3$)], being this increase statistically significant when compared with acute group [53.11 \pm 1.46 vs 49.46 \pm 1.38 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. No statistical differences in FAAH expression were found between control, acute and quiescent groups. The NAPE-PLD/FAAH ratio, an estimation of AEA balance, decreased in acute group in comparison with control group (0.93 \pm 0.02 vs 1.06 \pm 0.03; $p < 0.01$), and increased to control levels in quiescent group when was compared with acute group (0.99 \pm 0.02 vs 0.93 \pm 0.02; $p < 0.05$). These data suggest a dysregulation of the AEA balance in the acute inflammatory process that recovers to control level after treatment.

Percentage of the ECS immunoreactive cells in the lamina propria

We found pronounced changes in the number of FAAH+ and MAGL+ cells, but not to the remaining ECS components (fig. 6).

FAAH+ cell number rose in acute group compared with control one (11.2% \pm 1.9% vs 1.29% \pm 0.3%; $p < 0.001$). Besides, a decrease in the number of FAAH+ cells was evidenced in quiescent group compared with acute group (4.8% \pm 0.6% vs 11.2% \pm 1.9%; $p < 0.001$) but was still notably higher than in controls ($p < 0.001$).

We found higher percentage of MAGL+ cells in acute and quiescent groups than in controls (4.4% \pm 0.5% vs 1.2% \pm 0.3%; 3.4% \pm 0.5% vs 1.2% \pm 0.3%; $p < 0.001$).

Quantification of epithelial ECS immunoreactivity depending on the severity of the UC disease

We compared ECS in acute group depending on the severity of the disease and after remission (quiescent group) vs control tissue (fig. 7). CB $_1$ expression did not change in acute samples at any clinic score. In quiescent samples, CB $_1$ expression dropped significantly in moderate UC flare patients [45.46 \pm 1.91 vs 49.18 \pm 1.44 ($\times 10^3$); $p < 0.05$] or severe [42.48 \pm 1.32 vs 49.18 \pm 1.44 ($\times 10^3$); $p < 0.05$], in comparison with controls (Fig. 6). In mild UC, the decrease did not reach the significance between quiescent and control groups [44.89 \pm 0.64 vs 49.18 \pm 1.44 ($\times 10^3$); $p = 0.06$].

Intense CB $_2$ immunoreactivity in acute group was evidenced in mild [70.801 \pm 7.042 vs 53.301 \pm 1.278 ($\times 10^3$); $p < 0.01$] and moderate colitis [58.86 \pm 2.46 vs 53.30 \pm 1.27 ($\times 10^3$); $p < 0.05$], in comparison with controls but not in the severe cases. There was no change in CB $_2$ immunoreactivity between quiescent and control samples.

We only found a rise of DAGL α expression in acute moderate colitis compared with control groups [61.21 \pm 3.20 vs 53.28 \pm 1.16 ($\times 10^3$); $p < 0.05$]. In mild colitis patients, higher levels of DAGL α were also observed in quiescent samples compared with controls [55.67 \pm 2.93 vs 53.28 \pm 1.16 ($\times 10^3$); $p < 0.05$]. No differences in DAGL β expression were observed among the three clinic scores. Regarding NAPE-PLD, no differences were found in mild colitis among the three groups, but when we compared acute group with controls as the severity raises the expression drops. Differences were significant in moderate [49.37 \pm 0.88 vs 54.63 \pm 1.56 ($\times 10^3$); $p < 0.05$] and severe colitis [45.70 \pm 0.74 vs 54.63 \pm 1.56 ($\times 10^3$); $p < 0.01$]. NAPE-PLD immunoreactivity rose to control values in quiescent stage of moderate colitis compared with acute group [52.34 \pm 6.68 vs 49.37 \pm 3.18 ($\times 10^3$); $p < 0.05$].

Higher levels of FAAH immunoreactivity were measured in quiescent samples of moderate UC patients compared with acute [55.78 \pm 2.15 vs 50.79 \pm 1.80 ($\times 10^3$); $p < 0.05$] and control samples [55.78 \pm 2.15 vs 51.01 \pm 1.63 ($\times 10^3$); $p < 0.05$]. No changes of FAAH expression were detected in acute or quiescent groups from mild and severe clinic score patients. In mild and moderate colitis, we evidenced higher expression of MAGL in acute [64.57 \pm 1.60 vs 60.03 \pm 0.72 ($\times 10^3$) in mild; 67.41 \pm 3.49 vs 60.03 \pm 0.72 ($\times 10^3$) in moderate; $p < 0.05$] and quiescent [68.25 \pm 0.96 vs 60.03 \pm 0.72 ($\times 10^3$) in mild; 67.36 \pm 2.54 vs 60.03 \pm 0.72 ($\times 10^3$) in moderate; $p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively] stages compared with controls. In mild UC these levels were even higher in quiescent stage than in acute one ($p < 0.05$). No differences were seen in severe colitis among the three groups.

Quantification of epithelial ECS immunoreactivity depending on treatment

We analyzed ECS immunoreactivity in quiescent samples depending on the treatment received: 5-ASA (3 cases), 5-ASA and corticosteroids (15 cases), or 5-ASA, corticosteroids and immunomodulators (6 cases) (fig. 8). Regarding CB $_1$ levels, there was a decrease in patients treated with 5-ASA+corticosteroids

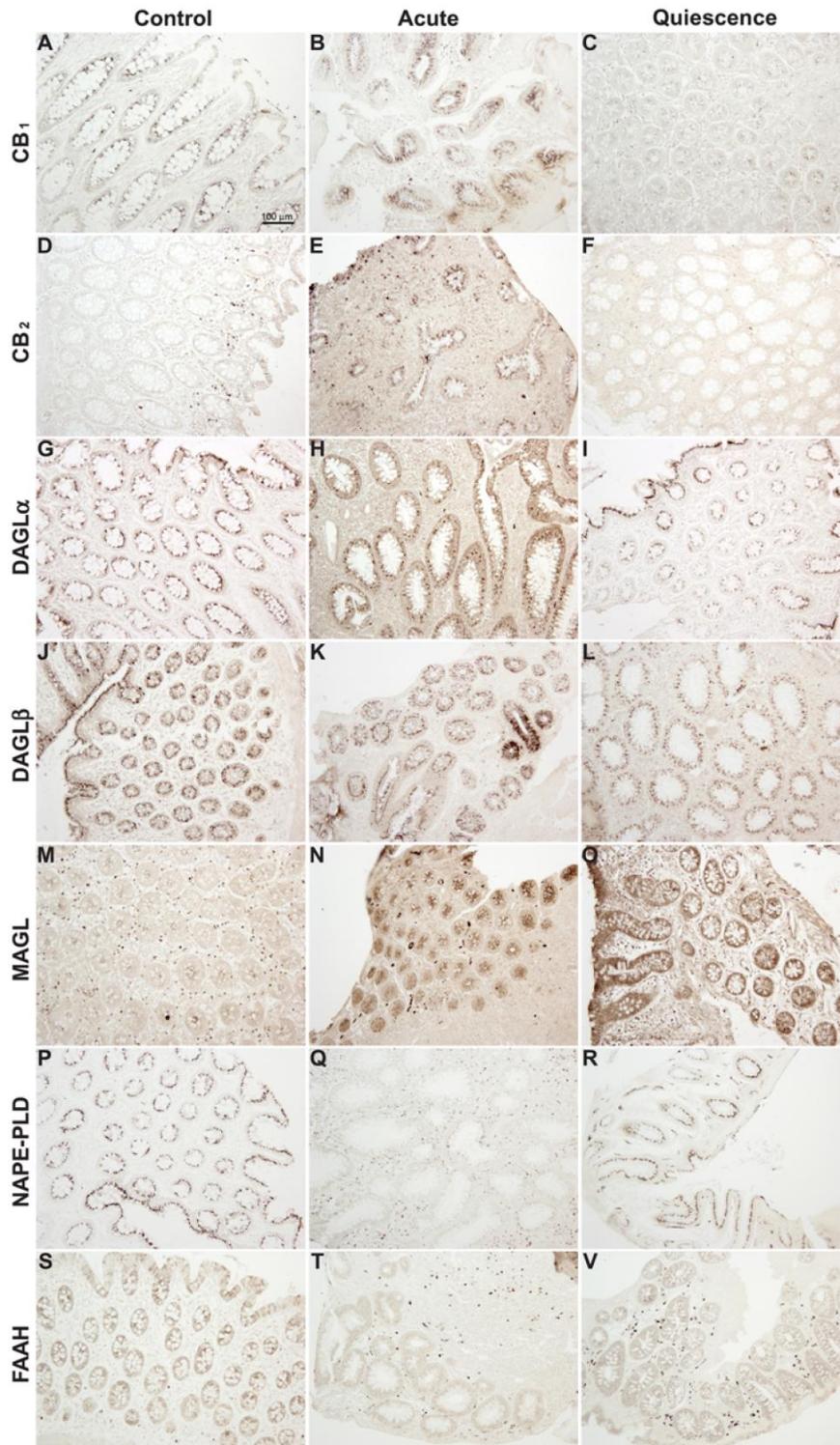


Figure 4. Immunohistochemistry in human healthy (control), acute UC and quiescent UC colonic tissue. Representative microphotographs of CB₁ receptor (A–C), CB₂ receptor (D–F), DAGL α (G–I), DAGL β (J–L), MAGL (M–O), NAPE-PLD (P–R), FAAH (S–V) were shown. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g004

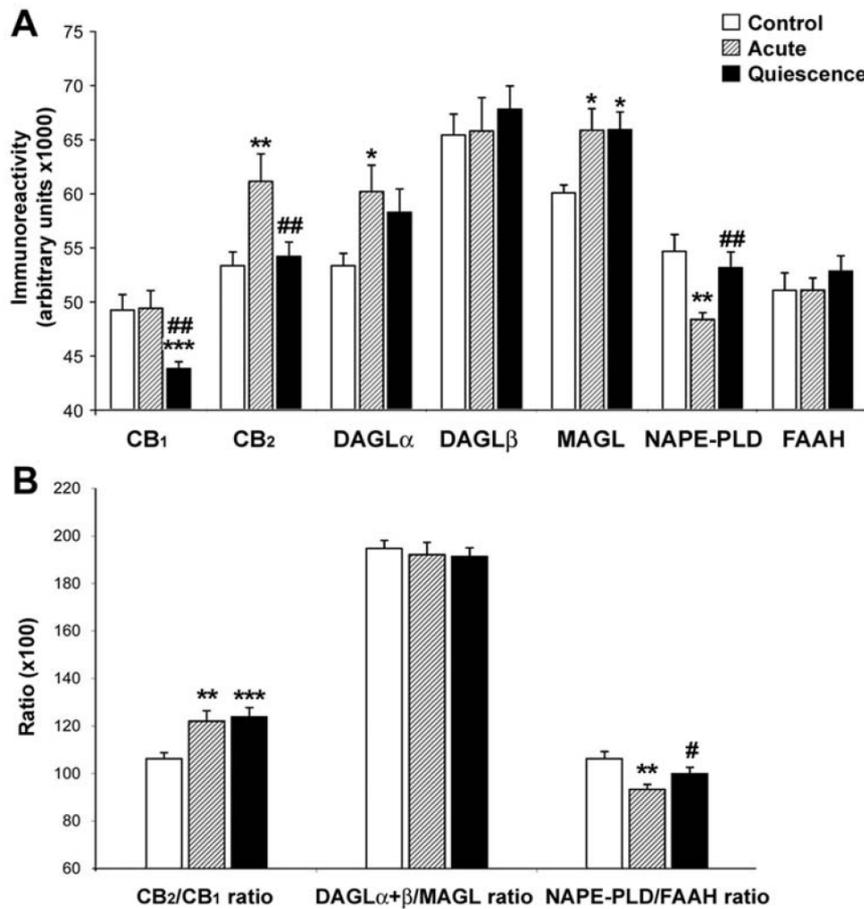


Figure 5. Quantification of ECS component immunoreactivity in the colonic epithelium. **A:** Untreated acute UC at disease onset showed increases in CB₂, DAGL_α and MAGL immunoreactivity, and decreases in NAPE-PLD immunostaining. After achieving remission (quiescence), CB₁ and CB₂ receptor immunoreactivity dropped, MAGL immunostaining maintained the same levels than acute group and NAPE-PLD immunoreactivity reverted to control levels. **B:** CB₂/CB₁ ratio increased in both groups. However, CB₂ immunoreactivity increased in acute patients, while in quiescent patients there was a decrease of CB₁ receptor and a reverted restoration of CB₂ level. NAPE-PLD/FAAH ratio dropped in acute group, but rose to control levels in quiescent one. Histograms represent the mean ± SEM. U Mann Witney and Wilcoxon tests: **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001 versus control group; #*P*<0.05 and ##*P*<0.01 versus acute group. N = 22, 24 and 24 for control, acute and quiescent groups respectively. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g005

[49.18±1.44 vs 44.91±1.58 (×10³); *p*<0.01] but not with other treatments. By contrast, CB₂ and MAGL expression increased in 5-ASA-treated patients but not after the remaining treatments [57.20±1.87 vs 53.29±1.52 (×10³) for CB₂; 68.78±1.78 vs 60.03±0.72 (×10³) for MAGL; *p*<0.05]. DAGL_α, DAGL_β, NAPE-PLD and FAAH expression were not altered by the treatment.

Discussion

Our data are consistent with previous studies on the expression of CB₁ and CB₂ receptors in human and rodent colon.[20,21,36,37] A novelty of our study is the finding of CB₁ staining in the goblet cells. Interestingly, the previous human study[20] did not report CB₁ staining in the goblet cells probably as a result of mucus-blocking antibody binding. Casu and collaborators[21] described non-specific labelling in the murine colonic epithelial cells of the large intestine because it persisted in

preabsorption and omission controls. In contrast, we observed faintly CB₁ immunoreactivity in the submucosal and myenteric ganglion plexi, with the exception of some fibers. The well-described presynaptic localization of CB₁ receptor contrasts with the presence of this receptor into submucosal ganglion cell bodies, as was described in the human and mouse colon.[20,21,37] Our results revealed similar CB₂ expression in the mucosal epithelial cells from normal patient samples in a previous human colonic study that, using different CB₂ antibodies, supports our immunohistochemical data.[20] Of note, we observed strong CB₂ expression in the Paneth cells at the bottom of the crypts. CB₂+ subepithelial plasma cells and macrophages in the lamina propria was described previously by Wright and collaborators.[20,22] A novelty data was the finding of CB₂ staining in the submucosal and myenteric plexi of the normal human colonic tissue. Recently, CB₂ expression was observed in the enteric nervous system in rodent and human ileum[19,22], and in the rat ileum containing longitudinal muscle and myenteric plexus.[38] Taking together

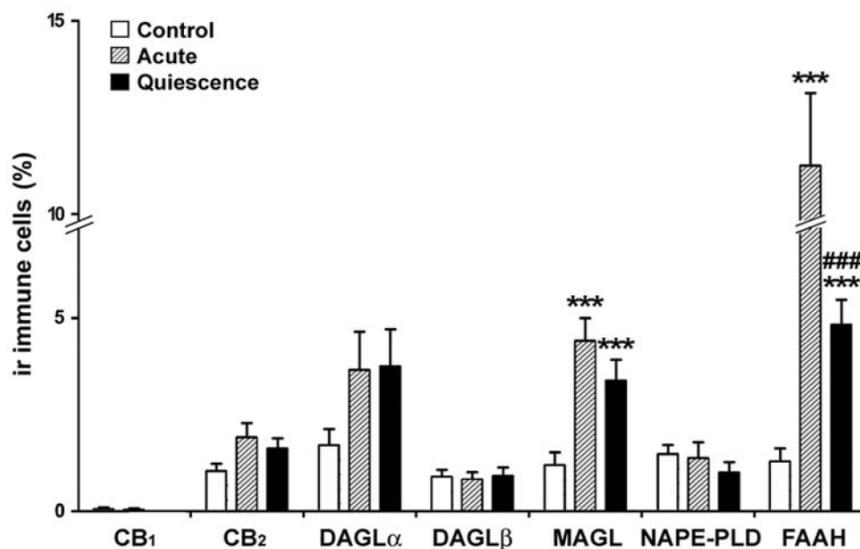


Figure 6. Percentage of immunoreactive immune cells for ECS components in the lamina propria. Untreated acute UC at disease onset is associated with high number of FAAH+ and MAGL+ immune cells that was significantly diminished after treatment only in FAAH immunoreactivity. Histograms represent the mean \pm SEM. U Mann Witney and Wilcoxon tests: *** P <0.001 versus control group; ### P <0.001 versus acute group. N=22, 24 and 24 for control, acute and quiescent groups respectively. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g006

these results point to a differential role of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in human colonic tissue. CB₁ could be modulating colonic neuronal input and secretion while CB₂ may participate in colonic immunomodulation.

Other important novelty is the presence of the two endocannabinoid-degradating enzymes (FAAH and MAGL) in the epithelial cells of human colonic tissue. We have clearly detected FAAH expression in plasma cells of the lamina propria and in ganglion cells of the enteric nervous system. These results are related to the fact that FAAH blockers like URB597 reduce significantly the inflammation in the mouse colon[28], and selective FAAH inhibitors like AA-5-HT inhibited intestinal motility.[39] MAGL localization into epithelial cells is in agreement with the presence of MAGL activity in the soluble and membrane cellular fractions.[40] Of note the immunoreactive polymorphonuclear cells in the lamina propria, a fact that has not been observed previously. In contrast to Duncan and collaborators[40], we did not observed MAGL immunoreactivity in the human smooth muscle and mucosal layers, but we detected MAGL expression in fibers of the enteric nervous system.

We have reported the first analysis of the presence of DAGL α , DAGL β and NAPE-PLD in the human colonic tissue. Although 2-AG is considered a full cannabinoid receptor agonist, it is also an intermediate in triacyl/diacylglycerol metabolism as well as a prominent molecule linking the cannabinoid signalling with lysophospholipids and diacylglycerol-PKC signalling system. However, although we cannot strictly consider both DAGL α and DAGL β as pure endocannabinoid-synthesizing enzymes, we will focus on their potential role in the endocannabinoid system.

On the other hand, NAPE-PLD is another recently characterized cannabinoid biosynthesis enzyme that mediates the release of N-acyl ethanolamides (including AEA) from a phospholipid precursor (N-acyl-phosphatidylethanolamide, NAPE).[15,41] Our results are compatible with an active synthesis of ECs, i.e. AEA and 2-AG, in healthy human colonic tissue.

There are higher levels of cannabinoid CB₂ receptors (but not CB₁ receptors) in the mucosa epithelium of UC, mainly in mild and moderate-scored patients. These data suggest a dysregulated AEA tone in the colon of these patients, in agreement with previous findings.[20,25] However, we observed low NAPE-PLD expression, mainly in moderate and severe-scored pancolitis patients, and no changes in the AEA-degrading enzyme FAAH, suggesting a decrease of AEA levels, as deduced by the NAPE-PLD/FAAH ratio, while D-Argenio et al. found high AEA levels in biopsy samples of colons from untreated UC patients.[25] This discrepancy may be explained by the fact that NAPE-PLD is not the only source for AEA, as others enzymes are also capable of generating AEA from NAPE, such as α/β hydrolase 4, lyso-PLD, lyso-PLC, and phosphatases such as PTPN22.[42-44] Thus, although we detect a dysregulated AEA tone, the whole changes of AEA-related enzymes could lead to an increased level of this EC.

Regarding 2-AG, we observed an increase of DAGL α and MAGL expression in the colonic epithelium of acute UC patients, suggesting an increase of 2-AG turnover during the inflammation, but not a dysbalance of 2-AG levels, as suggest the DAGL/MAGL ratio. The maintenance of DAGL/MAGL ratio is in agreement with the absence of 2-AG variations observed in the mucosa of TNBS-treated rats, DNBS-treated mice and UC patients.[25] The high DAGL α and DAGL β expression detected in the human colonic epithelium may be partially related with the high 2-AG levels described in colonic mucosa of untreated rats, in contrast to that of control patients.[25]

Interestingly, severe clinic score patients showed no significant increase in CB₂ receptors, and this fact correlates with a lack of increased 2-AG turnover (no increases of synthesizing- and degrading enzymes), thus suggesting a diminished ECS response to the inflammatory insult. In light of these findings, we could speculate that ECS-related drugs potentiating ECs turnover could be useful in managing the disease in this subpopulation of patients.

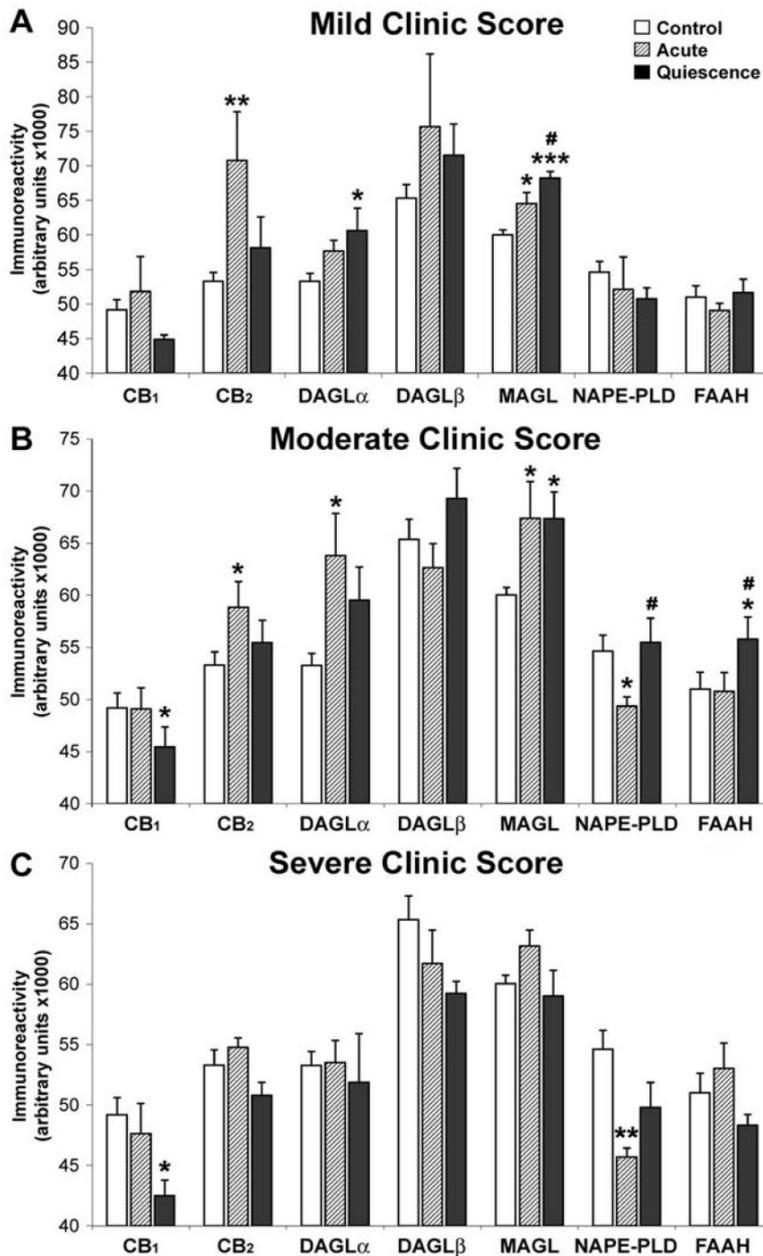


Figure 7. Quantification of epithelial ECS immunoreactivity depending on the UC severity score. Main changes were observed mainly in mild and moderate acute UC. Histograms represent the mean±SEM. U Mann Witney and Wilcoxon tests: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control group; # $P < 0.05$ versus acute group. N = 6, 13 and 5 for mild, moderate and severe groups respectively. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g007

Regarding the cannabinoid receptors in treated UC, the acute CB₂ increase in UC patients is reverted in the chronic state, irrespective of the treatment. This fact suggests a putative role of CB₂ receptor in mediating acute inflammatory response. In addition, the treatments, mainly the 5-ASA+corticosteroids one, lead to a chronic down-regulation of CB₁ receptor (not displayed acutely), probably reflecting a diminished colonic functionality in the chronic state of the disease, since CB₁ receptor have been

implicated in colonic motility and secretion.[27,39] Thus, cannabinoid CB₁ receptor could be a biological marker of UC progression. Interestingly, while the high MAGL expression is maintained in quiescent patients, NAPE-PLD expression recovered to control levels, suggesting a partial recovery of the ECS dysregulation after treatments.

In summary, these data indicate that endocannabinoid signaling pathway is altered in UC, acting probably through cannabinoid

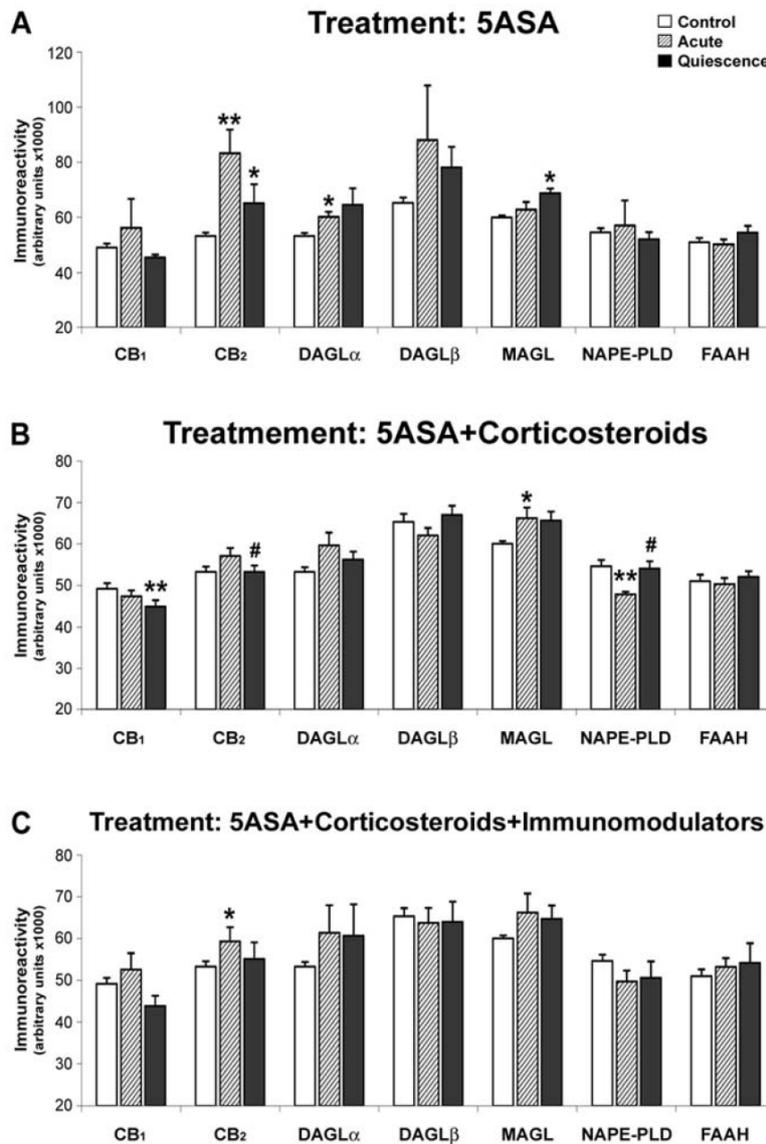


Figure 8. Quantification of epithelial ECS immunoreactivity depending on the treatment received. As a relevant finding, treatment is associated with changes in the expression of cannabinoid receptors and EC-production and -degradation enzymes, suggesting that these proteins can be considered as biomarkers of active disease/response to treatment. Histograms represent the mean ± SEM. U Mann Witney and Wilcoxon tests: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control group; # $P < 0.05$ versus acute group. N=3, 15 and 6 for 5-ASA, 5-ASA+corticosteroids and 5-ASA+corticosteroids+immunomodulators respectively. doi:10.1371/journal.pone.0006893.g008

CB₂ receptor as a counterregulatory system aimed to reduce colitis-associated inflammation. In addition, the changes observed in the remaining ECS components, both acutely and after treatment, suggest that drugs acting at the ECS could be potential therapeutic approaches that need to be explored in more depth, for the treatment of inflammatory bowel diseases.

Supporting Information

Supporting Information S1 Generation of NAPE-PLD-, DAGL_α-, DAGL_β-specific antibodies. We have generated poly-

clonal rabbit antibodies against proteins of the cannabinoid machinery. Immunizing peptides were 1) a 13-amino-acid (aa) peptide comprising part of both the C-terminal and the N-terminal regions of NAPE-PLD (MDENSCDKAFEET); 2) a 16-aa peptide from the C-terminal region of DAGL alpha (CGASPTKQDDLVISAR); 3) a 16-aa peptide from an internal sequence of DAGL beta (SSDSPLDSPTKYPTLC). We employed a chimeric sequence peptide as immunogen for NAPE-PLD antibody generation. The aim of this chimeric construction was to obtain two distant epitopes exposed in the native protein because one of them belongs to the N-terminal and the other to the C-

terminal region of the protein, both regions having random coil structures. NAPE-PLD, DAGL alpha and DAGL beta peptides were synthesized and coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH, JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany). The three peptides were injected to rabbits (two animals per peptide), according to standard protocols for generation of antisera, with the IgG fraction subsequently purified by means of a protein A column (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006893.s001 (0.03 MB DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FJBS FRdF MA. Performed the experiments: LM JS. Analyzed the data: LM JS MI. Contributed reagents/materials/analysis tools: FJBS FRdF MA. Wrote the paper: LM JS FJBS FRdF MA.

References

- Massa F, Storr M, Lutz B (2005) The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* 83: 944–954.
- Pinto L, Capasso R, Di Carlo G, Izzo AA (2002) Endocannabinoids and the gut. *Prostag Leukotr Ess* 66: 333–341.
- Pertwee RG (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48: 859–867.
- Izzo AA, Mascolo N, Capasso F (2001) The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol* 1: 597–603.
- Fowler CJ, Holt S, Nilsson O, Jonsson KO, Tiger G, et al. (2005) The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 248–262.
- Calignano A, La Rana G, Loubet-Lescoulié P, Piomelli D (2000) A role for the endogenous cannabinoid system in the peripheral control of pain initiation. *Prog Brain Res* 129: 471–482.
- De Hertogh G, Aerssens J, Geboes KP, Geboes K (2008) Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterology* 14: 845–852.
- Geboes K, Collins S (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Mot* 10: 189–202.
- Baumgart DC, Garding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369: 1627–1640.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83–90.
- Sugiura T, Waku K (2000) 2-arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108: 89–106.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers* 4: 1842–1857.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, et al. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipase points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163: 463–468.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 279: 5298–5305.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, et al. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10819–24.
- Giang DK, Cravatt BF (1997) Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2238–42.
- Di Carlo G, Izzo AA (2003) Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic application. *Expert Opin Investig Drugs* 3: 771–784.
- Duncan M, Davison JS, Sharkey KA (2005) Review article: Endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 667–683.
- Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, et al. (2005) Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129: 437–453.
- Casu MA, Porcella A, Ruiu S, Saba P, Marchese G, et al. (2003) Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* 459: 97–105.
- Wright K, Duncan M, Sharkey KA (2008) Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Brit J Pharmacol* 153: 263–270.
- Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, et al. (2004) The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 113: 1202–1209.
- Di Marzo V, Izzo AA (2006) Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut* 55: 1373–1376.
- D'Argenio G, Valenti M, Scaglione G, Cosenza V, Sorrentini I, et al. (2006) Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J* 20: 568–570.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM (1998) Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75: 111–119.
- Izzo AA, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, et al. (2001) Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 134: 563–570.
- Storr MA, Keenan GM, Emmerdinger D, Zhang H, Yuce B, et al. (2008) Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J Mol Med* 86: 925–936.
- Ihenetu K, Molleman A, Parsons M, Whelan C (2003) Pharmacological characterisation of cannabinoid receptors inhibiting interleukin 2 release from human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pharmacol* 464: 207–215.
- Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA (2004) Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 142: 1247–1254.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55: 749–753.
- Truelove SC, Witts LJ (1955) Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 2: 1041–1048.
- Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM (1987) Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 317: 1625–1629.
- Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, et al. (2008) Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 51: 476–487.
- Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, et al. (2008) Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol* 509: 400–421.
- Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, et al. (1997) Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339: 53–61.
- Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, et al. (2002) Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 123: 227–234.
- Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD (2002) Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 67–76.
- Capasso R, Matias I, Lutz B, Borrelli F, Capasso F, et al. (2005) Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 129: 941–51.
- Duncan M, Thomas AD, Chany NL, Patel A, Patel KD, et al. (2008) Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295: G1255–65.
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21: 218–24.
- Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF (2006) Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 45: 4720–6.
- Simon GM, Cravatt BF (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281: 26465–72.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, et al. (2008) Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54: 1–7.

Effects of haptoglobin polymorphisms and deficiency on susceptibility to inflammatory bowel disease and on severity of murine colitis

L Márquez,^{1,2} C Shen,³ I Cleynen,¹ G De Hertogh,⁴ K Van Steen,⁵ K Machiels,¹ C Perrier,^{1,3} V Ballet,¹ S Organe,¹ M Ferrante,¹ L Henckaerts,¹ G Galicia,³ P Rutgeerts,¹ J L Ceuppens,³ S Vermeire¹

► Additional materials are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://gut.bmj.com>).

¹Department of Gastroenterology, Gasthuisberg Hospital, KU Leuven, Belgium

²Department of Medicine, Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Clinical Immunology Section, Gasthuisberg Hospital, KU Leuven, Belgium

⁴Morphology and Molecular Pathology Section, KU Leuven, Belgium

⁵Systems and Modeling Unit, Department of Electrical Engineering and Computer Science, University of Liège, Liège, Belgium

Correspondence to

Severine Vermeire, Department of Gastroenterology, University Hospital Gasthuisberg, Herestraat 49, B-3000 Leuven, Belgium; severine.vermeire@uz.kuleuven.ac.be

LM and CS contributed equally to this work. JC and SV share senior authorship.

Revised 23 May 2011
Accepted 1 June 2011

ABSTRACT

Background Haptoglobin (Hp) is a haemoglobin-binding protein with immunomodulatory properties. Its gene (16q22) harbours a common polymorphism with two different alleles: *Hp1* and *Hp2*. Genotype *Hp22* has been shown to be over-represented in different immune diseases. Results in Crohn's disease (CD) are contradictory.

Aims To determine whether Hp plays a role in inflammatory bowel disease, both genetically and functionally.

Methods 1061 patients with CD, 755 with ulcerative colitis (UC) and 152 with primary sclerosing cholangitis, as well as 452 healthy controls, were genotyped using touch-down PCR. To confirm association results, 464 CD trios and 151 UC trios were genotyped. Serum Hp concentrations were determined in 62 individuals of different genotype. Colitis was induced in mice with dextran sulphate sodium (DSS) and oxazolone (Oxa). Cytokine production was evaluated by mRNA quantification in colonic tissue and ELISA on supernatants of mesenteric lymph node cells.

Results Prevalence of *Hp2* was higher in CD and UC than in controls. In the confirmatory cohorts, *Hp2* was over-transmitted to the affected offspring. Serum Hp concentrations were higher in individuals with genotypes *Hp11* and *Hp21* than in those with *Hp22* (1.38 vs 0.89 g/l). DSS- and Oxa-induced colitis were more severe in Hp-deficient mice than in control mice and accompanied by higher concentrations (although not statistically significantly different) of tissue mRNA for cytokines. Interleukin-17 production was significantly higher in the presence of Hp-deficient serum compared with wild-type serum.

Conclusions The *Hp* gene may play a role in susceptibility to inflammatory bowel disease. Its implication in other immune diseases underscores the common pathways between these diseases. Experimental models of colitis showed that Hp has a protective role in inflammatory colitis, most likely by inhibiting the production of Th1 and Th17 cytokines.

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the main clinical subtypes of inflammatory bowel disease (IBD), a chronic, relapsing, inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. They are complex and polygenic diseases that affect an increasing number of people in Western countries.

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Haptoglobin (Hp) has anti-inflammatory properties and a modulatory effect on innate and adaptive immune responses.
- Its gene harbours a polymorphism with two functional alleles: *Hp1* and *Hp2*, with *Hp1* having superior anti-inflammatory capacity.
- Genotype *Hp22* has been shown to be over-represented in immune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and diabetes mellitus type 2.

What are the new findings?

- Similar to what has been observed in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, *Hp2* and genotype *Hp22* have a higher prevalence in both Crohn's disease and ulcerative colitis.
- The genotype *Hp22* was associated with decreased serum concentrations of Hp.
- *Hp*-deficient mice developed more severe colitis in two models of murine inflammatory bowel disease (IBD) (DSS- and Oxa-induced colitis), giving further support to a functional role of Hp in IBD.
- *Hp* deficiency may enhance the production of inflammatory cytokines (interleukin (IL)-17, interferon γ , tumour necrosis factor, IL-6 and IL-13) in intestinal tissues.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Our findings suggest that the role of Hp in IBD underscores the common pathogenic pathways with other immune diseases. Moreover, its protective role in experimental inflammatory colitis suggests potential therapeutic applications in IBD.

The aetiopathology of these diseases remains unclear. The most widely accepted hypothesis is that there is a dysregulation of the immunological response to commensal bacteria in a genetically susceptible subject.¹

The acute phase protein, haptoglobin (Hp), is an α -sialoglycoprotein, with haemoglobin-binding

Paper

capacity. Binding to haemoglobin prevents iron loss and subsequent kidney damage during haemolysis.² Haemoglobin–Hp complexes are removed by binding to the CD163 receptor, expressed on the surface of monocytes and macrophages.³ Serum levels of Hp increase during inflammatory processes. A feedback anti-inflammatory function has also been demonstrated, as well as a modulatory effect on innate and adaptive immune responses.^{4,5} The synthesis of Hp is induced by interleukin (IL)-6, IL-1 β and tumour necrosis factor (TNF). It is mainly produced by hepatocytes, and to a lesser extent by cells in other tissues such as lung, skin and kidney, under inflammatory conditions.²

The *Hp* gene is located on chromosome 16q22, and harbours a common polymorphism consisting of two structural alleles: *Hp1* and *Hp2*. *Hp2* is the product of a non-homologous intragenic duplication of exons 3 and 4 of *Hp1*,⁶ and thus could be considered to be a copy number variant. This results in three major genotypes—*Hp11*, *Hp21* and *Hp22*—and three different Hp phenotypes. Hp contains two types of polypeptide chains: a β chain, which is common to the three phenotypes, and an $\alpha 1$ or $\alpha 2$ chain, which differentiates *Hp11* ($\alpha 1$) from *Hp22* ($\alpha 2$). The three major phenotypes of Hp are: an $\alpha 1$ – β dimer for *Hp11*; multiple $\alpha 2$ – β units (cyclic polymer) for *Hp22*; and a combination of $\alpha 1$ – β dimer with multiple $\alpha 2$ – β units (linear polymer) for *Hp21*.^{7,8} Hp can be detected in the serum of all mammals, but this particular polymorphism has been reported only in humans.³

In vitro studies have shown some functional differences between *Hp1* and *Hp2* protein products, with *Hp1* having a superior anti-inflammatory effect compared with *Hp2*,^{9–11} but the exact functional significance of this polymorphism is not well understood.

Given the immunomodulatory properties of Hp, the gene has been studied as a candidate gene in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, primary sclerosing cholangitis (PSC) and diabetes mellitus type 2, where the genotype, *Hp22*, was shown to be over-represented.^{9,12–14} Two small studies on IBD have produced conflicting results.^{15,16}

To explore a possible role of Hp in IBD development/pathogenesis, we studied the *Hp1/Hp2* polymorphism in CD, UC and PSC. To assess the influence of the genotypes on the circulating levels of Hp, we determined serum levels in relation to the genotypes. To gain further insights into the functional role of Hp, we studied whether Hp has an effect on the course of experimentally induced colitis. For this, we induced colitis with dextran sulphate sodium (DSS) and oxazolone (Oxa) in wild-type (WT) and Hp-deficient mice (KO),¹⁷ and studied the inflammatory processes in these models.^{18,19}

MATERIALS AND METHODS

Patients

We analysed DNA from 2431 patients of Western European origin with IBD, all collected at the University Hospital Leuven. IBD was diagnosed on the basis of clinical, endoscopic and histological criteria. In the exploratory cohort, 1061 patients with CD and 755 with UC and 452 healthy subjects were genotyped. To replicate the results, we genotyped an independent confirmatory cohort of 615 IBD trios (affected child and both parents; 151 UC trios, 464 CD trios).

The following phenotypic data for each patient were collected from medical records: gender; age at diagnosis; smoking behaviour; location and behaviour of the disease, at diagnosis and during follow-up (according to the Montreal classification²⁰);

extraintestinal manifestations; and need for surgery. In the CD cohort, full phenotypic data for 755 (71%) patients were available. In the UC cohort, complete phenotypic data for 638 (84%) patients were available. These data are shown in table 1.

We also genotyped 152 patients with PSC, 67 of them with associated IBD (25 CD, 42 UC). Patients were diagnosed on the basis of analytical parameters of chronic cholestasis, radiological appearance and histological criteria, in the absence of other possible causes of secondary sclerosing cholangitis.²¹

This study was approved by the ethics committee of the University of Leuven/Gasthuisberg hospital. Written informed consent was obtained from all the participants.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from venous blood using a salting-out procedure²² and stored at -80°C .

The genotypes were determined with a PCR assay adapted from Koch *et al*.⁷: oligonucleotide primers A (5-GAGGGGAGC-TTGCCITTCATTG-3) and B (5-AGATTTTTGAGCCCTGG-CTGGT-3) were used to amplify either a 1757 bp *Hp1* allele-specific sequence or a 3481 bp *Hp2* allele-specific sequence. A separate PCR with primers C (5-CCTGGCTCGTATTAACTG-CACCAT-3) and D (5-CCGAGTGCTCCACATAG CCATGT-3) was performed to amplify a 349 bp *Hp2* allele-specific sequence, in order to distinguish genotypes 11 and 21. Samples were

Table 1 Clinical and demographic characteristics of patients with CD and UC

Characteristic	CD (n=755)	UC (n=638)
Male	314 (42%)	344 (54%)
Median age at diagnosis (years)	24	30
Median follow-up time (years)	14	12
Location at diagnosis*		
Ileum (L1)	352 (47%)	
Colon (L2)	127 (17%)	
Ileocolon (L3)	250 (33%)	
Upper gastrointestinal (+L4)	60 (8%)	
Proctitis (E1)		191 (30%)
Left-sided colitis (E2)		325 (51%)
Pancolitis (E3)		146 (19%)
Location at last follow-up*		
Ileum (L1)	288 (38%)	
Colon (L2)	92 (12%)	
Ileocolon (L3)	373 (49%)	
Upper gastrointestinal (+L4)	87 (12%)	
Proctitis (E1)		76 (12%)
Left-sided colitis (E2)		249 (39%)
Pancolitis (E3)		313 (49%)
Behaviour at diagnosis*		
Non-stricturing, non-penetrating (B1)	683 (90%)	
Stricturing (B2)	35 (5%)	
Penetrating (B3)	44 (6%)	
Perianal disease (+p)	48 (6%)	
Behaviour at last follow-up*		
Non-stricturing, non-penetrating (B1)	357 (47%)	
Stricturing (B2)	293 (39%)	
Penetrating (B3)	215 (28%)	
Perianal disease (+p)	234 (31%)	
Need for IBD-related surgery during follow-up	432 (57%)	175 (28%)
Smoking at diagnosis	337 (45%)	198 (31%)
Extraintestinal manifestations	181 (24%)	125 (19.5%)
Primary sclerosing cholangitis	25 (3.3%)	42 (6.6%)

CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.

*According to Montreal classification (Reference 20).

amplified in a reaction volume of 15 µl which contained 50 ng DNA, 0.9 mmol/l MgCl₂, 0.6 µmol/l of each primer and 0.4 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). The annealing temperature for primers C and D was 64°C, whereas for primers A and B it was 65.4°C. With primers A and B, we modified the previously reported PCR in order to avoid non-specific products. We performed a touch-down PCR in a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems) under the following conditions: in the first phase, seven cycles of 4 min, starting at 77°C and decreasing the temperature 2°C each cycle; in the second phase, when the annealing temperature was achieved, 25 cycles of 4 min at 65.4°C. For primers C and D, the PCR was performed as in Koch *et al.*⁷ The PCR products were separated in an ethidium bromide-stained 1% agarose gel, based on the length of the amplified fragments (figure 1 in online supplementary methods).

Serum concentrations of Hp

Serum concentrations of Hp were determined at the laboratory of immunology at the University Hospital Leuven, on Modular P (Roche Diagnostics), in a group of 62 randomly selected healthy controls of different genotype (20 with genotype *Hp11*, 22 with genotype *Hp21*, and 20 with genotype *Hp22*).

Mice

C57bl/6 mice and syngeneic *Hp* KO mice were bred in the animal care facility of the Faculty of Medicine, Catholic University of Leuven (Belgium). Mice were 5–6 weeks old when experiments started. All studies were approved by the local ethics committee for animal experimentation of the University of Leuven.

Induction of DSS colitis

Mice were given 3% DSS (35–50 000 kDa; MP Biomedicals, Illkirch, France) in drinking water in three cycles of 5 days each, followed by 2-day interval of normal tap water.¹⁹ Control groups were given tap water throughout. Mice were killed on day 22 by cervical dislocation. The entire colon was removed, and colon length was measured from the ileocaecal junction to the anus. Macroscopic scoring was carried out as described by Mourelle *et al.*²³ with a maximum score of 9. For microscopic evaluation, the colon was divided into segments representing the proximal, mid- and distal colon. From each part of the colon, a piece was taken, fixed in 6% formalin, embedded in paraffin, cut into slices, and stained with H&E. Stained sections were blindly analysed by a pathologist (GDeH) using the scoring of Kojouharoff *et al.*²⁴ with a maximum score of 20.

Induction of Oxa colitis

Mice were first sensitised cutaneously twice 14 days and 7 days before challenge. For sensitisation, a 2×2 cm field of the abdominal skin was shaved and 100 µl Oxa (10 mg/ml) in 50% ethanol solution was applied. On the day of challenge, mice were first lightly anaesthetised; subsequently Oxa (1 mg) was administered in a total volume of 100 µl intrarectally with a round-tip needle on a 1 ml syringe.¹⁸ Both macroscopic and microscopic histology evaluations were performed as described previously.²⁵ The colon was excised, and damage was scored on a 0–12 scale. Colon sections were prepared for H&E staining as described above. Stained sections were examined for evidence of colitis using as criteria the presence of cell infiltration, elongation and/or distortion of crypts, crypt abscesses, reduction in goblet cell number, frank ulceration and oedema formation with a maximum of 13.²⁶

In vitro mesenteric lymph node (MLN) cell culture and ELISA

MLN cells from mice with colitis were isolated, and cell suspensions were prepared and adjusted to 1×10⁶ cells/ml. The culture medium used was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), supplemented with 2 µM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.05 µM β-mercaptoethanol and 10% fetal calf serum. All cell cultures contained 1 µg/ml anti-CD3 and 1 µg/ml anti-CD28. In some of the cultures, recombinant IL-23 or recombinant IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) was added at a concentration of 10 ng/ml. Serum from either KO or WT mice was added at a concentration of 2% (v/v). In a separate experiment, cell differentiation towards Th17 (starting from MLN cells) was studied by culture with IL-6 (50 ng/ml) and transforming growth factor (TGF)β (5 ng/ml) for 3 days; then cells were washed and further cultured with IL-21 (100 ng/ml; R&D Systems) for another 2 days. Supernatants were collected for ELISA.^{27 28}

Quantitative reverse transcriptase-PCR for cytokine mRNA

Part of the colon was removed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –70°C until extraction of total RNA as described previously.²⁵ The sequence of primers and probes used for detection of cytokines and β-actin have been listed previously.⁴ Levels of cytokine mRNA expression are presented as a ratio after normalisation to the housekeeping gene, β-actin.

Statistical analysis

The χ² test was performed to evaluate the differences in allele and genotype frequencies between healthy controls and patients with IBD or PSC. The Kruskal–Wallis test was used to analyse the differences in serum Hp levels in each genotype. All analyses were performed using SPSS V16.0 software. Genotyping results in trios were analysed with TDT (Haploview 4.1)^{29 30} and FBAT (Family Based Association Tests).³¹

Data for mice models were analysed using the Mann–Whitney U test with Prism Mac 3.0. p<0.05 was considered significant.

RESULTS

Genetic analysis: *Hp* polymorphism in patients with CD and UC and IBD trios

Overall, the genotyping success rate was 99%. The alleles were in Hardy–Weinberg equilibrium in the control group. Allele 2 was more common in both CD (64.6%, p=0.0001) and UC (64.1%, p=0.0009) patients compared with controls (56.9%). The distribution of the genotypes was also significantly different between the three groups, mainly through an over-representation of genotype 22 in both CD and UC (43.7% and 42.1% vs 32.1%, p=0.0001 and p=0.003, respectively). We found no significant association between *Hp* genotypes and UC and CD phenotypic characteristics (figure 2 in online supplementary methods).

In the confirmatory cohort of IBD trios, allele 2 was significantly over-transmitted to affected offspring (T:UT

Table 2 Inflammatory bowel disease (IBD) trios

Trio	Number of trios	T:UT	χ ²	p Value	MAF
IBD	615	337:256	11.064	0.0009	0.405
CD	464	247:186	8.954	0.0034	0.408
UC	151	87:65	3.184	0.0744	0.379

Transmission of allele 2.

CD, Crohn's disease; MAF, minor allele frequency; UC, ulcerative colitis.

Paper

[Transmitted:Untransmitted] 337:256; $p=0.0009$) and in the subset of CD trios (T:UT 247:186; $p=0.003$). In UC trios, allele 2 was also over-transmitted, although this lacked significance (T:UT 87:65; $p=0.074$), probably because of the low number of UC trios (table 2).

Hp polymorphisms in patients with PSC

Allele 2 frequency was higher in PSC (62.0%) patients than in controls (56.9%), although this difference lacked significance ($p=0.08$). There was a significant difference in genotype distribution between patients with PSC and controls, because of a higher presence of the genotype Hp22 in the PSC group (43.7% vs 32.1%, $p=0.038$; figure 2 in online supplementary methods).

Sixty-seven patients with PSC also had IBD. If we excluded these patients from the analysis, genotype Hp22 was also the most common (40.7%), although the differences from controls were not significant ($p=0.09$).

Serum Hp concentrations

Median levels of serum Hp for each genotype are shown in figure 1.

The majority of the samples fell within the normal range (0.3–2 g/l). Lower serum levels of Hp were found in patients with genotype Hp22 than genotype Hp11 and Hp21 ($p=0.005$). The differences between the three groups were significant (genotype Hp11: 1.38 g/l; Hp21: 1.38 g/l; Hp22: 0.89 g/l; $p=0.021$).

Experimental colitis is more severe in Hp-deficient mice

To determine whether Hp has a functional effect in the development of experimental colitis, we induced colitis with DSS and Oxa in WT and Hp KO mice. In the DSS colitis model (figure 2A), KO mice rapidly lost weight from day 13 onwards, and showed clear differences in body weight evolution compared with the WT groups (68.1±1.0 vs 106.0±1.2, respectively, on day 22, $p<0.001$). The colon length was shorter in KO mice (4.6±0.1 vs 5.8±0.3, $p<0.01$, figure 2B) and the mean macroscopic scores were higher in KO colitis mice than WT mice (7.6±0.5 vs 5.6±0.5, $p<0.01$, figure 2C). The microscopic evaluation of colonic segments (proximal, mid and distal) revealed that lesions were patchy, and epithelial regeneration was seen in WT mice but not in KO mice. In KO mice, more severe mucosal damage was observed, characterised by loss of goblet cells, loss of

crypts, epithelial cell necrosis and local infiltration of inflammatory cells, mainly neutrophils, in the lamina propria and submucosa. The overall histological score was higher in KO mice than WT mice (13.4±1.0 vs 7.5±0.9, $p<0.05$, figure 2D). Cell composition in MLN cells was similar in the two groups (data not shown).

In a separate experiment with DSS, all KO mice developed colitis and had died after the third DSS cycle, while WT mice were all alive (data not shown).

Results were confirmed in the Oxa colitis model, where colitis was again more severe in KO mice than WT mice. On day 8, KO mice had lower body weight than WT mice (88.2±4.4 vs 97.1±1.8, $p=0.19$, figure 3A). The severity score both macroscopically (9.6±0.9 vs 6.1±0.8, $p<0.05$, figure 3B) and microscopically (9.0±0.8 vs 5.9±1.1, $p<0.05$, figure 3C) also showed that there was more inflammation in KO mice.

Hp deficiency enhances production of inflammatory cytokines in colon

To explain the above findings, expression of inflammatory cytokines related to the pathogenesis of colitis was measured in colon tissue. Colonic mRNA of IL-17, IFN γ , TNF and IL-6 was higher in KO mice with DSS colitis, and IL-13 mRNA was slightly higher in KO mice with Oxa colitis, than in the respective controls. Neither difference was, however, statistically significant (figure 4). mRNA expression of IL-10, IL-4, IL-12p35 and TGF β was similar in the two groups (data not shown).

Because of the difference in IL-17 mRNA levels and the prominent role proposed for IL-17 in disease pathogenesis,^{32–34} we used an in vitro cell culture assay and tested IL-17 production by isolated MLN cells by ELISA. Cells from mice with Oxa-induced colitis produced less IL-17 than cells from mice with DSS-induced colitis. We found that IL-23 promoted IL-17 production strongly in cell cultures from KO mice ($p<0.05$ and $p<0.01$ for DSS and Oxa colitis, respectively), but not from the WT groups (figure 5A). As Hp deficiency seemed to promote Th17 responses in colitis, we also explored whether in vitro Th17 differentiation ‘capacity’ is increased in the KO mice. However, after TGF β and IL-6 co-culture and addition of IL-21, we did not find any significant differences in Th17 differentiation between the two groups (data not shown). We also studied the influence of serum Hp on IL-17 production by culturing MLN cells with serum from either KO mice or WT mice (mouse serum collected shortly after lipopolysaccharide injection to enhance Hp levels). IL-17 production was significantly higher in the presence of Hp-deficient serum than WT serum (9123±2058 vs 3583±512.6, $p<0.05$, figure 5B).

DISCUSSION

In this study, we investigated whether Hp polymorphism influences susceptibility to IBD and we explored the modulatory effect of Hp in murine colitis. We demonstrated that Hp2 is a risk allele for IBD, with a higher frequency in CD and UC compared with controls. Hp2 was also over-transmitted to affected offspring in IBD and CD trios. In UC trios, the over-transmission—although numerically present—lacked significance, probably because of the smaller size of the group. No association was found with phenotypic characteristics of the disease.

Until now, the results that have been published on Hp polymorphisms and IBD have been contradictory. Our results agree with data published by Maza *et al*, who found that genotype 11 was significantly less common in CD,¹⁵ as was also shown in

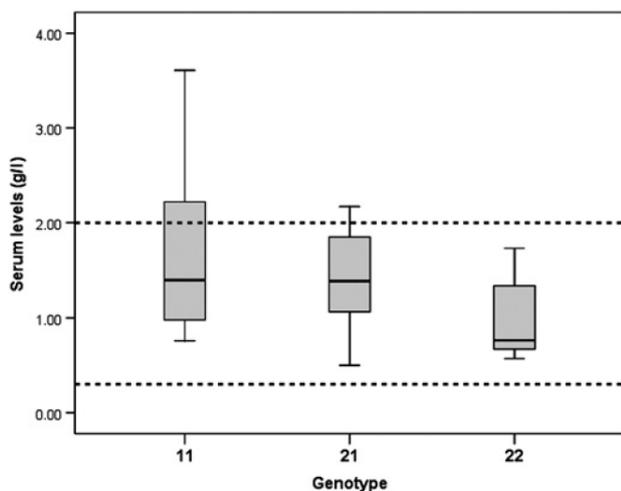
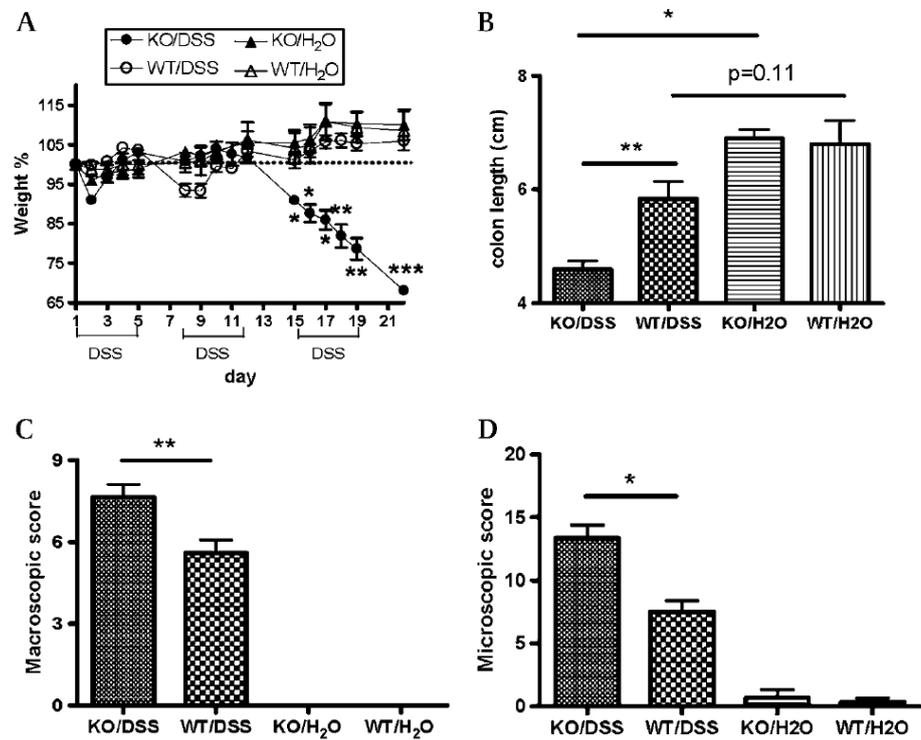


Figure 1 Serum levels of haptoglobin in healthy controls for each genotype. Values represent medians.

Figure 2 Dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in wild-type (WT) and *Hp*^{-/-} (KO) mice. Mice were given 3% DSS in drinking water in three cycles of 5 days each followed by 2 days normal tap water interval. Control groups were given tap water throughout. Mice were killed on day 22. (A) Weight evolution is shown as a percentage of the original weight. The DSS-treated group contained 15 KO and 15 WT mice. The control (H₂O) groups consisted of three WT and three KO mice (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, KO vs WT DSS treated); data were pooled from three experiments. (B) Colon length: colon was dissected and length was measured from the ileocaecal junction to the anus. Data from three experiments are shown as mean±SEM. DSS-treated groups each contained 10–11 mice, and untreated groups contained three mice each (**p*<0.05, ***p*<0.01). (C) Macroscopic and (D) microscopic scores of DSS colitis. Mice were killed on day 22, and colons were resected for histological evaluation. Data from three experiments are pooled and results shown as mean±SEM. DSS-treated groups each contained 10–11 mice, and untreated groups contained three mice each (**p*<0.05, ***p*<0.01).



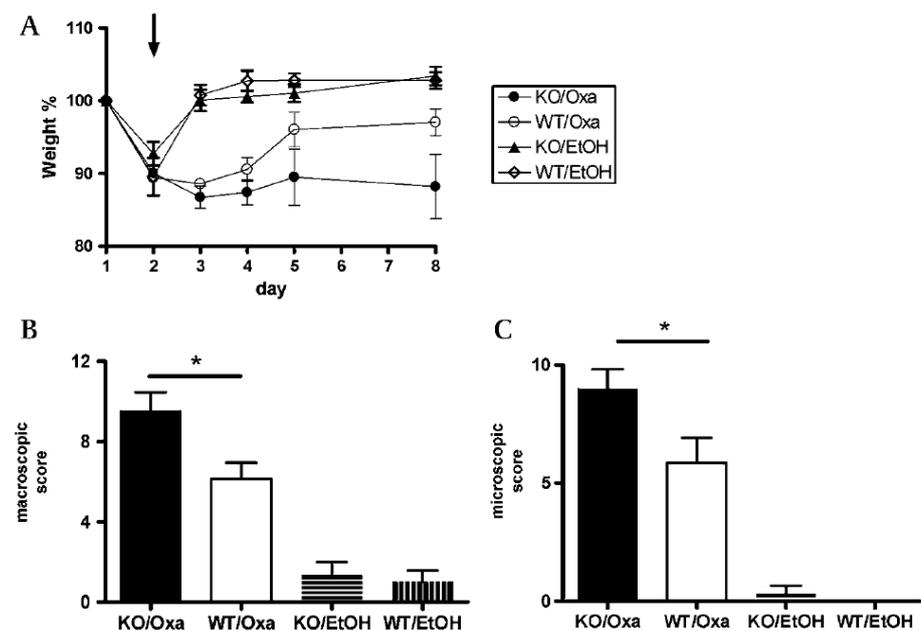
other immune-based diseases.^{2 3 35} However, the results contradict those reported for a Hungarian cohort, where a higher frequency of genotype 11 was found in CD.¹⁶ No data on this polymorphism in UC have been published so far.

Regarding PSC, we found that *Hp2* and *Hp22* were more common in patients with this condition than in controls, as reported by Papp *et al.*¹⁶ However, after exclusion of patients

who also had IBD, the differences among the genotypes were not significant, suggesting that either the differences observed were mainly driven by IBD or the study had insufficient power because of small groups.

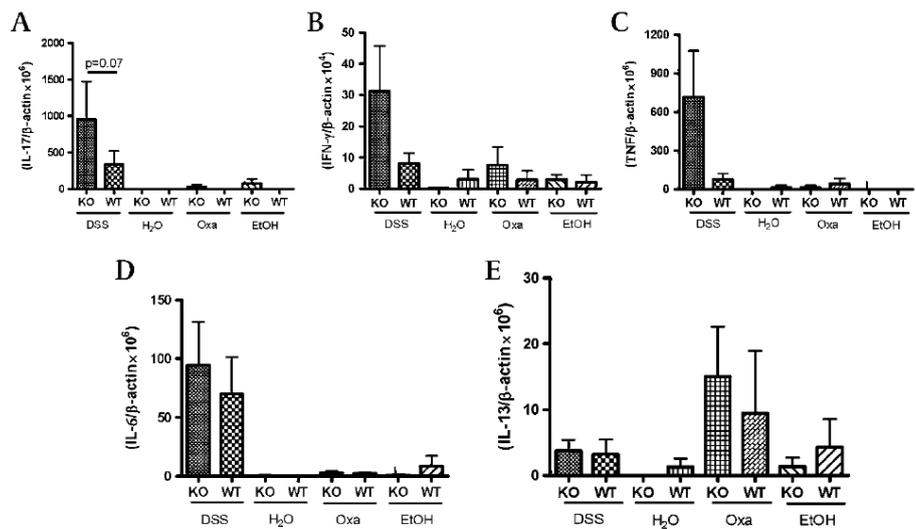
The *Hp* locus was not picked up in any of the genome-wide association studies performed in IBD^{36–38} or recently published CD genome-wide association meta-analyses.³⁹ This might be

Figure 3 Oxazolone (Oxa)-induced colitis in wild-type (WT) and *Hp*^{-/-} (KO) mice. Colitis was induced with Oxa as described in the Materials and methods section. Mice were first skin sensitised followed by an intrarectal challenge with 1 mg Oxa (arrow). Control mice were intrarectally challenged with 50% ethanol (the vehicle for Oxa). In some of the experiments, mice were killed on day 4 for analysis. (A) Body weight was recorded daily until the end of the experiment. Each group contained three to five mice. (B) Macroscopic and (C) microscopic scores of colitis severity. Mice were killed, and colons were resected for histological evaluation on day 4 (**p*<0.05).



Paper

Figure 4 Colonic mRNA expression of cytokines in wild-type (WT) and *Hp*^{-/-} (KO) mice with dextran sulphate sodium (DSS)- and oxazolone (Oxa)-induced colitis. mRNA for interleukin (IL)-17 (A), interferon (IFN) γ (B), tumour necrosis factor (TNF) (C), IL-6 (D) and IL-13 (E) normalised to β -actin mRNA are shown as mean \pm SEM. Each column contains data from five to nine mice. Water was the control for DSS-induced colitis, and ethanol was the control for Oxa-induced colitis.



explained by the fact that this polymorphism is not a single-nucleotide polymorphism, but an intragenic duplication, which may not have been covered by the single-nucleotide polymorphisms selected on the 6q22 region. However, the region was present in two genome-wide linkage studies^{40, 41} and also in a genome-wide linkage study meta-analysis.⁴²

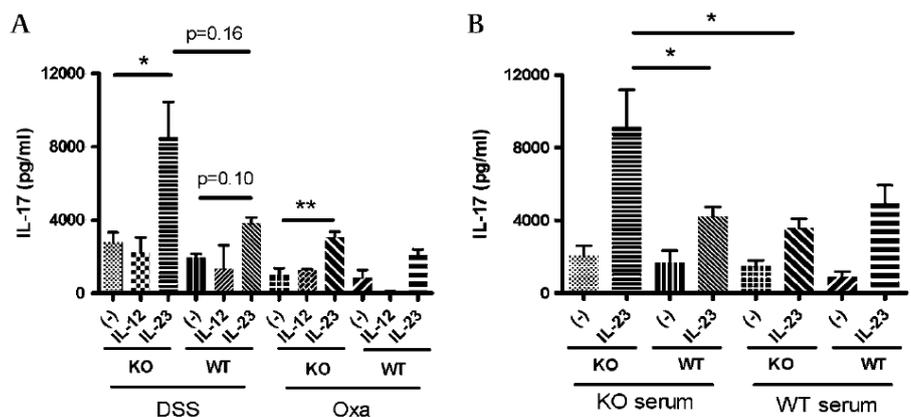
Serum levels of Hp were significantly lower in people with genotype *Hp*22. The different subtypes of Hp have different molecular mass and different structures depending on the genotype. These differences affect serum levels and they have been related to the lower anti-inflammatory capacity of *Hp*2. Different correction factors have been proposed,⁴³ although it is still not clear how exactly the corrections should be applied. Therefore we may be underestimating the real differences between the genotypes. Moreover, the concentrations of *Hp*22 in inflamed tissues may also be lower because of the higher molecular mass and therefore lower tendency to leave the vessels.

To corroborate the human findings, we explored whether Hp influences development and/or severity of inflammatory colitis in experimental models. Results in two different mouse models, induced by DSS or Oxa, showed that Hp has a protective effect against the severity of experimental colitis. This was evidenced

by more weight loss and higher macroscopic and histological scores in *Hp* KO mice. In *Hp*-deficient mice, there was higher mRNA expression of IL-17, IFN γ , TNF and IL-6 in DSS-induced colitis, and of IL-13 in Oxa-induced colitis (although differences were not statistically significant, probably because of small sample size). Collectively, these results suggest that Hp plays an important modulatory and protective role in inflammatory colitis by inhibiting the production of several cytokines. Hp has indeed been demonstrated to modulate several aspects of the immune response and to have anti-inflammatory activities. Our laboratory previously reported that Hp has the ability to suppress monocyte production of TNF, IL-10 and IL-12.³⁹ In vivo, in a model of lipopolysaccharide-induced bronchopulmonary hyper-reactivity and endotoxic shock, *Hp* KO mice were more sensitive than their WT counterparts.⁴⁴ We also provided evidence for a protective effect of Hp against experimental autoimmune encephalomyelitis, a model characterised by raised proinflammatory cytokines such as IFN γ , IL-23, IL-12 and IL-17 in the brain.⁴ Altogether, Hp seems to have a protective role in reducing the severity of Th1/17-mediated inflammatory processes.

Neutralisation of particular cytokines has been shown to be effective in patients with IBD, especially anti-TNF or anti-p40. IL-17 is another potential target, although the causative

Figure 5 Interleukin (IL)-17 production by mesenteric lymph node (MLN) cells from wild-type (WT) and *Hp*^{-/-} (KO) mice with dextran sulphate sodium (DSS)- and oxazolone (Oxa)-induced colitis. (A) After colitis induction, mice were killed (day 22 in DSS colitis and day 4 in Oxa colitis), and MLN cell suspensions were prepared. Cells were adjusted to 1×10^6 /ml and cultured in the presence of monoclonal antibodies to CD3 and CD28, and with IL-12 or IL-23 as indicated. After 3 days of culture, supernatants were collected, and IL-17 was measured by ELISA. Data are shown as mean \pm SEM with three to six mice in each condition. Data were pooled from two experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) A similar experiment was set up with MLN cells from *Hp* KO mice with DSS colitis, but this time in the presence of either *Hp* KO serum or WT serum (* $p < 0.05$).



relationship between IBD and IL-17 remains unclear. In humans, higher IL-17 production was found in colon mucosa from patients with IBD.⁴⁵ Antibodies to IL-12/23 p40 have been associated with a reduction in serum IL-17 levels in these patients.⁴⁶ In mice, trinitrobenzenesulphonate- and DSS-induced colitis were less severe in IL-17 KO mice.^{47, 48} Therefore we investigated whether the protective effect of Hp in colitis might be IL-17 mediated. IL-23 has been shown to be required for survival and effector functions of Th17 cells, rather than for their differentiation.^{49, 50} We found that IL-23 significantly enhanced IL-17 production by MLN cells from KO mice (but not WT mice) with colitis, pointing to a high number of IL-17-producing cells in KO mice. Although this effect was also seen in MLN cell cultures from mice with Oxa-induced colitis, the IL-17 production was 2–3 times lower in Oxa than DSS colitis. This is compatible with a previous report on the predominance of Th2 responses in Oxa-induced colitis.¹⁸ Furthermore, WT but not KO serum inhibited IL-17 production. Taken together, the data suggest that Hp KO mice preferentially develop Th17 immune responses and that Hp modulates Th17 cells. However, these findings do not exclude the possibility that Hp also affects other steps in the inflammatory cascade.

The Hp polymorphism is only present in humans. Therefore it is difficult to directly link mouse and human data. Hp in mice is believed to resemble the human Hp11, with over 90% homology with the human Hp1 allele.³ WT mice would thus behave more like Hp11 in humans and KO mice like Hp22, although this remains speculative.

In conclusion, we have demonstrated that Hp polymorphisms are implicated in IBD susceptibility. Hp2 is therefore not only a risk allele for rheumatoid arthritis and diabetes, but also for CD and UC. Further studies are needed to elucidate how these polymorphisms affect disease pathogenesis. One possible explanation is linked to the immunomodulatory effect of Hp. We have indeed shown that Hp has a role in reducing the severity of inflammation in two different colitis models and modulates IL-17 production, a cytokine thought to be highly important in the pathogenesis of IBD.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval This study was conducted with the approval of the ethics committee of the University of Leuven/Gasthuisberg Hospital.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;**361**:2066–78.
- Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* 2004;**121**(Suppl):S97–104.
- Levy AP, Asleh R, Blum S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal* 2010;**12**:293–304.
- Galicía G, Maes W, Verbinen B, et al. Haptoglobin deficiency facilitates the development of autoimmune inflammation. *Eur J Immunol* 2009;**39**:3404–12.
- Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J, et al. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 2004;**345**:35–42.
- Maeda N, Yang F, Barnett DR, et al. Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* 1984;**309**:131–5.
- Koch W, Latz W, Eichinger M, et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 2002;**48**:1377–82.
- Soejima M, Koda Y. TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin (HP1 and HP2). *Clin Chem* 2008;**54**:1908–13.
- Arredouani M, Matthys P, Kasran A, et al. Haptoglobin and the Th1/Th2 balance: hints from in vitro and in vivo studies. *Redox Rep* 2001;**6**:369–71.
- Arredouani M, Matthys P, Van Hoeyveld E, et al. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 2003;**108**:144–51.
- Guetta J, Strauss M, Levy NS, et al. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007;**191**:48–53.
- Dayan L, Levy AP, Blum S, et al. Haptoglobin genotype and endothelial function in diabetes mellitus: a pilot study. *Eur J Appl Physiol* 2009;**106**:639–44.
- Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996;**42**:1589–600.
- Pavon EJ, Munoz P, Lario A, et al. Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms. *Proteomics* 2006;**6**(Suppl 1):S282–92.
- Maza I, Miller-Lotan R, Levy AP, et al. The association of Haptoglobin polymorphism with Crohn's disease in Israel. *J Crohns Colitis* 2008;**2**:214–18.
- Papp M, Lakatos PL, Palatka K, et al; Hungarian IBD Study Group. Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. *Dig Dis Sci* 2007;**52**:1279–84.
- Lim SK, Kim SH, Lim SK, et al. Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* 1998;**92**:1870–7.
- Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, et al. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;**188**:1929–39.
- 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.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53.
- Wiesner RH, LaRusso NF. Clinicopathologic features of the syndrome of primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 1980;**79**:200–6.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:1215.
- Mourelle M, Guamer F, Malagelada JR. Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model of colitis. *Gastroenterology* 1996;**110**:1093–7.
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997;**107**:353–8.
- Shen C, Bullens D, Kasran A, et al. Inhibition of glycolipid biosynthesis by N-(5-adamantane-1-yl-methoxy-pentyl)-deoxyrymycin protects against the inflammatory response in hapten-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 2004;**4**:939–51.
- Shen C, de HG, Bullens DM, et al. Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization? *Inflamm Bowel Dis* 2007;**13**:308–16.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;**448**:484–7.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;**448**:480–3.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;**21**:263–5.
- Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000;**19**(Suppl 1):S36–42.
- Purcell S, Sham P, Daly MJ. Parental phenotypes in family-based association analysis. *Am J Hum Genet* 2005;**76**:249–59.
- Qian Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17 dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* 2007;**8**:247–56.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;**116**:1310–16.
- Takedatsu H, Michelsen KS, Wei B, et al. TLR1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. *Gastroenterology* 2008;**135**:552–67.
- Kasvosve I, Speeckaert MM, Speeckaert R, et al. Haptoglobin polymorphism and infection. *Adv Clin Chem* 2010;**50**:23–46.
- McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;**42**:332–7.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;**40**:955–62.
- Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;**41**:216–20.
- Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;**42**:1118–25.
- Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:7502–7.
- Williams CN, Kocher K, Lander ES, et al. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* 2002;**8**:375–81.
- Van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, et al; Genome Scan Meta-Analysis Group of the IBD International Genetics Consortium. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:763–70.

Paper

43. **Van Rijn HJ**, Van Der Wilt W, Stroes JW, *et al.* Is the turbidimetric immunoassay of haptoglobin phenotype-dependent? *Clin Biochem* 1987;**20**:245–8.
44. **Arredouani MS**, Kasran A, Vanoirbeek JA, *et al.* Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology* 2005;**114**:263–71.
45. **Fujino S**, Andoh A, Bamba S, *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;**52**:65–70.
46. **Fuss IJ**, Becker C, Yang Z, *et al.* Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:9–15.
47. **Ito R**, Kita M, Shin-Ya M, *et al.* Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**377**:12–16.
48. **Zhang Z**, Zheng M, Bindas J, *et al.* Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:382–8.
49. **Veldhoen M**, Hocking RJ, Atkins CJ, *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;**24**:179–89.
50. **Veldhoen M**, Hocking RJ, Flavell RA, *et al.* Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 2006;**7**:1151–6.

Figure 1, supplementary methods. Ethidium bromide stained 1% agarose gel of *Hp* genotypes 11, 21 and 22.

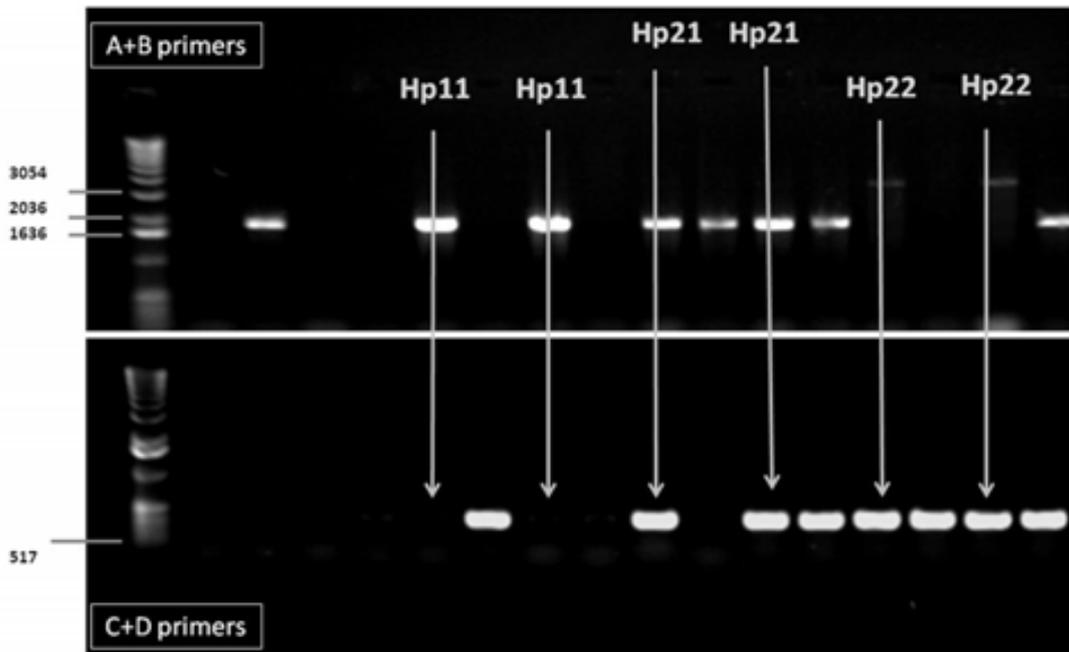
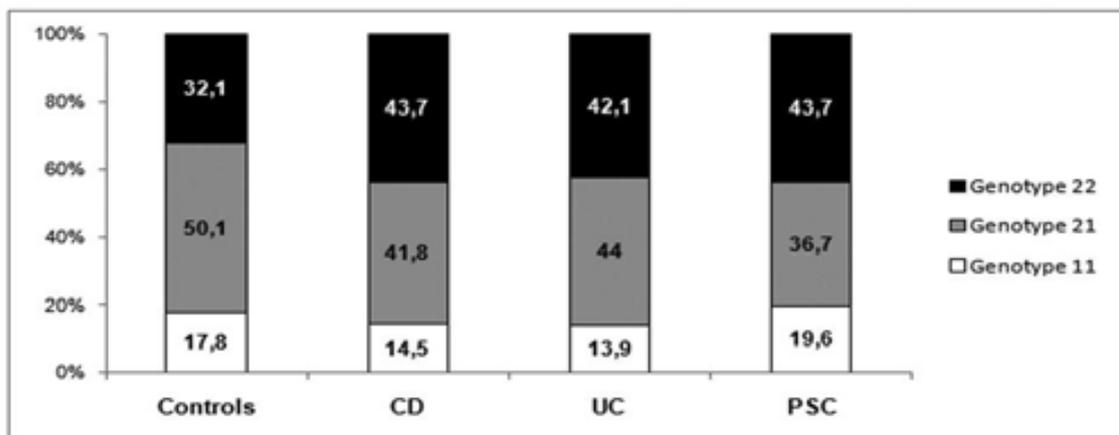


Figure 2, supplementary methods. *Hp* genotype distribution (%) in CD (n=1061), UC (n=755), PSC (n=160) and controls (n=452).



10 DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral ha pretendido profundizar en el estudio del SE y la Hp, que han demostrado, en estudios *in vitro* y en modelos experimentales en animales, tener un potencial papel antiinflamatorio en enfermedades de base inmunológica.

En la primera parte del proyecto se ha descrito la expresión de todos los componentes del SE en tejido colónico normal y, posteriormente, se han estudiado los cambios que se producen en la fase activa de la CU y sus variaciones en los mismos individuos en la fase quiescente, tras recibir tratamiento médico.

En la segunda parte del proyecto se ha investigado el papel genético y funcional de la Hp en la EII, mediante el estudio de su polimorfismo en pacientes con EII y, posteriormente, mediante el desarrollo de dos modelos animales murinos de EII con ratones deficientes (KO) para el gen de la Hp.

En primer lugar, se ha realizado una descripción detallada de la distribución de todos los componentes del SE en tejido colónico procedente de individuos sanos, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos sobre la distribución de los receptores CB1 y CB2 son equiparables a los estudios en humanos y animales publicados previamente^{51,81-83}. Cabe destacar la descripción, por primera vez, de la presencia de receptores CB1 en las células "goblet" y la identificación de este receptor tanto en los cuerpos neuronales y fibras nerviosas de los plexos mientérico y submucoso, no sólo en las terminales presinápticas, como había sido descrito hasta la fecha^{51,81,83}.

Los receptores CB2 se han identificado en células epiteliales, fundamentalmente en el borde absortivo, como había sido descrito previamente por Wright y col⁵¹. Como novedades destacan la localización estos receptores en las células de Paneth y en los plexos mientérico y submucoso.

Se ha identificado la presencia de los enzimas de degradación de endocannabinoides, FAAH y MAGL, en tejido colónico normal. FAAH fundamentalmente en células plasmáticas de la lámina propia y en células ganglionares del sistema nervioso entérico, lo que podría estar relacionado con el hecho de que bloqueantes de FAAH como URB597 reduzcan significativamente la inflamación en el colon de ratones⁸⁴ e inhibidores selectivos de FAAH como AA-5-HT inhiban la motilidad intestinal⁸⁵.

MAGL se ha localizado en las células epiteliales y en PMN de la lámina propia, hecho que no se había descrito con anterioridad. En contraste con lo publicado por Duncan y col, no se observó inmunoreactividad de MAGL en músculo liso ni capas de la mucosa, pero sí en fibras de sistema nervioso entérico⁸⁶.

El estudio incluye, además, el primer análisis, publicado hasta la fecha, de la presencia de enzimas de síntesis del SE (DAGL- α , DAGL- β , NAPE-PLD) en tejido colónico en humanos.

Todos ellos se distribuyeron de forma similar a los receptores CB1, ya que se localizaban en células epiteliales, células plasmáticas de la lámina propia y plexos mientéricos. Estos resultados sugieren la existencia de una síntesis activa de endocannabinoides como AEA y 2-AG en tejido colónico de individuos sanos, lo que apoyaría la hipótesis de la existencia de un tono endocannabinoide en condiciones normales, que se modificaría tras el estímulo inflamatorio.

Posteriormente, se han estudiado las diferencias en la distribución y expresión de todos estos componentes del SE en pacientes con CU, durante el brote agudo, sin haber iniciado ningún tipo de tratamiento, y en fase quiescente, teniendo en cuenta el tratamiento recibido.

En pacientes con CU en fase activa, se observó un aumento de receptores CB2, pero no de CB1, sobre todo en aquellos pacientes con colitis clínicamente leve o moderada. Se evidenció también un descenso de la expresión de NAPE-PLD y no se observaron cambios en el enzima de degradación FAAH. Todo ello sugiere un aumento de la degradación de AEA, como se deduce del decremento del ratio NAPE-PLD/FAAH.

Estos hallazgos son discrepantes con los publicados por D'Argenio y col., que encontraron altos niveles de AEA en biopsias de colon de pacientes con CU no tratados⁶¹. Es posible que estas discrepancias se puedan explicar por el hecho de que NAPE-PLD no es la única fuente de AEA, si no que otros enzimas también son capaces de sintetizarla.

Con respecto a 2-AG, se ha observado un aumento de la expresión de DAGL- α y MAGL en la mucosa de pacientes con un brote agudo de CU, lo que sugiere un aumento del recambio ("turn-over") de 2-AG durante la inflamación. Pero, al contrario que con la AEA, no se produjo una disminución en los niveles de 2-AG, como sugiere la ausencia de cambios en el ratio DAGL α - β /MAGL.

Es interesante destacar que los pacientes con características clínicas de brote severo no presentaban un aumento en la expresión de receptores CB2 ni un aumento del

recambio de 2-AG (no se modifican los enzimas de síntesis ni de degradación). Por lo tanto, parece existir una disminución del tono endocannabinoide como consecuencia de la agresión inflamatoria, lo que sugiere que el desarrollo de fármacos que potencien el “turn-over” de endocannabinoides podría ser útil en este subgrupo de pacientes.

En cuanto a la expresión del SE en pacientes con CU en fase quiescente, tras haber recibido tratamiento, se ha observado fundamentalmente una vuelta a la normalidad de los niveles de receptores CB2, lo que sugiere un papel de estos receptores en la mediación de la respuesta inflamatoria. Además, los tratamientos, sobre todo la combinación de 5-ASA y esteroides, correspondiente al grupo más numeroso de pacientes, llevaban a un descenso de la expresión de receptores CB1, que probablemente refleja una disminución de la funcionalidad colónica (secreción y motilidad) en fases crónicas de la enfermedad^{85,87}. Por lo tanto CB1 podría ser un marcador biológico de la progresión de la CU.

En cuanto al sistema 2-AG, la expresión de DAGL- α y MAGL se ha mantenido por encima de la normalidad, independientemente del tratamiento recibido.

La expresión de NAPE-PLD se recuperó hasta niveles normales y la de FAAH no se modifica, lo que sugiere que tras recibir tratamiento se produce una recuperación parcial de la desregulación de los niveles de AEA.

En resumen, la demostración de la existencia de todos los componentes del SE en tejido colónico de individuos sanos, sugiere la presencia de un tono endocannabinoide intestinal basal en condiciones normales. En los pacientes con CU el SR sufriría modificaciones, tanto en la fase activa como en la fase quiescente. Probablemente, mediante la expresión de receptores CB2, ejercería un efecto contrarregulador dirigido a reducir la colitis asociada a la inflamación. Además, el resto de los cambios observados en los otros componentes del sistema sugieren que el desarrollo de fármacos que, o bien a través del bloqueo de los enzimas de degradación, o bien del estímulo de los enzimas de síntesis, aumenten el tono endocannabinoide, podrían tener potenciales efectos antiinflamatorios en la EII.

En el segundo estudio incluido en esta Tesis Doctoral, el primer objetivo ha sido determinar si el polimorfismo de la Hp tiene alguna influencia sobre la susceptibilidad para padecer EII. Para ello se ha estudiado la distribución de los alelos Hp1 y Hp2 y la frecuencia de los genotipos Hp11, Hp21 y Hp22, en pacientes con EC, CU y CEP.

Se ha demostrado que Hp2 es un alelo de riesgo para la EII, con una elevada frecuencia en EC y CU, ambos comparados con individuos sanos.

Además, Hp2 se transmitía con mayor frecuencia que Hp1 a los descendientes afectados en tríos con EII y tríos con EC. En tríos con CU, aunque Hp2 se transmitía con mayor frecuencia a los descendientes, las diferencias no eran estadísticamente significativas, probablemente debido al menor tamaño del grupo.

No se observó ninguna asociación entre la distribución alélica y las características fenotípicas de la enfermedad.

Hasta el momento, los resultados que habían sido publicados en relación al polimorfismo de la Hp y la EII eran contradictorios.

Nuestros resultados están en consonancia con los datos previamente publicados por Maza y col., que demostraron que el genotipo Hp11 era significativamente menos frecuente en pacientes con EC⁸⁰, resultados similares a los obtenidos en el estudio de otras enfermedades de base inmunológica^{65,66,88}. Nuestros resultados son, por lo tanto, diferentes a los publicados por el grupo de Papp y col., que describían una mayor frecuencia del genotipo 11 en la EC⁷⁹. Hasta la fecha no se han publicado resultados relativos a este polimorfismo en la CU.

Con respecto a la CEP, el alelo Hp2 y el genotipo 22 eran más frecuentes en estos pacientes, esta vez sí en concordancia con lo publicado por Papp y col.⁷⁹. Pero tras excluir del análisis a aquellos pacientes que presentaban a la vez EII, las diferencias entre los grupos no fueron significativas, por lo que creemos que las diferencias eran debidas a la asociación con EII.

El locus del gen de la Hp, no ha resultado estadísticamente significativo en ninguno de los recientes GWAs^{14,89,90} o meta-análisis de GWAs¹⁵ realizados en EII. Una posible explicación es el hecho de que este polimorfismo no es un SNP, si no una duplicación intragénica⁷¹, por lo que no habría estado cubierto por los SNPs seleccionados en la región 6q22. Sin embargo, este locus sí está incluido en los resultados de dos *Genome wide linkage studies*^{91,92} y en su meta-análisis⁹³.

Para tratar de dilucidar el significado funcional de la Hp se realizaron dos estudios. En primer lugar, se determinaron los niveles séricos de Hp en individuos normales de cada genotipo. Los niveles séricos de Hp fueron significativamente inferiores en aquellos individuos con genotipo 22. Pero los diferentes subtipos de Hp tienen diferentes estructuras y pesos moleculares dependiendo del genotipo, y estas diferencias han podido influir en la determinación de sus niveles séricos. Se han propuesto diferentes factores de corrección⁹⁴, aunque no está claro cual de ellos debe aplicarse, por lo que se podrían haber subestimado las diferencias reales entre los genotipos.

En segundo lugar, para tratar de evaluar el papel funcional de la Hp en la EII, se estudió la influencia de la Hp en el desarrollo y severidad de la colitis inflamatoria en modelos experimentales animales.

Se estudiaron dos modelos de EII en ratones: colitis inducida por DSS y colitis inducida por OXA. En ambos modelos se demostró que la Hp tiene un papel protector en el desarrollo de la colitis experimental, evidenciado por una mayor pérdida de peso y mayores lesiones histológicas y macroscópicas en aquellos ratones KO para el gen de la Hp. Además, estos ratones KO para el gen de la Hp presentaban mayores niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias: IL-17, INF- λ , TNF e IL-6 en la colitis inducida por DSS, e IL-13 en la colitis inducida por OXA.

Todos estos resultados, junto con los datos publicados previamente, sugieren un papel protector e inmunomodulador de la Hp en la colitis inflamatoria experimental, fundamentalmente mediante la inhibición de la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias^{67,95}.

Dado el papel central de los linfocitos Th17 y las citoquinas IL-23/IL-17 en la fisiopatología de la EII^{35,96}, la disminución de los niveles de IL-17 en ratones KO para el gen de la Hp en la EAE⁶⁷, y el desarrollo de formas menos severas de colitis inducida por TNBS y DSS en ratones KO para IL-17^{97,98}, se investigó si el efecto⁶⁶ protector de la Hp en la colitis podría estar mediado por la supresión de la IL-17.

En el modelo de colitis inducida por DSS, tras añadir IL-23, se aumentó significativamente la producción de IL-17 por células mononucleares de ratones KO para el gen de la Hp, pero no en los ratones WT.

En el modelo de colitis inducida por OXA, la producción de IL-17 fue 2-3 veces más baja, pero hay que tener en cuenta que se trata de un modelo en el que la respuesta inflamatoria está mediada predominantemente por Th2.

Valorando estos datos conjuntamente, parece que en los ratones KO para el gen de la Hp se desarrollaría de forma preferente una respuesta inmunológica mediada por linfocitos Th17 y que Hp modularía la liberación de IL-17 por estos linfocitos. Aunque todos estos hallazgos no excluyen la posibilidad de que la Hp tenga también efectos en otros puntos del proceso inflamatorio.

El polimorfismo estudiado sólo está presente en humanos, por lo que es difícil enlazar directamente los resultados en humanos y en ratones. La Hp presente en el suero de ratones es muy similar a la Hp11 humana. Su estructura es homóloga en un 90% al

alelo Hp1 humano⁶⁶. Por lo tanto los ratones WT para el gen de la Hp se comportarían como los individuos con Hp11 y los ratones KO para el gen de la Hp como Hp22.

En conclusión, se ha demostrado que el polimorfismo del gen de la Hp está implicado en la susceptibilidad genética a padecer EII. El alelo Hp2 sería, por lo tanto, un alelo de riesgo en la EC y en la CU, al igual que había sido descrito en otras enfermedades de base inmunológica como la AR y la DM.

Será necesario profundizar en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes para aclarar como este polimorfismo afecta a la patogenia de la EII.

Además, se ha demostrado que la Hp tiene un papel en la reducción de la severidad de la inflamación en dos modelos murinos de colitis experimental, lo que sugiere que podría ser una potencial diana terapéutica en pacientes con EII.

11 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios experimentales que componen esta Tesis Doctoral, permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha descrito por primera vez la presencia, en condiciones normales, de todos los componentes del SE (receptores, enzimas de síntesis, enzimas de degradación) en la mucosa colónica:
 - Los receptores CB1 se localizan en las células “goblet”, y los receptores CB2 en las células de Paneth y en los plexos neuroentéricos.
 - Los enzimas de degradación se expresan en la mucosa colónica, FAAH se localiza en las células plasmáticas de la lámina propia y MAGL se localiza en PMN de la lámina propia.
 - Los enzimas de síntesis (NAPE-PLD, DAGL- α , DAGL- β) se expresan en las células epiteliales y en ambos plexos mientéricos.
- Se ha demostrado por primera vez la existencia de un tono endocannabinoide basal que se modifica en pacientes con CU, tanto en la fase activa de la enfermedad, antes de recibir cualquier tipo de tratamiento médico, como en la fase quiescente:
 - En pacientes con CU leve-moderada, en la fase activa, existe un aumento de la expresión de receptores CB2, cuyos niveles se recuperan en la fase quiescente.
 - En la fase activa, existe una disminución de la expresión de NAPE-PLD y un aumento de DAGL- α y MAGL.
 - En la fase quiescente, la elevación de DAGL- α y MAGL se mantiene y además se produce un aumento de la expresión de NAPE-PLD.

En resumen, los componentes del SE se modifican durante la inflamación, tanto en la fase activa como en la fase quiescente de la CU. Fundamentalmente se produce un aumento de la expresión de los receptores CB2, que tendrían una función antiinflamatoria. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos que aumenten el tono endocannabinoide durante la inflamación, podría ser una nueva vía de investigación en la terapéutica de la EII.

- En el polimorfismo del gen de la Hp, se ha evidenciado por primera vez que el alelo Hp2 es un alelo de riesgo para el desarrollo de EII. Estos resultados se han confirmado en tríos familiares de EII, en los que el alelo Hp2 se transmite a los descendientes con mayor frecuencia que el alelo Hp1.
- Con respecto al papel funcional de este polimorfismo, los valores séricos de Hp son inferiores en aquellos pacientes con genotipo 22.
- Se han desarrollado dos modelos murinos de colitis experimental (DSS y OXA) en los que se ha demostrado que la Hp tiene un papel protector en el desarrollo de la colitis.
- En ratones KO para el gen de la Hp, los niveles de mRNA de IL-17, INF- γ , TNF e IL-6 en colitis inducida con DSS y los niveles de mRNA de IL-13 en colitis inducida con OXA se encuentran elevados.
- En la colitis inducida con DSS, en los ratones KO para el gen de la Hp, al añadir IL-23, aumenta significativamente la producción de IL-17.

En resumen, el polimorfismo de la Hp está implicado en la susceptibilidad genética a padecer EII, lo que subraya la existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes con otras enfermedades de base inmunológica. Además, Hp desempeña un papel en la reducción de la severidad de la inflamación en la colitis experimental y modula la producción de IL-17, por lo que podría tener potenciales aplicaciones terapéuticas en la EII.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Sands, B.E. & Grabert, S. Epidemiology of inflammatory bowel disease and overview of pathogenesis. *Med Health R I* **92**, 73-7 (2009).
2. Danese, S. & Fiocchi, C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* **365**, 1713-25 (2011).
3. Loftus, E.V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504-17 (2004).
4. Russell, R.K. & Satsangi, J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 525-39 (2004).
5. Baumgart, D.C. & Carding, S.R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627-40 (2007).
6. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307-17 (2011).
7. Abraham, C. & Cho, J.H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**, 2066-78 (2009).
8. Danese, S. et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **11**, 7227-36 (2005).
9. Geboes, K. et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* **47**, 404-9 (2000).
10. Pierik, M. et al. Epithelioid granulomas, pattern recognition receptors, and phenotypes of Crohn's disease. *Gut* **54**, 223-7 (2005).
11. Baumgart, D.C. & Sandborn, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641-57 (2007).
12. Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-34 (2007).
13. Anderson, C.A. et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* **43**, 246-52 (2011).
14. Barrett, J.C. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* **40**, 955-62 (2008).
15. Franke, A. et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* **42**, 1118-25 (2010).
16. Lees, C.W., Barrett, J.C., Parkes, M. & Satsangi, J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* **60**, 1739-53 (2011).
17. Hsu, Y.M. et al. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**, 198-205 (2007).
18. Levine, B. & Deretic, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767-77 (2007).
19. Lesage, S. et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **70**, 845-57 (2002).

20. Abraham, C. & Cho, J.H. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 641-50 (2006).
21. Hampe, J. et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* **39**, 207-11 (2007).
22. Parkes, M. et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* **39**, 830-2 (2007).
23. Rioux, J.D. et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* **39**, 596-604 (2007).
24. Franke, A. et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* **40**, 1319-23 (2008).
25. Glocker, E.O. et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* **361**, 2033-45 (2009).
26. Thompson, A.I. & Lees, C.W. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 831-48 (2011).
27. Louis, E., Libioulle, C., Reenaers, C., Belaiche, J. & Georges, M. Genetics of ulcerative colitis: the come-back of interleukin 10. *Gut* **58**, 1173-6 (2009).
28. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-74 (1993).
29. Uhlig, H.H. et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* **177**, 5852-60 (2006).
30. Toyoda, H. et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **104**, 741-8 (1993).
31. Satsangi, J. et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* **347**, 1212-7 (1996).
32. Roussomoustakaki, M. et al. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **112**, 1845-53 (1997).
33. Bouma, G. et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* **115**, 294-300 (1999).
34. Silverberg, M.S. et al. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **9**, 1-9 (2003).
35. Brand, S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* **58**, 1152-67 (2009).
36. Elson, C.O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* **206**, 260-76 (2005).
37. Eckburg, P.B. & Relman, D.A. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* **44**, 256-62 (2007).
38. Frank, D.N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13780-5 (2007).

39. Chassaing, B. & Darfeuille-Michaud, A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1720-28 (2011).
40. McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H. & Radford-Smith, G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 100-13 (2009).
41. Cooney, R. et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* **16**, 90-7 (2010).
42. Rodriguez de Fonseca, F. et al. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol* **40**, 2-14 (2005).
43. Duncan, M., Davison, J.S. & Sharkey, K.A. Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* **22**, 667-83 (2005).
44. Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. & Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561-4 (1990).
45. Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61-5 (1993).
46. Cabral, G.A. & Marciano-Cabral, F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol* **78**, 1192-7 (2005).
47. Pertwee, R.G. & Ross, R.A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**, 101-21 (2002).
48. Ross, R.A. et al. Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 900-7 (2002).
49. Fowler, C.J. et al. The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav* **81**, 248-62 (2005).
50. Bouaboula, M. et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* **312** (Pt 2), 637-41 (1995).
51. Wright, K.L., Duncan, M. & Sharkey, K.A. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* **153**, 263-70 (2008).
52. Izzo, A.A. et al. An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice. *Gastroenterology* **125**, 765-74 (2003).
53. Massa, F. et al. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* **113**, 1202-9 (2004).
54. Massa, F., Storr, M. & Lutz, B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med (Berl)* **83**, 944-54 (2005).
55. Ihenetu, K., Molleman, A., Parsons, M.E. & Whelan, C.J. Inhibition of interleukin-8 release in the human colonic epithelial cell line HT-29 by cannabinoids. *Eur J Pharmacol* **458**, 207-15 (2003).
56. Lunn, C.A., Reich, E.P. & Bober, L. Targeting the CB2 receptor for immune modulation. *Expert Opin Ther Targets* **10**, 653-63 (2006).

57. Mathison, R., Ho, W., Pittman, Q.J., Davison, J.S. & Sharkey, K.A. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* **142**, 1247-54 (2004).
58. Sanson, M., Bueno, L. & Fioramonti, J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 949-56 (2006).
59. Hillsley, K. et al. Activation of the cannabinoid 2 (CB2) receptor inhibits murine mesenteric afferent nerve activity. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 769-77 (2007).
60. Darmani, N.A. et al. Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data, and first human studies. *Neuropharmacology* **48**, 1154-63 (2005).
61. D'Argenio, G. et al. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *Faseb J* **20**, 568-70 (2006).
62. Lunn, C.A. et al. Biology and therapeutic potential of cannabinoid CB2 receptor inverse agonists. *Br J Pharmacol* **153**, 226-39 (2008).
63. Izzo, A.A. & Camilleri, M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* **57**, 1140-55 (2008).
64. Izzo, A.A. & Sharkey, K.A. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* **126**, 21-38 (2010).
65. Sadrzadeh, S.M. & Bozorgmehr, J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* **121 Suppl**, S97-104 (2004).
66. Levy, A.P. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal* **12**, 293-304 (2010).
67. Galicia, G. et al. Haptoglobin deficiency facilitates the development of autoimmune inflammation. *Eur J Immunol* **39**, 3404-12 (2009).
68. Van Vlierberghe, H., Langlois, M. & Delanghe, J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* **345**, 35-42 (2004).
69. Arredouani, M. et al. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* **108**, 144-51 (2003).
70. Arredouani, M., Matthys, P., Kasran, A., Baumann, H. & Ceuppen, J.L. Haptoglobin and the Th1/Th2 balance: hints from in vitro and in vivo studies. *Redox Rep* **6**, 369-71 (2001).
71. Maeda, N., Yang, F., Barnett, D.R., Bowman, B.H. & Smithies, O. Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* **309**, 131-5 (1984).
72. Koch, W. et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* **48**, 1377-82 (2002).
73. Soejima, M. & Koda, Y. TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin (HP1 and HP2). *Clin Chem* **54**, 1908-13 (2008).
74. Carter, K. & Worwood, M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* **29**, 92-110 (2007).
75. Guetta, J., Strauss, M., Levy, N.S., Fahoum, L. & Levy, A.P. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* **191**, 48-53 (2007).

76. Dayan, L. et al. Haptoglobin genotype and endothelial function in diabetes mellitus: a pilot study. *Eur J Appl Physiol* **106**, 639-44 (2009).
77. Pavon, E.J. et al. Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S282-92 (2006).
78. Langlois, M.R. & Delanghe, J.R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* **42**, 1589-600 (1996).
79. Papp, M. et al. Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. *Dig Dis Sci* **52**, 1279-84 (2007).
80. Maza, I. et al. The association of Haptoglobin polymorphism with Crohn's disease in Israel. *J Crohns Colitis* **2**, 214-8 (2008).
81. Casu, M.A. et al. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur J Pharmacol* **459**, 97-105 (2003).
82. Griffin, G. et al. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* **339**, 53-61 (1997).
83. Pinto, L. et al. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* **123**, 227-34 (2002).
84. Storr, M.A. et al. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J Mol Med (Berl)* **86**, 925-36 (2008).
85. Capasso, R. et al. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* **129**, 941-51 (2005).
86. Duncan, M. et al. Distribution and function of monoacylglycerol lipase in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G1255-65 (2008).
87. Izzo, A.A. et al. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* **134**, 563-70 (2001).
88. Kasvosve, I., Speeckaert, M.M., Speeckaert, R., Masukume, G. & Delanghe, J.R. Haptoglobin polymorphism and infection. *Adv Clin Chem* **50**, 23-46 (2010).
89. McGovern, D.P. et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* **42**, 332-7 (2010).
90. Silverberg, M.S. et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* **41**, 216-20 (2009).
91. Cho, J.H. et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7502-7 (1998).
92. Williams, C.N., Kocher, K., Lander, E.S., Daly, M.J. & Rioux, J.D. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* **8**, 375-81 (2002).
93. van Heel, D.A. et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* **13**, 763-70 (2004).
94. van Rijn, H.J., van der Wilt, W., Stroes, J.W. & Schrijver, J. Is the turbidimetric immunoassay of haptoglobin phenotype-dependent? *Clin Biochem* **20**, 245-8 (1987).

95. Arredouani, M.S. et al. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology* **114**, 263-71 (2005).
96. Fujino, S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65-70 (2003).
97. Ito, R. et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 12-6 (2008).
98. Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P. & Kolls, J.K. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 382-8 (2006).