

## Nous mediadors de la resposta T efectora en la malaltia inflamatòria intestinal

Marisol Veny Álvarez-Ossorio

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





Facultat de Biologia  
Departament de Fisiologia  
Programa de Doctorat d'Immunologia  
Bienni 2005-2007

# **NOUS MEDIADORS DE LA RESPOSTA T EFECTORA EN LA MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL**

**Tesi doctoral presentada per Marisol Veny Álvarez-Ossorio per optar  
al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona**

Realitzada al Laboratori de Gastroenterologia Experimental de l'Institut d'Investigacions  
Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

## **Doctoranda**

Marisol Veny Álvarez-Ossorio

## **Directora**

Dra. Azucena Salas Martínez

## **Tutor**

Dr. Jorge Lloberas Calvo

Barcelona 2010

## Índex de continguts

<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>9</b>
EL SISTEMA IMMUNITARI .....	9
Immunitat innata .....	9
Immunitat adquirida .....	11
Limfòcits T CD4 <sup>+</sup> .....	13
Limfòcits Th17 .....	14
IL-17 .....	18
IL-22 .....	19
Funcions de la població Th17 .....	20
Altres cèl·lules productores de IL-17 .....	21
Immunitat a la mucosa intestinal .....	21
Cèl·lules Th17 a l'intestí .....	24
Malalties inflamatòries de base immunitària .....	24
MALALTIA DE CROHN .....	26
Definició general i 1a descripció de la malaltia .....	26
Epidemiologia: incidència i prevalença .....	28
Factors genètics .....	28
Tractaments de la malaltia de Crohn .....	32
Alteracions del sistema immunitari a la malaltia de Crohn .....	35
Malaltia de Crohn i cèl·lules Th17 .....	40
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>49</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>53</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>61</b>
Augment de IL-17 en el cultiu de sang total de pacients amb malaltia de Crohn activa .....	61
La producció de IL-17 i IFN- $\gamma$ és més elevada en les cèl·lules CD4 <sup>+</sup> circulants dels malalts actius .....	63
Enriquiment de la població Th17 en el cultiu de limfòcits CD4 <sup>+</sup> .....	65

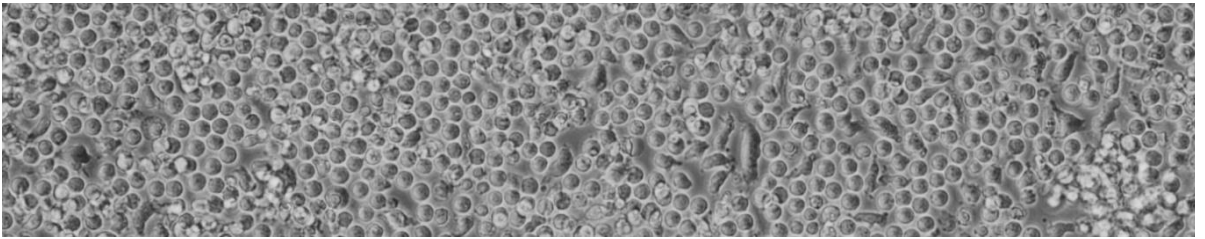
Efecte del medi condicionat de malalts actius sobre les cèl·lules CD4 <sup>+</sup> .....	68
Pacients debut per la malaltia presenten una activitat clínica i endoscòpica similar als malalts avançats .....	69
Els pacients debut per a la malaltia no presenten una major resposta Th17 a perifèria tot i presentar activitat clínica .....	73
La producció de citocines Th17 és major només en els malalts actius en estadis avançats .....	75
Les cèl·lules Th17 de sang perifèrica produeixen IL-22, IFN- $\gamma$ i TNF- $\alpha$ .....	77
Les cèl·lules CD4 <sup>+</sup> de controls i pacients responen de forma comparable als estímuls amb IL-12 i IL-23 .....	80
Expressió dels receptors IL23R i IL12R $\beta$ 2 en les cèl·lules CD4 <sup>+</sup> de sang perifèrica .....	84
Detecció del receptor IL23R a la membrana cel·lular .....	84
Major expressió de les citocines Th17 en la mucosa intestinal inflamada .....	87
Producció de IL-17 i IFN- $\gamma$ a la mucosa intestinal .....	89
Les cèl·lules Th17 intestinals també produeixen IFN- $\gamma$ i TNF- $\alpha$ però no IL-21 ..	90
Les cèl·lules Th17 i Th1 de mucosa intestinal presenten co-producció de IL-6 com a característica diferencial.....	91
La malaltia de Crohn debut ja presenta una resposta Th17 i Th1 elevada al lloc d'inflamació .....	93
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEX. Publicació derivada dels estudis d'aquesta tesi.....</b>	<b>133</b>

## ABREVIATURES

ARN	Àcid ribonucleic
BCR	Receptor de cèl·lules B
Cèl·lules NK	<i>natural killer cells</i>
G-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits/macròfags
IFN- $\gamma$	interferó gamma
Ig...	immunoglobulina
IL-...	interleucina
Limfòcits Th	Limfòcits T col·laboradors ( <i>T helpers</i> )
LPL	Limfòcits de la làmina pròpia
LPMC	Mononuclears de la làmina pròpia
MHC-I	Complexe major d'histocompatibilitat tipus 1
MHC-II	Complexe major d'histocompatibilitat tipus 2
MMP	Metaloproteïnases de matriu
PBMC	Mononuclears de sang perifèrica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa o proteïna C reactiva
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
STAT	Transductor de senyal i activador de transcripció
TCR	Receptor de cèl·lules T
TGF- $\beta$	Factor de transformació de creixement beta
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Factor de necrosi tumoral alfa
Treg	Cèl·lules T reguladores



# Introducció







## INTRODUCCIÓ

### EL SISTEMA IMMUNITARI

El sistema immunitari és el conjunt d'òrgans, cèl·lules i molècules encarregat de protegir el nostre cos en front de substàncies estranyes.

Per això la seva funció principal és distingir allò propi, per tal de desenvolupar-hi tolerància, del que li és aliè. Paràsits, bacteries, partícules víriques i altres agents no infecciosos han de ser reconeguts com a substàncies alienes per tal que es desencadeni una resposta immunitària capaç d'eliminar aquests agents potencialment perillosos per a l'organisme. La importància d'aquesta distinció es fa totalment palesa en l'aparició de patologies que són conseqüència d'una alteració en aquest reconeixement. Per exemple, les al·lèrgies apareixen com a conseqüència de reconèixer com a aliens i perillosos antígens comuns de l'ambient; les patologies autoimmunitàries, per prendre com a aliè quelcom propi.

En el sistema immunitari molts components han de ser finament regulats per tal que aquesta distinció sigui eficient. El coneixement que acumula la immunologia sobre com el sistema és capaç de dur a terme aquesta distinció i regular-la és aplicable a la majoria de patologies.

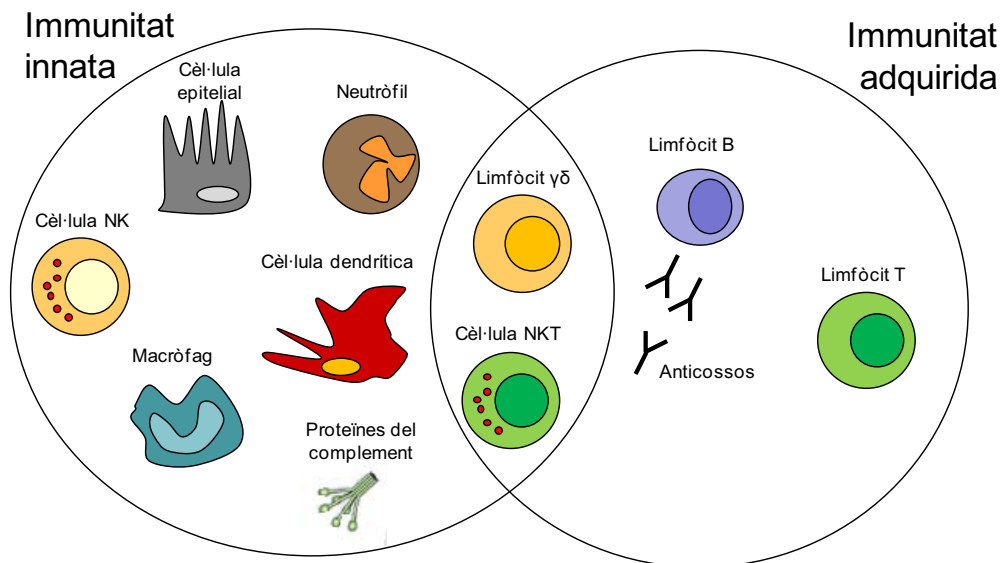
### Immunitat innata

Els components del sistema immunitari es poden classificar de diverses maneres en funció de quin sigui el criteri d'elecció. Una de les classificacions més emprades és la d'immunitat innata i immunitat adquirida. La immunitat innata es caracteritza per ser una resposta ràpida, de reconeixement de patrons comuns presents en els agents microbians i sense capacitat per generar memòria, és a dir, davant un determinat agent respon sempre de la mateixa manera. Els components i funcions del sistema immunitari innat són:

1. Les **barreres epitelials** així com els limfòcits intraepitelials. Funcionen com a barrera física i química mitjançant la secreció de molècules antimicrobianes com les  $\alpha$  i  $\beta$ -defensines. Els limfòcits intraepitelials es poden considerar components del sistema innat ja que els seus receptors presenten un repertori de reconeixement d'antígens limitat, similar al que posseeixen altres receptors de reconeixement de patrons, com els receptors Toll-like.
2. Els **fagòcits** (neutròfils, macròfags, cèl·lules dendrítiques) detecten els agents infecciosos a través dels receptors de reconeixement de patrons, els fagociten i els destrueixen. A més, les cèl·lules dendrítiques en concret són capaces de

processar aquests microbis i presentar-los com a antígens en les molècules especialitzades per aquesta finalitat, els complexos majors d'histocompatibilitat (MHCI i MHCII), actuant com a cèl·lules presentadores d'antigen. Això, juntament amb la producció d'una sèrie de mediadors, com citocines i quimiocines, possibilitarà l'amplificació de la resposta immunitària, activant i reclutant tant noves cèl·lules del sistema immunitari innat com del sistema immunitari adquirit.

3. **Cèl·lules NK**, reconeixen i destrueixen cèl·lules infectades. A més són grans productores d'IFN- $\gamma$ , citocina que activa la capacitat bactericida dels fagòcits.
4. Sistema del **complement** i altres proteïnes circulants (entre elles la proteïna C reactiva). Totes aquestes molècules reconeixen patrons conservats dels microbis i la seva funció és, ja sigui indirectament o directa, la lisi dels microbis, opsonitzar-los per a que puguin ser fagocitats i amplificar la senyal d'inflamació per a que es reclutin noves cèl·lules efectores.



**Figura 1.** Esquema representatiu de les cèl·lules i components del sistema immunitari innat i adquirit. En la intersecció dels dos tipus d'immunitat trobem dues poblacions cel·lulars que comparteixen característiques amb els dos grups.

## Immunitat adquirida

Al contrari que la immunitat innata, la immunitat adquirida es caracteritza per ser una resposta més lenta, de reconeixement d'antígens específics i que s'adapta als repetits encontres amb un mateix antigen generant el que anomenem memòria immunitària. El component principal d'aquest tipus d'immunitat són els limfòcits B i T. Els limfòcits B produeixen anticossos solubles i de membrana (aquests últims formen part dels denominats receptors dels limfòcits B o BCR) que reconeixen directament els antígens. En canvi el receptor dels limfòcits T (TCR) només reconeix l'antigen quan és presentat en una molècula MHC. Els limfòcits T encara es poden dividir en  $CD8^+$ , aquells que reconeixen MHC-I i els  $CD4^+$ , que reconeixen el MHC-II. En la Taula 1 es presenta un resum dels diferents tipus de limfòcits i les seves funcions.

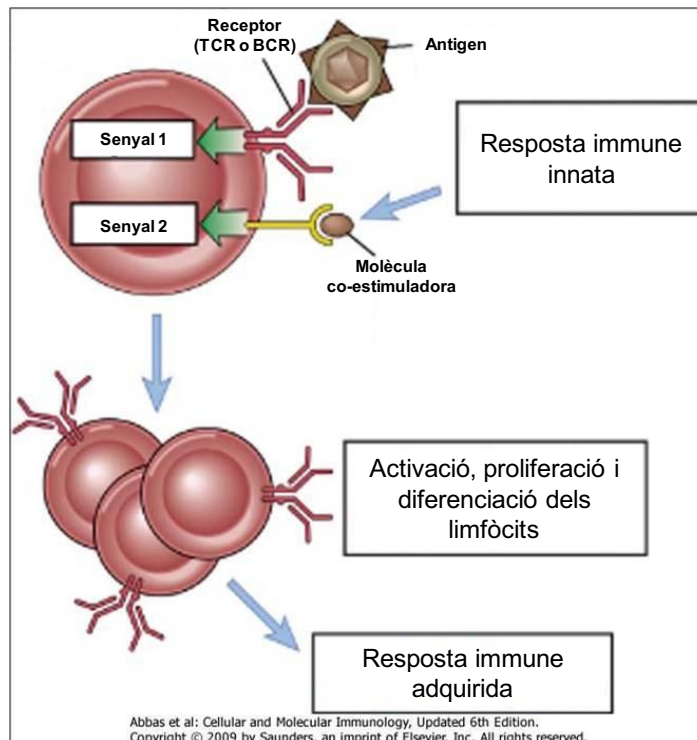
Tipus de limfòcits	Funcions	Receptor	Especificitat del receptor	Marcadors de membrana
<b>Limfòcits T <math>\alpha\beta</math></b>				
T col·laboradors $CD4^+$	Diferenciació de cèl·lules B Activació de macròfags	TCR $\alpha\beta$	Complexes pèptid-MHC classe II	$CD3^+$ , $CD4^+$ , $CD8^-$
T citotòxics $CD8^+$	Lisi de cèl·lules infectades o tumorals	TCR $\alpha\beta$	Complexes pèptid-MHC classe I	$CD3^+$ , $CD4^-$ , $CD8^+$
T reguladors	Supressió de la funció de cèl·lules efectores	TCR $\alpha\beta$		$CD3^+$ , $CD4^+$ , $CD8^+$ $CD25^+$
<b>Limfòcits T <math>\gamma\delta</math></b>	Funcions de col·laboració i citotòxiques (immunitat innata)	TCR $\gamma\delta$	Especificitat molt limitada per antígens peptídics i lipídics	$CD3^+$ , $CD4$ i $CD8$ variables
<b>Limfòcits B</b>	Producció d'anticossos	Anticòs de membrana o BCR	Especificitat per tot tipus de molècules	MHC-II, $CD19$
<b>Cèl·lules "natural killer"</b>	Lisi de cèl·lules infectades o danyades (immunitat innata)	Diversos tipus de receptors d'inhibició	Especificitat molt limitada per MHC	$CD16$

<b>Cèl·lules NKT</b>	i activació		Especificitat limitada per complexes glicolípid-CD1	CD3, CD16
	Supressió o activació d'altres respostes immunes innates i adaptatives	TCR $\alpha\beta$		

**Taula 1.** Tipus de limfòcits. Cada un dels tipus es diferencia principalment dels altres per les seves funcions, els receptors que expressen, els lligands que reconeixen i l'especificitat que mostren. Les molècules que presenten en membrana són molt útils per a la seva diferenciació, i l'ús de la nomenclatura dels CD ("cluster of differentiation") facilita la feina en la identificació i estudi de les poblacions limfocitàries. Taula adaptada de Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology, 6th edition, Saunders Elsevier 2010.

Els nòduls limfoides són òrgans del sistema immunitari on es possibilita que els limfòcits amb les diferents especificitats antigèniques puguin trobar-se amb el seu antígen corresponent. Això és possible degut a que les cèl·lules presentadores d'antigen migren des dels teixits on han enconrat l'antigen fins als nòduls limfàtics més propers. La hipòtesi més recolzada de la presentació antigènica és la de les dues senyals. Aquesta hipòtesi postula que per a que es doni l'activació del limfòcit B o T naïve és necessari que li arribin 2 senyals: 1) a través del receptor específic per a l'antigen que s'està reconeixent i, 2) una senyal de coestimulació que funciona com a alarma i assegura que l'antigen s'ha trobat en situació de perill (Figura 2).

Aquesta teoria permet explicar no tan sols l'inici d'una resposta immunitària sinó també la generació de tolerància envers els antígens propis, ja que en aquest cas l'antigen es presenta sol, sense molècules de coestimulació per part de les cèl·lules presentadores d'antigen, la qual cosa indueix el canvi d'especificitat dels receptors de les cèl·lules B, el desenvolupament de limfòcits T reguladors (en timus i moll d'os) i l'apoptosi o l'anèrgia del limfòcit autoreactiu.



**Figura 2.** Hipòtesi de les dues senyals. La 1a senyal és la que es dona a través del receptor específic del limfòcit reconeixent un antigen determinat. La 2a senyal és la d'una molècula coestimuladora expressada per cèl·lules del sistema immunitari innat en resposta a la detecció i processament de l'antigen i que interacciona amb el limfòcit a través de diversos receptors, com el CD28. Les dues senyals simultànies són necessàries per a que es doni l'activació dels limfòcits i es desencadeni la resposta immunitària adquirida. Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology, 6th edition, Saunders Elsevier 2010.

### Limfòcits T CD4<sup>+</sup>

Els limfòcits T CD4<sup>+</sup>, també anomenats T col·laboradors o helpers, són uns dels protagonistes del sistema immunitari adquirit. Com veiem a la Taula 1 aquests limfòcits desenvolupen diverses funcions, com la d'ajudar a les cèl·lules B en la seva diferenciació i canvi de classe dels seus anticossos, així com també als macròfags augmentant la seva capacitat bactericida.

Als anys 80, Mosmann & Coffman van descriure dues subpoblacions de limfòcits CD4<sup>+</sup>, que denominaren com Th1 i Th2<sup>1</sup>. Davant un determinat agent infecció, el limfòcit CD4<sup>+</sup> pot respondre de diferents maneres en funció de quin sigui el mecanisme efector més eficaç que s'ha de posar en marxa per tal d'eliminar-lo. La responsabilitat d'aquesta "decisió" recau en les citocines inductores d'una o altra població que són produïdes per

les cèl·lules presentadores d'antigen i altres cèl·lules accessòries. Així, segons sigui el patró molecular reconegut a través dels receptors de les cèl·lules del sistema immunitari innat produiran un tipus o altre de citocines. La producció de IL-12 portarà a la diferenciació dels limfòcits T naïve cap al llinatge Th1 mentre que la producció de IL-4 portarà a la diferenciació de limfòcits Th2. A més, aquestes dues subpoblacions es diferencien també per les citocines que expressen i les funcions que duen a terme (Taula 2).

Els limfòcits Th1 actuen generant una resposta preferentment cel·lular, col·laborant amb cèl·lules B, macròfags i cèl·lules NK, potenciant l'activitat bactericida d'aquests últims tipus cel·lulars a través de la producció d'IFN- $\gamma$ . Són, per tant, importants en la immunitat en front de bacteris intracel·lulars i virus. Moltes malalties de tipus autoimmunitari així com altres reaccions inflamatòries són degudes a un excés d'activació de les cèl·lules Th1. Gran part del coneixement que tenim d'aquestes cèl·lules és a través de l'estudi de la seva alteració en les patologies esmentades.

D'altra banda, la subpoblació Th2 genera una resposta humoral principalment per la seva col·laboració amb les cèl·lules B. Així, els limfòcits Th2 jugaran un paper fonamental en front de qualsevol perill que necessiti de la presència d'anticossos, com són les infeccions per paràsits o les respostes a al·lèrgens. Per tant, aquesta població és la que es troba majorment implicada en patologies al·lèrgiques. A la Taula 2 podem veure algunes característiques més que diferencien aquestes poblacions de limfòcits T col·laboradors.

### **Limfòcits Th17**

"... Further divisions of helper T cells may have to be recognized before a complete picture of helper T-cell function can be obtained."<sup>1</sup>. Mosman i Coffman ja avançaven el que actualment és acceptat per la comunitat científica: els subtipus de limfòcits T col·laboradors no són només els reconeguts des de fa 20 anys Th1 i Th2 sinó que hem de parlar almenys d'una altra subpoblació, la Th17. Aquests 3 tipus cel·lulars estan determinats per la producció de diferents tipus de citocines, per la regulació sota diferents factors de transcripció així com per la funció que desenvolupen fent front a diferents tipus d'infeccions (Taula 2).

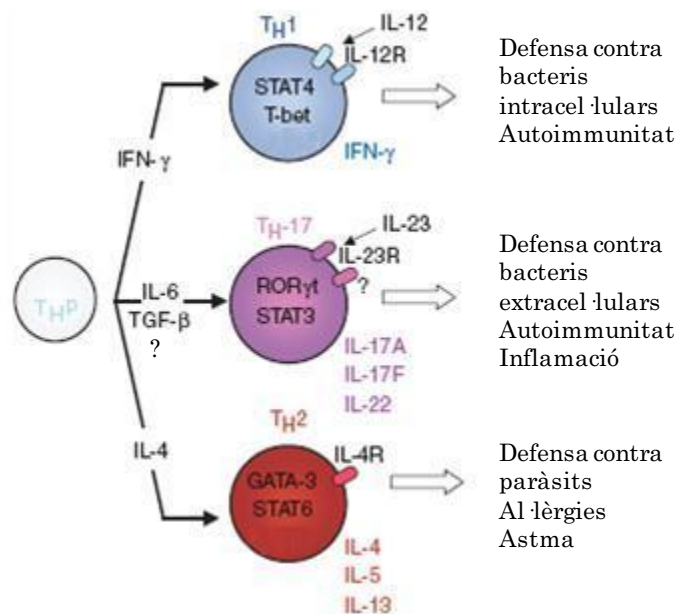
	<b>Th1</b>	<b>Th2</b>	<b>Th17</b>
<b>Tipus d'infecció que afronten</b>	Bacteris intracel·lulars i virus	Paràsits extracel·lulars	Bacteris extracel·lulars i infeccions fúngiques
<b>Tipus de patologia en la que s'han involucrat</b>	Autoimmunitat	Al·lèrgies	Autoimmunitat
<b>Citocines inductores</b>	IL-12, IFN- $\gamma$	IL-4	TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1, IL-23, ?
<b>Citocines que produeixen</b>	IFN- $\gamma$ ,	IL-4, IL-5, IL-13	IL-17, IL-22
<b>Factors de transcripció específics</b>	T-bet, STAT1, STAT4	GATA-3, STAT6	RORc, STAT3

**Taula 2.** Subpoblacions de limfòcits T col·laboradors. Les poblacions Th1 i Th2 es van descriure fa més de 20 anys i durant aquest temps tots els estudis de patologies immunitàries s'han basat en aquesta dicotomia. Recentment amb la descripció de la subpoblació limfocitària Th17 l'antiga hipòtesi s'ha hagut d'ajustar i reinterpretar. Taula adaptada de Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology, 6th edition, Saunders Elsevier 2010.

La descripció l'any 2000 d'una nova citocina, la IL-23<sup>2</sup>, i la caracterització d'algunes de les seves funcions<sup>3</sup>, entre elles, la d'expandir i mantenir els limfòcits productors de IL-17, va portar anys més tard, al 2006<sup>4</sup>, a distingir aquests limfòcits T CD4<sup>+</sup> com una nova subpoblació de cèl·lules T col·laboradores. Aquesta nova població es va anomenar Th17 per ser la citocina IL-17 la que produïen de forma diferencial i més abundant.

Els limfòcits Th17 es consideren una nova subpoblació de limfòcits T col·laboradors, diferents dels Th1 i Th2 (Taula 2 i Figura 3), que es desenvolupen de forma independent i en resposta a l'activació de factors de transcripció específics de cada llinatge. Una de les característiques que defineix millor les cèl·lules Th1 i Th2 com a dues poblacions diferents és la inhibició recíproca: les citocines del llinatge Th1 inhibeixen el desenvolupament de les cèl·lules Th2 i a l'inrevés. Així la descripció de IFN- $\gamma$  i IL-4 com a inhibidors de la diferenciació de la població Th17 recolza la hipòtesi que aquestes cèl·lules productores de IL-17 conformen una subpoblació diferent de limfòcits T col·laboradors (Figura 4).





**Figura 3.** Esquema de la diferenciació de les diferents poblacions de limfòcits T col·laboradors. De manera simplificada es mostren les citocines inductores així com les més característiques de cada població. Bettelli E. et al., Nature Immunology, abril 2007.

La IL-23 actua com a factor necessari per al manteniment de la població Th17 però no és ben bé un equivalent de la IL-12 per a la població Th1, ja que en aquest cas, la IL-23 sola no té la capacitat de diferenciar un limfòcit T naïve cap a Th17 degut a que aquests no expressen el receptor de la IL-23 (IL-23R).

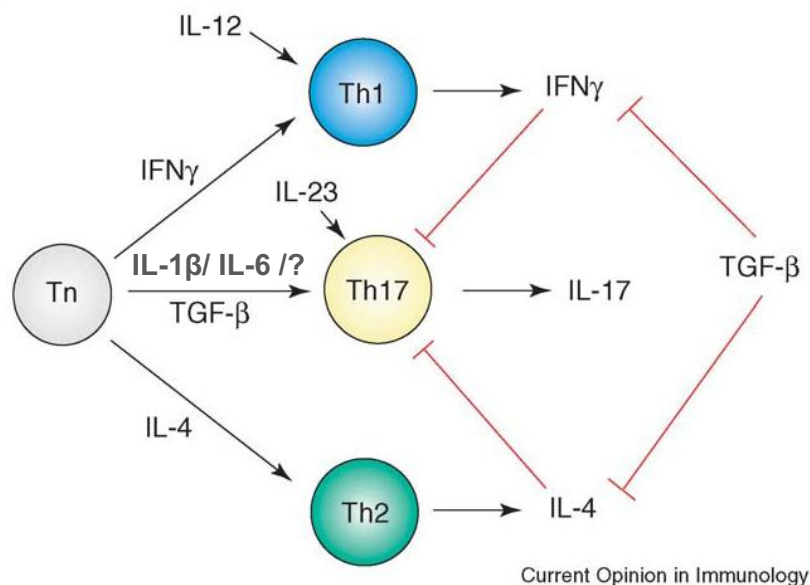
Així doncs les citocines encarregades de dirigir la diferenciació de les cèl·lules Th17 a partir de limfòcits naïve són el TGF- $\beta$  i la IL-6<sup>5-7</sup>. Ara bé, això només és cert en ratolí, ja que en humà es requereixen altres citocines per induir la diferenciació. El factor diferenciador que ha portat més polèmica és el TGF- $\beta$ , ja que aquesta citocina induïx també la diferenciació cap a cèl·lules T reguladores (Treg). A més, alguns articles primerencs observaren que el TGF- $\beta$  no era necessari per induir la diferenciació dels limfòcits Th17 en humans<sup>8-10</sup>. Més endavant però es va corregir aquesta observació al·legant una sèrie de raons que podien haver portat a aquesta primera confusió<sup>11</sup>:

- 1) La població de limfòcits “naïve” dels primers treballs no era tan pura com la de treballs posteriors. Les cèl·lules “contaminants” dels primers treballs podien estar produint citocines i altres mediadors que inhibissin o induïssin la diferenciació Th17.

- 2) L'ús d'un medi de cultiu amb sèrum. El sèrum és una font de TGF- $\beta$  i en els primers treballs a més s'addicionava TGF- $\beta$  recombinant amb la qual cosa s'obtenien nivells elevats de TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  dirigeix la diferenciació de Treg i Th17 en funció de la seva concentració; una concentració alta porta a la diferenciació de Treg mentre que una concentració més baixa i acompanyada de la presència d'algunes citocines pro-inflamatòries porta a la diferenciació de Th17<sup>12</sup>.

En treballs posteriors s'ha tingut doncs, molta cura que la població de limfòcits de partida fossin realment naïve i no hi hagués presència d'altres cèl·lules contaminants, i també s'han utilitzat medis de cultiu sense sèrum o amb nivells molt controlats. Així diversos laboratoris alhora van descriure que, com en ratolí, també en humans hi ha un requeriment del TGF- $\beta$  per a la diferenciació de les cèl·lules Th17. El que no va ser tan unànime va ser en la resta de citocines necessàries, ja que uns apunten a la necessitat de l'acció conjunta de diverses citocines pro-inflamatòries, la IL-23, la IL-1 $\beta$  i la IL-6<sup>13</sup>, altres mostren que l'acció de la IL-6 no és necessària en el sistema humà<sup>14</sup> i, finalment un altre grup mostra el requeriment de la citocina IL-21<sup>15</sup>. En tots els casos el percentatge de cèl·lules Th17 generat és molt baix (<10%).

L'origen de les cèl·lules Th17 *in vivo* no és de moment gens clar. Altres grups han afirmat que els seus precursors són un grup reduït de cèl·lules CD161<sup>+</sup> que ja expressen RORc i l'ARN missatger de IL-23R, i que són capaces de diferenciar-se a Th17 només en presència de IL-1 $\beta$  i IL-23<sup>16</sup>. A més, mostren que l'efecte del TGF- $\beta$  en la diferenciació dels limfòcits Th17 és indirecte, ja que juga un paper inhibidor sobre els limfòcits Th1 i Th2<sup>17</sup>. Així, una reducció de les cèl·lules Th1 i Th2 comporta un augment de cèl·lules Th17 ja que és coneguda la capacitat d'inhibició de les citocines IFN- $\gamma$  i IL-4 sobre el desenvolupament del llinatge Th17 (Figura 4).



Current Opinion in Immunology

**Figura 4.** Xarxa de citocines implicades en la inducció i inhibició de les 3 subpoblacions de limfòcits T col·laboradors. Harrington L.E. et al., Curr. Opin. Immunol, juny 2006.

## IL-17

La IL-17 engloba una família de 6 citocines conegudes com: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (o IL-25) i IL-17F. En general, quan es parla de IL-17 es fa referència a la citocina fundadora i més estudiada, la IL-17A.

El seu receptor, IL-17RA pot formar heterodímers amb IL-17RC. Aquests receptors estan expressats en cèl·lules endotelials, epitelials i en fibroblasts. La senyalització a través d'ells no és molt coneguda però alguns estudis mostren l'activació de diverses cascades de senyalització i transducció de senyals, com l'activació d'algunes MAPK (p38, ERK), l'activació de la via PI3K/AKT i, finalment l'activació de NF- $\kappa$ B.

IL-17F també és produïda pels limfòcits Th17. De fet, els gens de la IL-17A i la IL-17F estan molt propers i s'expressen de forma coordinada en les cèl·lules Th17. A més, tot i que la IL-17F té uns efectes més dèbils, ambdues citocines tenen funcions similars. Fins i tot s'ha descrit la citocina heterodimèrica formada per IL-17A i IL-17F, també expressada per les cèl·lules Th17<sup>18</sup>.

La IL-17 va ser descrita el 1995<sup>19</sup>, molts anys abans que fos descrita la població Th17. Es coneixia la seva funció com a citocina proinflamatòria que actua sobre cèl·lules

endotelials, estromals, epitelials i monòcits induint la producció d'altres mediadors inflamatoris com la IL-1, la IL-6, la IL-8, així com factors de creixement, G-CSF i GM-CSF, que a la vegada potencien el reclutament, proliferació i activació de neutròfils<sup>20</sup>. Aquest augment del G-CSF, així com del SCF (stem cell factor), és el responsable de mediar una altra funció de la IL-17 coneguda també abans de la descripció de la població Th17, la d'inducció de la granulopoiesi<sup>21</sup>.

Altres funcions descrites de la IL-17 són la inducció juntament amb la IL-22 de pèptids microbians produïts per les cèl·lules de Paneth<sup>22</sup>, així com l'augment d'expressió d'algunes proteïnes de fase aguda com la lipocalina 2<sup>23</sup> que segresta els sideròfors necessaris per a la supervivència d'algunes espècies bacterianes. A part d'aquestes funcions que afecten directament la supervivència d'alguns patògens la IL-17 també induïx l'expressió de certes metal·loproteïnases, MMP1, MMP3, MMP9 i MMP13, involucrades en la destrucció de matriu cel·lular i per tant, en dany tissular i angiogènesi tumoral<sup>24</sup>. També s'ha descrit un efecte regulador de la IL-17 en la formació de centres germinals i la producció d'autoanticossos<sup>21</sup>.

## **IL-22**

Aquesta citocina és membre de la família de la IL-10. A més de les cèl·lules Th17 altres limfòcits activats i les cèl·lules NK també la produeixen<sup>25</sup>.

Senyalitza a través del receptor IL-22R/IL-10R2 que no s'expressa en cèl·lules del sistema immunitari, sinó majoritàriament en cèl·lules de 3 estructures que funcionen com a barreres de l'organisme: pell, sistema digestiu i respiratori.

La unió del receptor al seu lligand activa STAT3 i induïx l'expressió de pèptids antimicrobians com la  $\beta$ -defensina-2, la  $\beta$ -defensina-3 i altres en les cèl·lules epitelials<sup>22</sup>. A més també induïx la proliferació de les cèl·lules epitelials així com la migració de cèl·lules residents del teixit i circulants mitjançant la inducció de metaloproteïnases<sup>25</sup>. Per tot això es creu que la funció general de la IL-22 és de defensa contra patògens així com de reparació i reorganització tissular després d'un dany.

Ara bé, un altre efecte de la IL-22 és sobre els hepatòcits on induïx l'augment de la producció de proteïnes de fase aguda<sup>26</sup>. Aquesta funció sobre el fetge, altres funcions de la IL-22 descrites en l'intestí, com la inducció de la producció de les citocines pro-inflamatòries TNF- $\alpha$  i IL-8 per part de les cèl·lules epitelials, així com l'augment descrit d'aquesta citocina en algunes malalties autoimmunes com la malaltia de Crohn (descriu més endavant) fan pensar en la IL-22 com una citocina que media funcions més pro-inflamatòries.

Així doncs, el seu paper tant en situació fisiològica com patològica no acaba de ser del tot clar, i el seu ús com a diana terapèutica ens porta a dues situacions possibles. Si atenem a les funcions de defensa, reorganització cel·lular i manteniment de l'homeòstasi, l'ús de la IL-22 com a teràpia és una opció que pot comportar una major reacció inflamatòria. També es pot pretendre bloquejar les funcions pro-inflamatòries de la IL-22, cosa que podria portar a la pèrdua de l'homeòstasi de les barreres epitelials i a una incapacitat per fer front a possibles infeccions.

### **Funcions de la població Th17**

Una de les funcions més conegudes de la població Th17 és la que ve mediada per la IL-17, que com acabem d'esmentar, actua sobre altres cèl·lules no-immunes i immunes induint la producció de mediadors inflamatoris, com la IL-1, la IL-6, la IL-8, etc. que a la vegada actuen sobre el reclutament i l'activació dels neutròfils. Així doncs, la funció primordial de les cèl·lules Th17 és la de promoure l'acció dels neutròfils en situacions d'infecció per tal que aquesta es resolgui ràpidament. Models experimentals d'infecció amb *K. pneumoniae*<sup>27</sup>, *C. rodentium*<sup>28</sup>, *P. gingivalis*<sup>29</sup> i *C. albicans*<sup>30</sup> posen de manifest la funció de les cèl·lules Th17 que mitjançant el reclutament de neutròfils i la inducció de la producció de pèptids antimicrobians poden fer front a aquestes infeccions fúngiques i de bacteris extracel·lulars. Com sabem els neutròfils són les cèl·lules principals en la inflamació aguda i la seva total funcionalitat, conjuntament amb la dels macròfags, assegura una resolució de la inflamació i fan que aquesta no esdevingui crònica. A més, l'acció conjunta de la IL-17 i la IL-22 sobre la producció de pèptids antimicrobians per part de cèl·lules presents en l'epiteli intestinal<sup>22</sup> així com l'acció de la IL-17 sobre les unions de les cèl·lules epitelials<sup>31</sup> fan pensar en una funció general dels limfòcits Th17 de manteniment de la homeòstasi intestinal.

En moltes ocasions coneixem la funció a partir de l'estudi de les patologies en que la població d'interès es troba alterada. En aquest aspecte cal doncs remarcar que s'ha descrit un augment de les cèl·lules Th17 en diverses malalties autoimmunitàries (com l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple i la malaltia inflamatòria intestinal), però encara es desconeixen els mecanismes pels quals aquestes cèl·lules juguen un paper en l'inici o la perpetuació de la patologia autoimmunitària.

Els malalts que presenten la síndrome d'hiper IgE (també anomenada síndrome de Job) degut a mutacions en STAT3, són un bon model per examinar en quines vies és més important l'acció de les cèl·lules Th17, ja que STAT3 és un dels factors de transcripció necessaris per al desenvolupament d'aquests limfòcits. De fet, aquests malalts presenten

un defecte en la generació de cèl·lules productores de IL-17 i com a conseqüència una tendència a patir infeccions recurrents sobretot per *S. aureus* i *C. albicans*<sup>32</sup>.

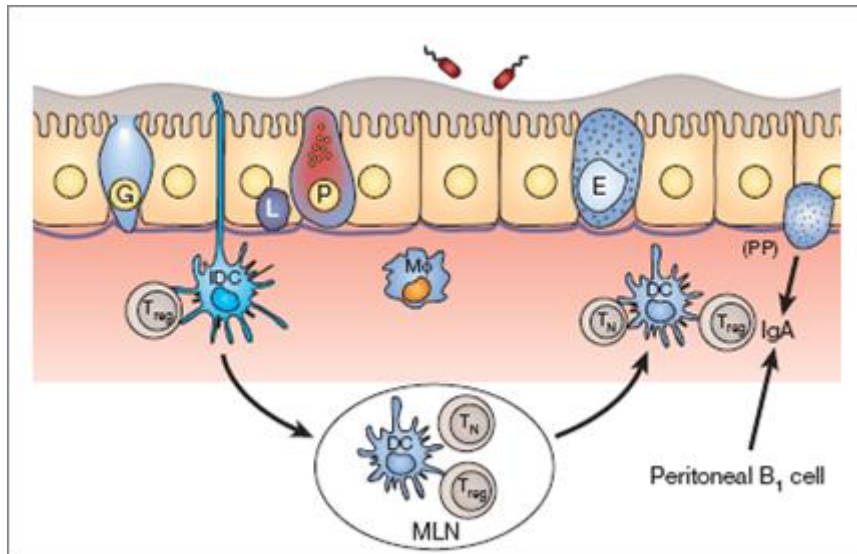
### **Altres cèl·lules productores de IL-17**

La IL-17 és produïda per altres cèl·lules a més de les Th17. En ratolí s'han descrit diversos tipus cel·lulars capaços de produir-la: limfòcits CD8<sup>33</sup>, cèl·lules NKT<sup>34</sup>, limfòcits T  $\gamma\delta$ <sup>35</sup>, així com també neutròfils<sup>36</sup>, eosinòfils<sup>37</sup> i monòcits<sup>38</sup>.

En humans els tipus de cèl·lules productores de IL-17 no estan tan ben caracteritzats, tot i que trobem algunes descripcions puntuals d'altres cèl·lules no Th17 productores de IL-17: cèl·lules CD8<sup>+</sup> de sang perifèrica<sup>39</sup> i també limfòcits T  $\gamma\delta$ <sup>40,41</sup>.

### **Immunitat a la mucosa intestinal**

La mucosa intestinal funciona com a barrera entre el lumen intestinal (exterior) i l'interior de l'organisme. La barrera epitelial no actua només com a barrera física sinó també com a barrera química produint mediadors immunitaris com citocines i quimiocines. A més dels enteròcits, especialitzats en l'absorció gràcies a la seva extensa superfície de contacte amb el lumen (els microvilli) i, a més dels limfòcits intraepiteliais, trobem a l'epiteli altres tipus de cèl·lules especialitzades amb funcions orientades a impedir la colonització per part de bacteris patògens: les cèl·lules enteroendocrines que secreten hormones peptídiques que faciliten la motilitat intestinal, les cèl·lules caliciformes productores de muc que protegeix l'epiteli de l'abradió i impedeix l'adherència i invasió de bacteris patògens i les cèl·lules de Paneth que, en condicions fisiològiques, es troben exclusivament a la base de les criptes de l'intestí prim i que expressen i secreten diverses proteïnes antibacterianes, entre elles lisozimes i defensines que contribueixen a mantenir la cripta estèril.



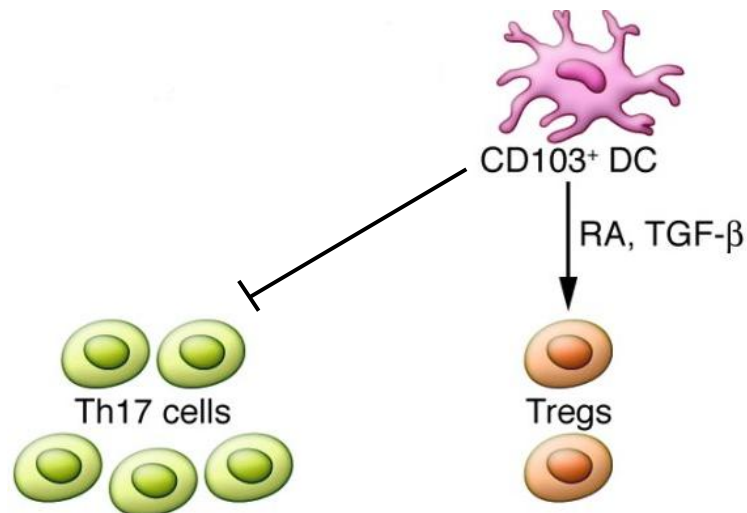
**Figura 5.** Esquema amb els representants bàsics del sistema immunitari a la mucosa intestinal. La barrera epitelial es troba en constant contacte amb els bacteris del lumen intestinal. Juntament amb les cèl·lules epitelials trobem altres cèl·lules especialitzades, com les cèl·lules enteroendocrines (E), les caliciformes (G), les cèl·lules de Paneth (P) i limfòcits intraepitelials (L). A la làmina pròpia trobem cèl·lules presentadores d'antigen, com els macròfags i cèl·lules dendrítiques que poden migrar als nòduls (MLN) on entren en contacte amb els limfòcits induint la tolerància oral a través de l'expansió de Treg. A més, les cèl·lules plasmàtiques presents a les plaques de Peyer (PP) i les provinents de cèl·lules B1 peritoneals, mitjançant la producció d'anticossos de tipus IgA contribueixen al manteniment de l'homeòstasi intestinal. Xavier R.J. et al., Nature, juliol 2007.

A la mucosa intestinal trobem representats tots els components del sistema immunitari innat i adquirit, com era d'esperar, ja que com la resta de mucoses de l'organisme és una primera línia d'entrada d'agents microbians. Trobem doncs tots els tipus cel·lulars incloent: cèl·lules dendrítiques que processen antígens i migren als nòduls limfàtics on els presentaran; macròfags i neutròfils actuant com a fagòcits; limfòcits intraepitelials, limfòcits efectors i cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos, entre altres.

Les poblacions de limfòcits a la mucosa intestinal es distribueixen en 3 compartiments: repartits per la làmina pròpia, organitzats en nòduls limfàtics especialitzats anomenats plaques de Peyer (on la majoria de cèl·lules són limfòcits B i només entre un 10-30% són limfòcits T) i al compartiment intraepitelial on els limfòcits, ja tinguin un TCR  $\alpha\beta$  com  $\gamma\delta$  (un 10% dels limfòcits intraepitelials), presenten un reconeixement limitat de certs patrons moleculars, essent una població de tipus oligoclona. Les funcions dels limfòcits intraepitelials són similars a les dels limfòcits T: secreten citocines, potencien l'activitat dels fagòcits i indueixen la lisi de cèl·lules infectades.

Dues característiques diferencials de la immunitat a les mucoses són: 1) l'**alta producció d'anticossos de tipus IgA** per part de les cèl·lules plasmàtiques presents a la làmina pròpia i les procedents dels limfòcits B1 peritoneals<sup>42</sup> i; 2) la **tolerància oral**, és a dir, la tendència dels limfòcits T a mostrar-se tolerants amb els antígens del tracte intestinal, ja siguin provinents de dieta o de la flora bacteriana normal.

Aquesta capacitat d'inducció de tolerància s'ha atribuït recentment a una població de cèl·lules dendrítiques residents a la làmina pròpia i a òrgans limfoides associats com els nòduls mesentèrics. Aquesta població de cèl·lules dendrítiques expressen el marcador CD103 i són inductores del fenotip regulador en els limfòcits T. A través de la producció d'àcid retinoic i TGF- $\beta$  tenen la capacitat d'induir l'expansió de limfòcits Treg Foxp3<sup>43</sup> mentre que inhibeixen la diferenciació dels limfòcits Th17. A més aquestes cèl·lules dendrítiques deixen empremta en els limfòcits que estimulen ja que fan que aquests expressin en membrana els receptors  $\alpha 4\beta 7$  i CCR9 que confereixen tropisme intestinal<sup>44</sup>.



**Figura 6.** Esquema representatiu de la funció tolerogènica de les cèl·lules dendrítiques CD103<sup>+</sup> presents a làmina pròpia i teixits limfoides annexes com les plaques de Peyer i nòduls mesentèrics. A través de la producció d'àcid retinoic (RA) i TGF- $\beta$  indueixen preferentment l'expansió de limfòcits Treg a la vegada que inhibeixen la dels limfòcits Th17. Figura adaptada de Rescigno M., J. Clin. Invest., setembre 2009.



## **Cèl·lules Th17 a l'intestí**

Diferents evidències fan pensar que l'eix IL-23/Th17 juga un paper clar a la mucosa intestinal:

- Estudis experimentals en ratolins indiquen que la IL-23 és produïda majoritàriament i de forma constitutiva per cèl·lules dendrítiques de l'íleon<sup>45</sup>.
- El percentatge de limfòcits CD4<sup>+</sup> productors de IL-17 és més elevat en l'intestí que en els limfòcits de sang perifèrica. Això podria indicar que aquesta població juga un paper més important a nivell de la immunitat de mucosa que a nivell sistèmic<sup>46</sup>.
- Una de les funcions dels limfòcits T col·laboradors és la d'ajudar a les cèl·lules B en el canvi de classe dels anticossos que produeixen. Així, la població Th1 mitjançant la producció d'IFN- $\gamma$  tendeix a induir el canvi de classe a IgG2a i IgG3 mentre que la Th2 a través de IL-4 induïx el canvi a IgG1 i IgE. D'altra banda, es coneix la capacitat del TGF- $\beta$  de produir el canvi de classe a IgG2b i IgA, immunoglobulines predominants a les mucoses i en la protecció antibacteriana<sup>47</sup>, així com la capacitat de la IL-6 entre altres factors d'estimular-ne la secreció<sup>48</sup>. No hi ha estudis al respecte però el fet que el TGF- $\beta$  i la IL-6 siguin factors necessaris implicats en el desenvolupament de les cèl·lules Th17, fa pensar que aquesta població podria estar implicada en aquest canvi de classe a isotips prevalents en mucoses.

Els limfòcits Th17 infiltrats a diferents teixits com l'intestinal presenten com a trets diferencials respecte les poblacions Th1 i Th2 la secreció de les següents citocines, quimiocines i receptors: IL-17, IL-22, IL-17F, IL-26, TNF- $\alpha$ , limfotoxina- $\beta$ , CCL20, IL-1R1, IL-6R, IL-23R, CCR5, CCR6<sup>49</sup>.

## **Malalties inflamatòries de base immunitària**

Autoimmunitat refereix a la patologia que desenvolupa una resposta immunitària adquirida a antígens propis, com és el cas per exemple del lupus eritematós sistèmic. Un altre grup de malalties inflamatòries tenen també una base immunitària però la resposta va dirigida a factors externs, com és el cas per exemple de les malalties inflamatòries intestinals, on l'activació immunitària dirigida contra els components luminals resulta en un dany inflamatori de l'intestí.

La funció general atribuïda als limfòcits Th17, conjuntament amb el fet que aquestes cèl·lules es trobin en major nombre en malalties de tipus autoimmunitari, fa pensar que

l'activació d'aquestes cèl·lules per un estímul microbià o fúngic esdevingui fora de control i tingui com a conseqüència una major infiltració d'aquestes cèl·lules en els teixits.

Són moltes les malalties inflamatòries de base immune que es relacionen amb una primera infecció per part d'algun tipus de patogen, i una de les hipòtesis subjacents és la del mimetisme molecular entre antígens del patogen i autoantígens, tot i que aquesta hipòtesi no ha estat de moment demostrada<sup>50</sup>. Altres possibles hipòtesis serien la d'una primera infecció en un individu genèticament susceptible que portaria a una resposta immunitària exacerbada i/o descontrolada.

Així, en el cas del sistema immunitari present a la mucosa intestinal es diu que aquest sistema és "hiporesponedor", és a dir, que presenta un llindar més alt per a l'activació i generació de la resposta immunitària. D'altra banda però, aquest sistema és altament sensible a la detecció de patògens o altres agents perillosos. Aquest equilibri requereix d'una regulació molt fina, que es pot veure alterada en individus genèticament susceptibles davant una infecció per un patogen o per algun microorganisme de la flora bacteriana normal.

Fins fa poc es considerava que la població que mediava majoritàriament els mecanismes patològics de l'autoimmunitat era la dels limfòcits Th1, ja que algunes de les citocines relacionades amb aquesta població, com la IL-12, es trobaven augmentades en lesions d'aquestes patologies. Els factors de transcripció responsables del desenvolupament d'aquestes cèl·lules, STAT4 i T-bet, també s'havien descrit repetidament com clarament involucrats en processos autoimmunitaris. Amb la descripció dels limfòcits Th17 es comença a posar en dubte aquest paper únic de les cèl·lules Th1 en l'autoimmunitat i trobem evidències (les relacionades amb la malaltia de Crohn seran comentades més endavant) que les dues poblacions hi juguen un paper: la transferència d'ambdues poblacions és capaç de reproduir la malaltia autoimmunitària estudiada, l'existència de limfòcits productors simultàniament de IFN- $\gamma$  i IL-17, la plasticitat de les poblacions limfocitàries per intercanviar els fenotips establerts, etc<sup>51</sup>. Sembla doncs que les poblacions limfocitàries Th1 i Th17 no són excloents en la seva responsabilitat en les malalties autoimmunitàries i que el paper d'ambdues ha de ser considerat en l'estudi d'aquestes patologies.

## MALALTIA DE CROHN

### **Definició general i la descripció de la malaltia**

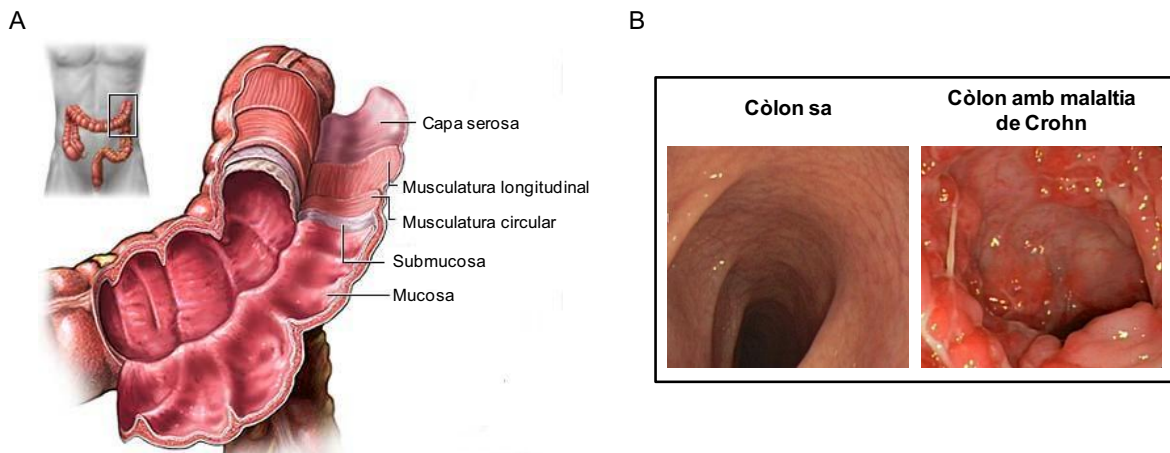
La malaltia de Crohn és una afecció de base immunitària que es manifesta com una inflamació crònica del tracte gastrointestinal i que cursa amb períodes de remissió alternats amb exacerbacions de l'activitat inflamatòria.

La malaltia de Crohn va ser descrita com a entitat patològica independent l'any 1932 per Oppenheimer, Ginzburg i Crohn<sup>52</sup>. Aquesta malaltia que ara coneixem pel nom d'un dels doctors que la va descriure va ser proposada inicialment amb el nom d'ileítis regional. Amb aquesta descripció s'aconsegueix distingir aquesta patologia d'altres processos intestinals no neoplàsics ni infecciosos. Sobretot es remarca la diferència respecte a la colitis ulcerosa i a la tuberculosi intestinal.

### **Característiques de la malaltia**

Forma part, juntament amb la colitis ulcerosa, d'un conjunt de malalties inflamatòries cròniques que afecten el tub digestiu conegudes com malalties inflamatòries intestinals<sup>53</sup>. Els símptomes clínics més usuals són la diarrea crònica, amb presència de moc i sang, dolor abdominal i/o pèrdua de pes. A més, febre, anèmia i malestar general solen acompanyar la clínica intestinal<sup>54</sup>.

La malaltia pot ser d'afectació transmural (afectació de totes les capes intestinals, des de la mucosa fins a la capa serosa externa) i en mosaic (afectació discontinua). A més un dels trets diferencials d'aquesta malaltia, presentat pel 30-50% dels malalts de Crohn i mai present en la colitis ulcerosa, és la formació de granulomes amb cèl·lules multinucleades gegants, que poden aparèixer en qualsevol capa de la paret intestinal<sup>55</sup>.



**Figura 7.** (A) Esquema que ens mostra les diferents capes del tub intestinal, totes elles susceptibles de ser afectades per lesions en la malaltia de Crohn. (B) Imatges d'una colonoscòpia d'un còlon sa i un afectat per la malaltia de Crohn.

### Manifestacions clíniques

Tot i que la malaltia va ser descrita inicialment com una patologia que afecta a l'íleum, actualment es considera que potencialment pot afectar qualsevol part del tracte digestiu (des de la boca fins a l'anus) encara que la zona d'afectació més comú és l'íleum i el còlon. Aquesta afecció majoritària permet classificar els malalts en 3 grups: els d'afecció limitada a l'íleum, els d'afecció només colònica, i els que presenten simultàniament afecció a l'íleum i al còlon. L'afecció anal és també bastant comú, afectant a un terç dels pacients i pot acompanyar afeccions a qualsevol altre tram del tracte digestiu tot i que normalment s'associa a afecció colònica.

L'afecció de les zones altes del tracte digestiu és menys comú i normalment va acompanyada d'afecció intestinal. L'afecció alta aïllada representa menys d'un 1% dels pacients<sup>55</sup>.

La malaltia de Crohn es pot manifestar sempre com una afecció de caràcter principalment inflamatori o pot evolucionar cap a l'aparició de complicacions com l'estenosi (engruiximent i rigidesa de la paret intestinal per l'aparició de fibrosi amb la conseqüent disminució de la llum intestinal) i/o fistules (com a conseqüència d'ulceració, connexió anormal entre l'intestí i un altre òrgan o estructura).

Aquestes característiques descrites fan dels malalts de Crohn un grup molt heterogeni, difícil de tractar i d'analitzar com un únic conjunt. Per això a nivell clínic és útil emprar aquestes manifestacions més greus de la malaltia (estenosi i fistules) per classificar els

malalts en diferents subgrups: **inflamatori**, **estenosant** i **fistulitzant** (també coneguts com els diferents fenotips de la malaltia de Crohn)<sup>56</sup>.

Existeix molt poca informació dels possibles determinants que poden conduir a la manifestació d'aquestes formes greus de la malaltia.

### **Epidemiologia: incidència i prevalença**

La malaltia de Crohn es considera una malaltia de països desenvolupats ja que és en aquests països on hi ha una major incidència. A Madrid és de 8/100.000 habitants/any<sup>57</sup>, similar a la taxa d'incidència de la resta d'Europa i EUA<sup>58</sup>. La taxa de prevalença és uns 20 cops la taxa d'incidència.

La distribució per sexes és similar. El diagnòstic de la malaltia és poc freqüent abans dels 10 anys d'edat mentre que la incidència màxima es dona entre els 20-30 anys. Transcorreguts 20 anys des del diagnòstic el 70% dels malalts hauran requerit algun tipus de cirurgia. L'esperança de vida dels pacients de Crohn està només lleugerament reduïda<sup>55</sup>.

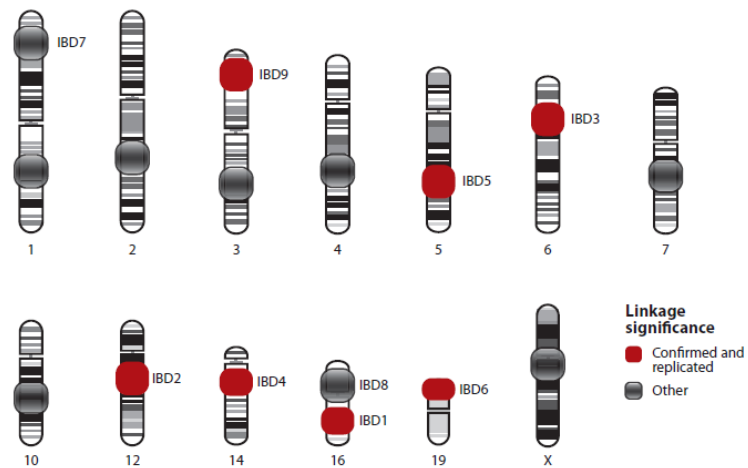
### **Etiologia de la malaltia de Crohn**

L'etiologia de la malaltia de Crohn és desconeguda. La teoria més recolzada actualment és la de la desregulació immune (que és la forma més purista d'anomenar-la malaltia autoimmunitària, tot depèn de si es considera la flora intestinal com a antigens propis o no): la malaltia és conseqüència de l'activació inadequada del sistema immunitari de la mucosa en resposta a la flora intestinal normal en individus genèticament susceptibles. Aquesta idea general és però fàcilment integrable amb altres teories sobre l'etiologia de la malaltia com són la teoria d'un agent infecciós o la d'un defecte en el sistema immunitari innat<sup>59</sup>.

El que sembla evident és que es tracta d'una malaltia multifactorial en que els factors genètics així com els ambientals han de ser considerats.

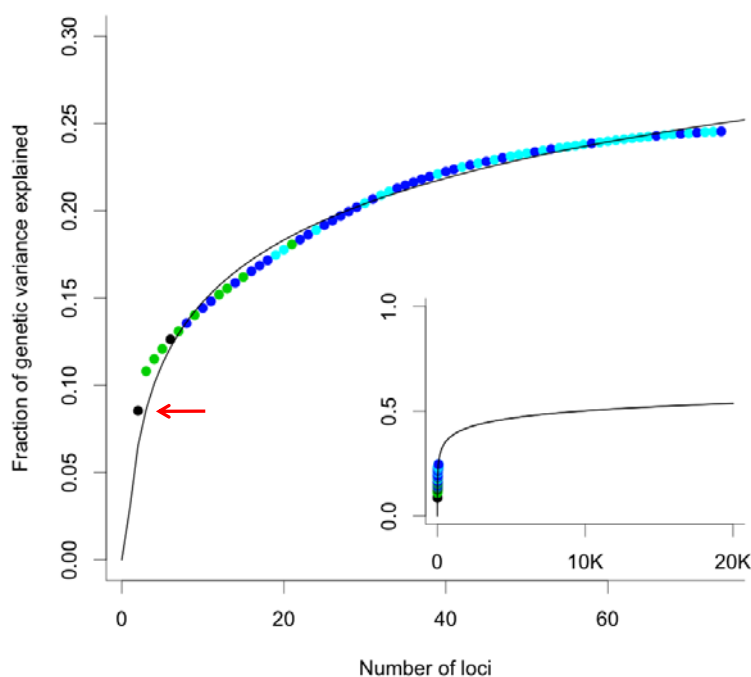
### **Factors genètics**

La importància dels factors genètics en l'etiologia i l'evolució de la malaltia de Crohn sembla clara per diverses raons: 1) major concordança en l'aparició i característiques de la malaltia entre bessons homozigots (50-58%) que dizigòtics (0-12%); 2) augment del risc de patir la malaltia si en la família hi ha individus afectats i 3) s'han descrit gens candidats gràcies a diverses associacions a loci genètics<sup>53,60,61</sup> (Figura 8).



**Figura 8.** Representació dels cromosomes i de les regions gèniques els polimorfismes de les quals han estat associades a un major risc de patir la malaltia de Crohn. Les zones ombrejades en vermell representen aquelles regions gèniques confirmades per diversos estudis i a les quals se'ls ha anat atribuint el nom de IBD1, IBD2, etc. , en gris les zones descrites en alguns estudis però que no han sigut confirmades i replicades per altres. Imatge de van Limbergen J. Et al., Ann. Rev. Genom. Human. Genet., setembre 2009.

Tot i que la descripció d'aquestes associacions, sobretot la primera l'any 2001 del NOD2, van suposar un gran avanç en el coneixement que tenim de l'etiologia de la malaltia de Crohn, no hem d'oblidar que aquesta malaltia és de caràcter multifactorial, és a dir, altres factors a part dels genètics condicionen el desenvolupament de la malaltia. Per tant, individus sans poden ser portadors dels al·lels de risc associats a la malaltia i, de la mateixa manera, molts malalts de Crohn no presenten cap dels polimorfismes de risc descrits fins ara. De fet, si sumem el pes que tenen dins el total de malalts de Crohn tots els polimorfismes de risc descrits per a la malaltia trobem que tots ells junts arriben a explicar tan sols el 25% dels casos.



**Figura 9.** Gràfica representativa del poder explicatiu que té cada un dels polimorfismes de risc associats a la malaltia de Crohn. El primer locus associat a la malaltia va ser el del NOD2 (indicat amb una fletxa vermella) que va permetre explicar el 8% dels malalts de Crohn. Amb les descripcions de nous loci el component genètic de la malaltia de Crohn guanya pes en l'explicació de més casos de la malaltia però arriba a un límit que no sembla superable amb les eines d'anàlisi genètic emprades fins ara.

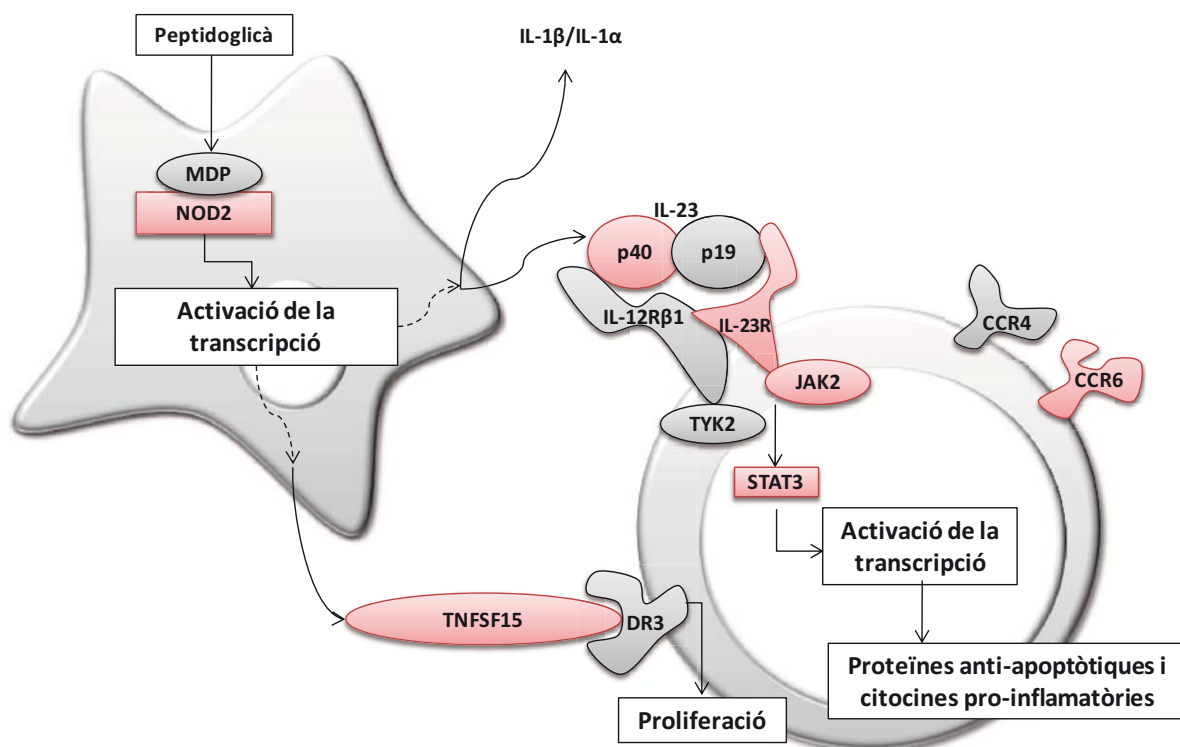
La majoria de gens que s'han associat a la malaltia a través del criatge del genoma són gens relacionats amb funcions del sistema immune: NOD2, ATG16L1, IRGM, IL12B, IL23R, JAK2, STAT3, CCR6, TNFSF15, PTPN2<sup>61-63</sup>.

L'associació d'aquests gens amb la malaltia de Crohn suggereix que alteracions en el reconeixement i processament de bacteris així com alteracions en la senyalització a través de diverses citocines i en l'activació dels limfòcits poden jugar un paper fonamental en la patofisiologia de la malaltia. En la Figura 10 podem veure com molts dels gens candidats juguen algun paper ja sigui en el reclutament, activació i/o proliferació dels limfòcits Th17:

- NOD2, receptor intracel·lular del muramil dipèptid (MDP). La seva activació en cèl·lules dendrítiques porta a una major expansió de les cèl·lules Th17 a través de la producció de IL-23 i IL-1 $\beta$ /IL-1 $\alpha$ <sup>64</sup>.

- TNFSF15 és un membre de la família del TNF produït entre altres per cèl·lules dendrítiques. La interacció amb el seu receptor DR3, altament expressat pels limfòcits Th17, indueix la proliferació d'aquestes cèl·lules<sup>65</sup>.
- p40, IL-23R, JAK2 i STAT3: components de la cascada de reconeixement, activació i senyalització de la IL-23, citocina que manté i amplifica la població Th17<sup>62</sup>.
- CCR6: receptor de la quimiocina CCL20 (que es troba en nivells elevats a la làmina pròpia inflamada dels malalts de Crohn). L'expressió d'aquest receptor caracteritza la població Th17.

De totes maneres es desconeix encara, en la majoria dels casos, el canvi funcional que provocarien la majoria dels polimorfismes de susceptibilitat a la malaltia de Crohn d'aquests gens.



**Figura 10.** Esquema representatiu d'algunes molècules involucrades en l'activació de les cèl·lules Th17. En ombrejat vermell apareixen les proteïnes codificades per gens de susceptibilitat a la malaltia Crohn.



## **Factors ambientals**

S'han estudiat molts factors ambientals que podrien estar involucrats en l'etiopatogènia de la malaltia, però només la influència d'un d'ells ha sigut corroborada per diversos estudis: el tabaquisme. Així, el consum de tabac augmenta el risc de patir malaltia de Crohn, i un cop establerta la malaltia aquest hàbit s'associa a un major nombre de recurrències, major necessitat d'immunosupressors i major recurrència després de cirurgia.

No hi ha evidències que associïn l'aparició de la malaltia inflamatòria intestinal amb determinats components de la dieta, ni que canvis en la dieta suposin una alteració de l'evolució de la malaltia. Tampoc hi ha cap evidència concloent sobre el possible paper d'agents microbians específics tot i que s'ha comprovat que el fet de patir una infecció intestinal per microbis comuns (*Campylobacter*, *Salmonella*, etc.) incrementa el risc d'inici de malaltia inflamatòria intestinal sobretot durant l'any següent a la infecció.

L'ansietat, depressió o estrés no constitueixen factors de risc per a la malaltia inflamatòria intestinal; l'augment de la incidència d'aquests trastorns psiquiàtrics s'interpreta com a fenòmens reactius al procés intestinal crònic<sup>55</sup>.

## **Tractaments de la malaltia de Crohn**

Els tractaments de la malaltia de Crohn són diversos. Fins fa pocs anys la única opció davant la inflamació, l'estenosi i la consegüent pèrdua de funcionalitat d'algun tram de l'intestí era la cirurgia. Amb l'avanç del coneixement de la patofisiologia de la malaltia nous fàrmacs estan disponibles, i la cirurgia està només recomanada en els casos en què hi ha obstrucció, estenosi no extensa o abscess que no ha remès amb el tractament amb antibiòtics<sup>66</sup>.

Els fàrmacs utilitzats varien en funció de les característiques concretes de la malaltia, ja que degut a la localització, complicacions i als períodes d'alternança d'activitat i remissió de la malaltia un o altre fàrmac es mostra més eficaç i convenient (Taula 3). Els facultatius empren en general una estratègia terapèutica d'aproximació gradual ("stepped approach") en què els fàrmacs més potents o agressius es van afegint si els fàrmacs de primera línia no han aconseguit el control del procés inflamatori.

Opcions terapèutiques per a la malaltia de Crohn	
Manifestacions malaltia	Fàrmac
Malaltia lleu	Aminosalicilats, antibiòtics (possibilitat de corticosteroides)
Malaltia moderada	Corticosteroides, immunosupressors
Malaltia greu	Corticosteroides, immunosupressors, anti-TNF
Malaltia refractària	Anti-TNF
Malaltia perianal	Antibiòtics, anti-TNF, immunosupressors
Remissió	Immunosupressors, aminosalicilats, antibiòtics

**Taula 3.** Taula que ens mostra les opcions terapèutiques recomanades en funció del grau d'activitat i altres característiques de la malaltia. Adaptació de Podolsky D.K., N. Engl. J. Med., agost 2002.

En general els fàrmacs actuals tracten d'atenuar la resposta inflamatòria:

- 1) Aminosalicilats: es creu que actuen bloquejant la producció de leucotriens i prostaglandines així com en l'eliminació dels radicals d'oxigen. Es qüestiona la seva eficàcia en el tractament de la malaltia.
- 2) Antibiòtics: eficaços en el tractament de la malaltia perianal i en el control de la malaltia colònica. La seva eficàcia recolza la hipòtesi del paper fonamental que juga la flora microbiana en el desenvolupament de la malaltia.
- 3) Corticosteroides: anti-inflamatoris endògens. Bloquegen la producció de lípids pro-inflamatoris inhibint les ciclooxigenases i regulant les cèl·lules del sistema immunitari a diferents nivells reduint la seva capacitat pro-inflamatòria. Només s'utilitzen en el tractament dels brots d'activitat degut a la seva ineficàcia en el tractament de la malaltia i als seus efectes secundaris adversos.
- 4) Immunosupressors (azatioprina, mercaptopurina): no es coneix ben bé a quin nivell actuen però es creu que suprimeixen la proliferació i supervivència dels limfòcits T. Fàrmacs per al manteniment de la remissió.
- 5) Anticossos anti-TNF $\alpha$  (infiximab, adalimumab, certolizumab): tot i que en aquest cas tampoc es coneix el mecanisme d'acció d'aquests anticossos es pensa que a part de neutralitzar els efectes del TNF $\alpha$  poden comportar l'apoptosi de cèl·lules inflamatòries<sup>67</sup>. Fàrmacs utilitzats per a la inducció i manteniment de la remissió.

Tots aquests tractaments però, són responsables d'efectes adversos indesitjables, com la inducció d'un estat de immunosupressió en què el sistema immunitari perd capacitats en front d'infeccions o l'aparició d'immunogenicitat degut a la teràpia amb anticossos, que ocasiona pèrdua de resposta i efectes adversos directament relacionats amb l'administració de la medicació (reaccions d'hipersensibilitat precoç i tardana). A més

d'aquests efectes secundaris també s'ha de tenir en compte que molts malalts es tornen refractaris a tractaments als que abans han respost, com és el cas dels corticosteroides, immunosupressors o dels anti-TNF $\alpha$ , i que en la majoria d'aquests casos l'única solució restant és la cirurgia. Per tots aquests motius es considera que encara no existeix un bon tractament per a la malaltia de Crohn i, per tant, el major coneixement de la patofisiologia de la malaltia és crucial ja que ens pot conduir a la identificació de noves dianes farmacològiques.

La majoria dels agents terapèutics potencials que s'han testat recentment o encara estan en el procés estan relacionats amb l'activació, regulació o migració de les cèl·lules del sistema immune (Taula 4).

Altres teràpies biològiques		
Agent	Mecanisme d'acció de l'agent	Estat
Anti- $\alpha$ 4 (Natalizumab)	Bloqueig de la migració de leucòcits cap a l'intestí (i cap al sistema nerviós central)	Amb distribució restringida a Estats Units degut al risc de leucoencefalopatia progressiva multifocal <sup>68</sup> . A Europa no s'ha aprovat.
Anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 (Vedolizumab)	Bloqueig exclusiu de la migració de leucòcits cap a l'intestí	Assajos clínics en fase III <sup>69</sup>
Anti-p40 (ABT-874 i Ustekinumab)	Bloqueig de les citocines IL-12 i IL-23 inductores de les poblacions efectores Th1 i Th17 respectivament.	Assajos clínics en fase II <sup>70,71</sup>
Anti-IL-17 (AIN457)	Bloqueig de la citocina característica de la població Th17	Assajos clínics en fase II
Anti-IFN- $\gamma$ (Fontolizumab)	Bloqueig de la citocina característica de la població Th1	Va arribar a fase II però s'ha aturat el seu desenvolupament per manca de resposta <sup>72</sup> .
Anti-IL-6R (Tocilizumab)	Bloqueig de la senyalització de la citocina IL-6, mediador de la resposta de fase aguda.	Es va realitzar un estudi pilot <sup>73</sup> . Actualment no hi ha cap estudi en marxa.
IL-10 recombinant	Potenciar l'efecte anti-inflamatori d'aquesta citocina	S'ha aturat el seu desenvolupament per manca d'eficàcia.
Anti-CD3 (Visilizumab)	Bloqueig de l'activació dels limfòcits T	S'ha aturat el seu desenvolupament per manca d'eficàcia sobre la necessitat de colectomia

**Taula 4.** Diversos agents terapèutics relacionats amb l'activació, regulació o migració del sistema immunitari testats recentment o actualment en la malaltia de Crohn. Taula elaborada amb informació extreta de: Podolsky D.K., N. Engl. J. Med., agost 2002; Rutgeerts P. et al., Gastroenterology, abril 2009; i [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).

Un altre tipus de tractament que sembla prometedor per a la malaltia de Crohn és l'autotrasplantament de cèl·lules mare hematopoiètiques. Els primers indicis de l'efectivitat d'aquesta teràpia provenen de malalts amb leucèmia que patien també la malaltia de Crohn i que amb l'autotrasplantament mostraven una clara milloria<sup>74</sup>. Es pensa que l'efecte d'aquesta teràpia és mediat per la depleció dels limfòcits autoreactius del malalt, així com per la regeneració d'un nou sistema immune no condicionat cap a una resposta inflamatòria envers els antígens luminals. Ja s'han dut a terme dos estudis<sup>75,76</sup> testant l'eficàcia de l'autotrasplantament en malalts de Crohn i els resultats són encoratjadors ja que s'aconsegueix la inducció i manteniment de la remissió en 15 dels 16 malalts que participaven en els estudis. Actualment s'està portant a terme a nivell europeu un nou estudi (ASTIC, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00297193>) que pretén discernir entre l'efecte únic de la mobilització de les cèl·lules mare hematopoiètiques del moll de l'os i l'efecte d'aquesta mobilització més la immunosupressió i autotrasplantament posteriors.

### **Alteracions del sistema immunitari a la malaltia de Crohn**

Un dels defectes que trobem a la malaltia de Crohn és una major permeabilitat de la **barrera epitelial**<sup>77,78</sup> que podria ser una de les causes primeres de la inflamació recurrent i crònica que presenten els malalts de Crohn. L'alteració explicaria que hi hagi un major contacte entre els antígens luminals i el sistema immunitari resident a la mucosa intestinal, amb la conseqüent resposta anormal per part d'aquestes cèl·lules.

Aquests antígens produeixen una activació tant de les cèl·lules epitelials com de cèl·lules dendrítiques i macròfags presents a la làmina pròpia, i aquests a la vegada són productors de citocines i mediadors inflamatoris que portaran al reclutament i activació d'altres cèl·lules del sistema immunitari innat i adquirit<sup>60</sup>.

S'han descrit defectes en el sistema immunitari innat<sup>79</sup> que poden donar compte directament d'aquesta alteració en la permeabilitat de l'epiteli. La menor producció d' $\alpha$ -defensines a l'íleon i  $\beta$ -defensines al colon s'ha associat amb la malaltia de Crohn en ambdues localitzacions respectivament<sup>80</sup>.

A més, aquests defectes s'han fet encara més evidents amb la descripció de diversos gens candidats implicats en el reconeixement i processament d'antígens bacterians. Així en el cas del NOD2, les mutacions que confereixen risc per a la malaltia són responsables que es doni una menor activació de NF- $\kappa$ B i per tant menor producció de citocines pro-inflamatòries<sup>81,82</sup> amb la conseqüent facilitat per a l'entrada i persistència de nous antígens bacterians. A més la mutació en el NOD2 provoca en les cèl·lules de Paneth una menor producció d' $\alpha$ -defensines<sup>83</sup>, cosa que facilitaria també la supervivència i la colonització de la mucosa per part dels bacteris del lumen intestinal.

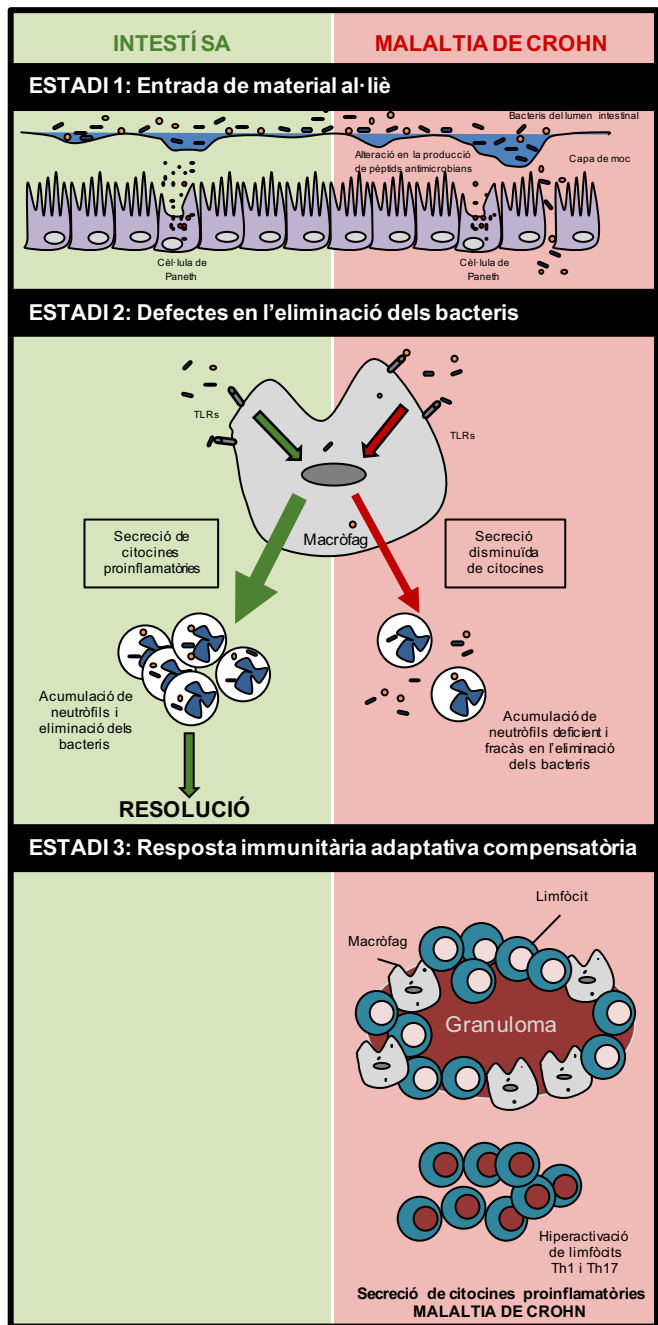
Els polimorfismes associats a la malaltia dels gens ATG16L1 i IRGM s'han descrit com a causants d'alteracions en els processos d'autofàgia i per tant en l'eliminació dels patògens<sup>84,85</sup>. Totes aquestes dades aporten doncs més evidències a favor de la hipòtesi d'un defecte del sistema immunitari innat en l'eliminació de bacteris i material estrany.

De forma independent a la descripció dels polimorfismes de susceptibilitat a la malaltia de Crohn, també s'han observat mancances funcionals en algunes cèl·lules del sistema immunitari innat. Els **macròfags** dels pacients amb malaltia de Crohn presenten, davant un trauma inductor d'inflamació aguda, una menor producció de IL-8 i IL-1 $\beta$ , ambdues quimiocines necessàries per a l'atracció dels neutròfils. A més, en resposta a una inoculació amb *E. Coli* inactivada a la pell presenten una resposta inflamatòria aguda més atenuada que els controls, amb un menor aport de reg sanguini i menor infiltració de neutròfils. Curiosament però aquests malalts presenten un augment de IL-6, de proteïna C reactiva i del nombre de neutròfils circulants en sang perifèrica<sup>86</sup>.

Altres citocines pro-inflamatòries com el TNF- $\alpha$  o la IL-6 entre altres s'han descrit també com hipoproduïdes pels macròfags dels pacients amb malaltia de Crohn. Aquest defecte s'atribueix a una alteració en el processament post-traducciona l via lisosomes, que porta a la degradació de les citocines abans de ser secretades<sup>87</sup>.

D'altra banda, el paper dels **neutròfils** en la inflamació aguda és crucial, i en la malaltia de Crohn no només s'ha descrit una alteració indirecta en la seva migració als teixits danyats, sinó que també s'han descrit defectes en la capacitat fagocítica i bactericida d'aquestes cèl·lules<sup>79</sup>.

Si els neutròfils no són eficients en la fagocitosi i eliminació dels bacteris es dona un reclutament de monòcits i activació de macròfags. A més, si els macròfags tampoc són eficients en la seva funció es dona una activació exagerada de limfòcits T com a efecte compensatori<sup>88</sup>. Així doncs aquest primer defecte del sistema immunitari innat pot portar a una acumulació de macròfags i a la formació de granulomes<sup>89</sup>. Per tant, aquesta teoria de la deficiència del sistema immunitari innat no és contradictòria a evidències anteriors que descrivien que a la mucosa intestinal dels malalts de Crohn hi ha un nombre elevat de macròfags<sup>90</sup> i altres cèl·lules que produeixen IL-12<sup>91-93</sup>, TNF<sup>94</sup>, IL-6, IL-1 $\beta$ <sup>95</sup> entre altres, en excés. Aquestes citocines a la vegada actuen a diversos nivells, induint l'activació de cèl·lules endotelials que facilitaran el reclutament de més cèl·lules inflamatòries del sistema immunitari innat, i induint la diferenciació i activació de limfòcits Th1 i Th17. És la hiperactivació d'aquestes poblacions T efectores el que ha rebut una major atenció en la malaltia de Crohn.



**Figura 11.** Esquema del model de 3 estadis que s'ha hipotetitzat per a la immunopatogènia de la malaltia de Crohn. Figura adaptada de Sewell G.W. et al., Curr Opin Immunol, octubre 2009.

Totes aquestes evidències d'alteracions en diferents tipus cel·lulars tant del sistema immunitari innat com adquirit han portat a Segal i col·laboradors<sup>89</sup> a parlar de 3 estadis en la immunopatogènia de la malaltia de Crohn (Figura 11): 1) presa de contacte amb els antígens luminals, ja sigui degut a alguna infecció prèvia o a alteracions de la funcionalitat de l'epiteli que provoquen que el sistema immunitari de la mucosa iniciï la resposta immunitària; 2) defectes en l'activació i funció de les cèl·lules del sistema immunitari innat que produeixen quantitats reduïdes de citocines pro-inflamatòries, mostren alteracions de la migració i finalment no aconseguen eliminar l'agent invasor i, 3) excés compensatori de la resposta immunitària adquirida que intenta superar els defectes funcionals del sistema immunitari innat donant lloc a la inflamació crònica i a l'acumulació de limfòcits observada en les lesions de la malaltia. Així, l'exagerada resposta dels limfòcits T observada en la malaltia de Crohn pot ser un fenomen secundari a un defecte primari en el sistema immunitari innat degut a la combinació de factors genètics i ambientals.

Diversos fets recolzen la hipòtesi que les cèl·lules CD4<sup>+</sup> juguen un paper fonamental en l'activitat i la cronificació de la malaltia: evidències dels models experimentals<sup>96</sup>; la resistència de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de la mucosa a l'apoptosi<sup>97</sup>; malalts infectats per l'HIV amb la consegüent disminució del nombre de cèl·lules CD4<sup>+</sup> presenten remissió de l'activitat inflamatòria intestinal; pacients amb leucèmia també mostren remissió després del transplantament de medul·la òssia; el tractament efectiu dels malalts amb immunosupressors com l'azatioprina o el metotrexat que inhibeixen la proliferació i indueixen l'apoptosi dels limfòcits CD4<sup>+</sup>; l'efectivitat dels tractaments anti-TNF- $\alpha$  és deguda en part a l'efecte pro-apoptòtic sobre els limfòcits CD4<sup>+</sup> de la làmina pròpia<sup>98,99</sup>, etc.

A més dels fets citats, trobem a la bibliografia una gran quantitat d'informació que relaciona un augment de la resposta específica dels limfòcits CD4<sup>+</sup> a la làmina pròpia amb l'activitat inflamatòria de la malaltia de Crohn.

Així, en la mucosa dels malalts s'ha descrit un augment de les citocines produïdes per aquestes poblacions limfocitàries, com l'IFN- $\gamma$  típica de la població Th1 i la IL-17 produïda majoritàriament per la població Th17.

Fins fa pocs anys però, aquesta població Th17 encara no havia estat descrita i tots els experiments realitzats amb cèl·lules CD4<sup>+</sup> de la mucosa intestinal estudiaven el patró de citocines atribuït a la població Th1. Així alguns d'aquests estudis troben que a la mucosa inflamada dels malalts de Crohn hi ha un increment dels transcrits d'ARN missatger per IFN- $\gamma$ <sup>100,101</sup>. També s'ha descrit aquest augment a nivell de proteïna en diversos articles originals. Per immunohistoquímica i col·localització amb el marcador CD4<sup>+</sup> s'ha descrit que aquestes cèl·lules són més abundants en les biòpsies de zones afectes dels pacients amb malaltia de Crohn<sup>92</sup>. També utilitzant les cèl·lules aïllades de la làmina pròpia

LPMCs (totes les mononuclears) o LPLs (enriquides en limfòcits) s'ha observat aquesta major producció d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules provinents de zones afectes per la malaltia. Emprant les LPMCs i sense cap tipus d'estímul s'ha descrit un percentatge major de cèl·lules productores d'aquesta citocina en els pacients amb malaltia de Crohn respecte als malalts amb colitis ulcerosa o individus controls<sup>101</sup>. No només el percentatge de cèl·lules sinó la producció total d'IFN- $\gamma$  és major per part de les cèl·lules aïllades dels pacients amb malaltia de Crohn<sup>93</sup>. A més, quan aquestes cèl·lules són activades *in vitro* amb anti-CD2/anti-CD28 també mostren aquesta major producció d'IFN- $\gamma$ <sup>102</sup>. Aquesta capacitat es manté amb el temps ja que s'ha observat també en clons aïllats i expandits *in vitro*<sup>92</sup>.

També s'han estudiat altres citocines considerades Th1, com la IL-2 i el TNF- $\alpha$  entre altres. Els trànscrips d'ARN missatger de **TNF- $\alpha$**  s'han trobat augmentats en les biòpsies de les zones inflamades<sup>100</sup>, però això no és indicatiu de que aquesta citocina estigui sobreproduïda per les cèl·lules Th1 ja que altres cèl·lules com macròfags o neutròfils estan contribuint a aquesta sobreproducció. De fet en un altre estudi en el que s'aïllen les cèl·lules de la làmina pròpia es demostra també un augment en els malalts de Crohn respecte a controls, aquest cop en el percentatge de cèl·lules productores de TNF- $\alpha$  que corresponen a poblacions heterogènies (macròfags, cèl·lules T, ...) <sup>94</sup>.

Pel que fa a la **IL-2** encara hi ha menys consens ja que han sorgit evidències que apunten tant a un augment com a una disminució en la seva producció. LPMCs de pacients amb malaltia de Crohn produeixen major quantitat de IL-2 respecte als malalts amb colitis ulcerosa i controls<sup>101</sup> tot i que els autors d'aquest estudi no detecten aquesta citocina a nivell d'ARN missatger. D'altra banda, però també mesurat en LPMCs estimulades *in vitro*, s'ha descrit una menor producció de IL-2 per part dels malalts respecte a controls<sup>102</sup>.

A part de les citocines s'han estudiat altres molècules indicadores de la major presència i/o activació de la població limfocitària Th1, com per exemple el factor de transcripció **T-bet** necessari per a que es transcriguin tots els gens que porten a la diferenciació i estabilització d'aquesta població. Per immunofluorescència sobre el teixit de la làmina pròpia s'ha observat una major expressió de T-bet en els pacients amb malaltia de Crohn<sup>103</sup>, així com també una major producció per part de les LPMCs aïllades, tant a nivell de trànscrips d'ARN com a nivell de proteïna<sup>93</sup>.

La subunitat específica per al reconeixement de la IL-12 per part del seu receptor i la que activa la senyalització intracel·lular quan s'ha unit el lligand, la **IL-12R $\beta$ 2**, també s'ha trobat augmentada a nivell d'ARN missatger en biòpsies de teixit intestinal afecte de pacients amb malaltia de Crohn indicant una major predisposició cap a la diferenciació i/o manteniment del llinatge limfocitari Th1. Aquest receptor quasi no és detectable en PBMCs<sup>104</sup>.



Aquesta subunitat del receptor de la IL-12 interacciona amb **STAT4**. Aquest transductor de senyal es troba en quantitats comparables en pacients amb malaltia de Crohn, amb colitis ulcerosa i en individus control, però la forma fosforilada (i que per tant transdueix la senyal d'activació) és més abundant en els pacients amb malaltia de Crohn<sup>104,105</sup>.

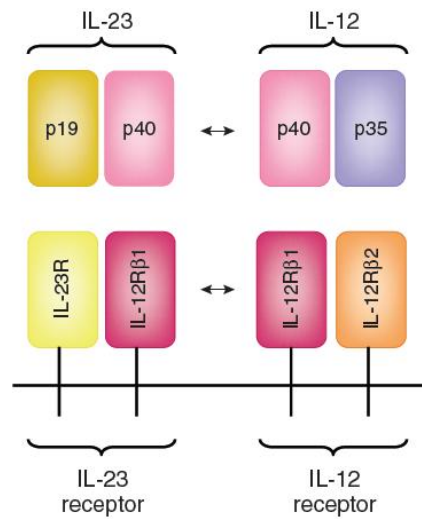
**STAT-1** és una altra molècula necessària per al llinatge Th1 ja que la seva activació porta a la transcripció de T-bet. Aquest transductor de senyal també s'ha descrit com a augmentat en els pacients amb malaltia de Crohn<sup>103</sup>.

A nivell sistèmic, s'han fet estudis amb les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica per veure si aquesta major activació de la població Th1 és un fenomen local que es dona en el lloc de la inflamació o és un defecte general que presenten els pacients amb malaltia de Crohn en aquestes cèl·lules. Així i per veure si l'alteració ja es troba en els estadis previs a la major diferenciació cap a Th1 s'ha estudiat la producció de la IL-12 per part de les cèl·lules mononuclears presents en la sang perifèrica (PBMCs) sense trobar cap diferència entre els pacients amb malaltia de Crohn i malalts amb colitis ulcerosa així com respecte a individus control<sup>91</sup>.

En canvi, estudiant les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de la fracció de PBMCs de pacients amb malaltia de Crohn s'ha descrit que produeixen una major quantitat de IFN- $\gamma$  quan són estimulades in vitro amb anticossos anti-CD2/anti-CD28<sup>102</sup>.

### **Malaltia de Crohn i cèl·lules Th17**

Amb la descripció de la citocina IL-23<sup>2</sup> (p40/p19) que comparteix la subunitat p40 amb la IL-12 (p40/p35) (Figura 12) s'obren un seguit de dubtes i qüestions en tots aquells camps d'estudi de malalties mediades per les cèl·lules Th1. La majoria d'estudis que havien servit per descriure un augment de la IL-12 o que havien analitzat els efectes del seu bloqueig havien utilitzat reactius que detectaven la subunitat p40. Kastelein, primer en descriure la existència de la IL-23, afirmava "... literature had to be completely reinterpreted".



**Figura 12.** Citocines IL-12 i IL-23 i els seus receptors. Les dues citocines heterodimèriques comparteixen la subunitat p40 així com també la cadena IL-12Rβ1 del receptor. La subunitat p19 i la cadena IL-23R del receptor són específics de la IL-23 mentre que la subunitat p35 i la cadena IL-12Rβ2 ho són de la IL-12. Figura adaptada de Palmer M.T. et al., Nat. Immunol, gener 2010.

Així doncs, tot el que fins en aquell moment s'havia atribuït a efectes mediat per la IL-12, amb la descripció de la IL-23 apareix la incertesa del paper relatiu d'aquestes dues citocines.

A més, l'atenció cap a la IL-23 passa a ser encara major quan es descriu que aquesta citocina és indispensable per al manteniment d'una nova subpoblació de limfòcits T col·laboradors, els Th17.

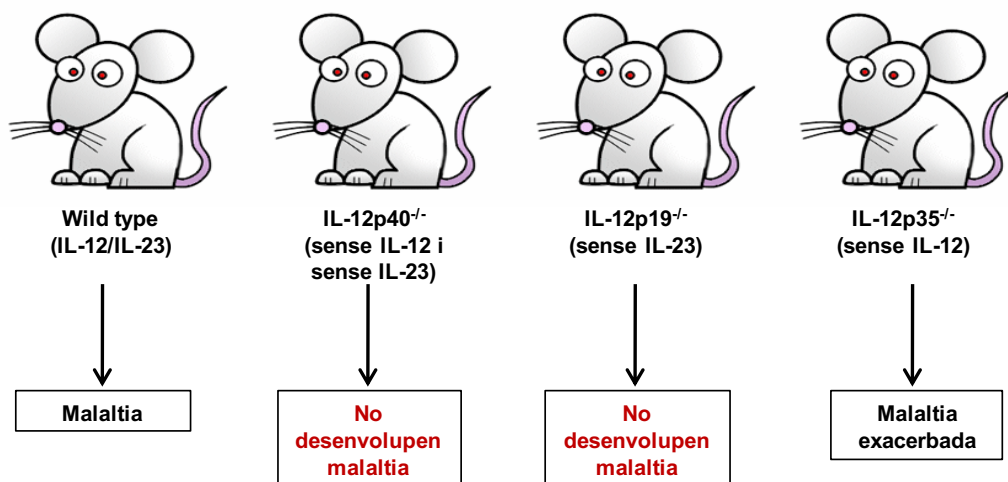
En algunes malalties de tipus autoimmunitari s'ha començat a descriure un augment d'aquesta població Th17 i els seus mediadors en els teixits on es dona la inflamació de forma local, i en alguns casos també a nivell sistèmic. Algunes d'aquestes malalties en que es descriu aquest augment dels limfòcits Th17 són: esclerosi múltiple<sup>106</sup>, uveïtis<sup>107</sup>, espondilitis anquilosant, artritis reumatoide<sup>108</sup> i psoriasis<sup>109</sup>.

En els **models experimentals** de colitis, que reflecteixen en major o menor grau la malaltia de Crohn, ja s'ha descrit la important contribució de la IL-23 i de les cèl·lules Th17 en l'inici i evolució de la malaltia.

Per intentar resoldre el dubte de si la colitis és una malaltia mediada per l'eix IL-12/Th1 o pel IL-23/Th17, es va recórrer a animals ko per una i altra citocina (Figura 13). En el ratolí ko de IL-10 que manifesta colitis espontània es va observar que els dobles ko IL-10/p35 (no tenen IL-12) desenvolupen colitis mentre que els dobles ko IL-10/p19 (no tenen IL-23) no desenvolupen la malaltia. Els limfòcits CD4<sup>+</sup> dels ratolins IL-10<sup>-/-</sup> x p19<sup>-/-</sup>

produeixen quantitats elevades d'IFN- $\gamma$ , indicant que no existeix un dèficit de resposta Th1<sup>110</sup>. A més observen que mitjançant l'administració de IL-23 empitjoren la colitis. Així doncs, en aquest model sembla que la colitis ve mediada per la IL-23 i el consegüent augment de la resposta Th17.

D'igual manera en un altre model experimental en el que es transfereixen cèl·lules T naïve a un ratolí RAG deficient s'ha observat quelcom similar al descrit anteriorment. En aquest cas el doble ko RAG1/p19 presenta una colitis molt lleu mentre que el doble ko RAG1/p35 sí la segueix manifestant de forma greu<sup>111</sup>.



**Figura 13.** Esquema que mostra el rol patològic de la IL-23 en front de la IL-12 en animals ko per una o altra citocina. Aquests experiments s'han dut a terme en diferents models experimentals de malalties de tipus autoimmunitari, com l'esclerosi múltiple (EAE)<sup>112</sup>, l'artritis reumatoide (CIA)<sup>113</sup> i la malaltia inflamatòria intestinal<sup>110</sup>.

La IL-23 juga un paper important en els models de colitis i no només a través de l'expansió i manteniment de les cèl·lules Th17 ja que en els models deficientes en cèl·lules T aquesta citocina sembla desenvolupar també un paper rellevant sobre les cèl·lules del sistema immunitari innat. Les cèl·lules dendrítiques i els macròfags expressen el receptor de la IL-23, així aquesta citocina pot induir l'expressió d'altres citocines proinflamatòries per part d'aquestes cèl·lules del sistema immunitari innat. En el model experimental de colitis en ratolins deficientes per RAG (deficients en cèl·lules T) i infectats amb *H. hepaticus* l'administració d'anticossos anti-p19 resol la inflamació<sup>111</sup>.

A més, en aquests models experimentals independents de l'acció de cèl·lules T la IL-23 pot dur a terme accions diferencials a nivell local i a nivell sistèmic. Així en el model de colitis induïda per l'administració de l' anticòs anti-CD40, que provoca l'activació de les cèl·lules del sistema immunitari innat i la producció per part d'aquestes de nivells elevats de IL-12 i IL-23 entre altres, el doble ko RAG1/p35 presenta colitis però sense pèrdua de pes mentre que el doble ko RAG1/p19 no presenta inflamació a l'intestí però sí segueix

mostrant pèrdua de pes i una expressió alta de citocines proinflamatòries en el sèrum. Aquestes dades suggereixen que la IL-12 i la IL-23 provoquen una regulació diferencial del sistema immunitari innat, sent la primera important en la resposta a nivell sistèmic i la segona a nivell local<sup>114</sup>.

Així doncs la IL-23 sembla jugar un paper en la inflamació intestinal actuant sobre el sistema immunitari innat i també sobre el desenvolupament de cèl·lules Th17. De fet, en molts dels models de colitis experimental ja s'ha descrit un augment en les citocines de tipus Th17.

En el ko de IL-10 la quantitat de IL-17 és més elevada que en els ratolins wt<sup>115</sup>. També en el model d'administració de DSS s'ha descrit un augment de la producció de IL-17 en el còlon inflamat<sup>116,117</sup>.

També s'ha descrit, en el model d'administració rectal de trinitrobenzè sulfat (TNBS), que el ko per IL-17R presenta una colitis més lleu amb menor pèrdua de pes i un índex d'inflamació molt menor que el dels animals wt<sup>118</sup>.

En **humans** s'ha descrit la participació de la IL-23 i de les cèl·lules Th17 en la malaltia de Crohn.

Els trànscrips per a **IL-23** són més elevats a la mucosa inflamada de pacients amb malaltia de Crohn que a la mucosa sana<sup>46,119</sup>. També a nivell de proteïna detectada per immunohistoquímica trobem que els pacients amb malaltia de Crohn presenten més cèl·lules IL-23 positives que els controls sans tant a les zones afectes com a les zones no inflamades<sup>120</sup>.

Les LPMCs de pacients amb malaltia de Crohn produeixen més IL-23 que les de controls<sup>121</sup>, així com també més IL-12 com ja s'ha comentat en l'apartat anterior. Aquesta major presència de la IL-23 no es limita només a la mucosa intestinal, ja que les cèl·lules dendrítiques aïllades dels nòduls mesentèrics dels malalts també presenten una major producció de IL-23<sup>122</sup>.

A més l'administració de l'anticòs monoclonal anti-p40 aconsegueix la remissió en els pacients amb malaltia activa<sup>71</sup> així com una reducció significativa de la producció per part de LPMCs de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-17 i IL-6<sup>70,121</sup>.

Aquestes dades apunten a que també en humans, igual que en els models experimentals, no només la població Th1 està involucrada en la mediació de la inflamació de la malaltia de Crohn sinó que també els limfòcits Th17 hi participen. De fet, diversos estudis en humans descriuen una major presència de la població Th17 tant en la mucosa intestinal com en la perifèria dels malalts.

Nivells elevats de **IL-17** en plasma s'han correlacionat amb l'activitat de la malaltia, però també els malalts inactius presenten una concentració més elevada de IL-17 en plasma que els individus control<sup>123</sup>.

A la mucosa intestinal, com en perifèria, només s'observa un augment de les cèl·lules IL-17<sup>+</sup> a les zones on hi ha activitat de la malaltia tant en la malaltia de Crohn com en la colitis ulcerosa, tot i que el nombre és major en la malaltia de Crohn respecte a la colitis ulcerosa. Els trànscrips de IL-17 a la mucosa intestinal afecte de pacients amb malaltia de Crohn són més elevats que a la mucosa sana<sup>46,124</sup>, i també la secreció de IL-17 mesurada en sobrenedant de biòpsies<sup>125</sup>. A nivell cel·lular trobem que el percentatge de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> presents a la mucosa intestinal és major en les zones afectes dels pacients amb malaltia de Crohn respecte als controls sans<sup>126</sup>, i que les cèl·lules positives per IL-17 són CD3<sup>+</sup> però també n'hi ha de CD68<sup>+</sup><sup>123</sup>.

La producció de la citocina IL-17 per part de cèl·lules mononuclears<sup>125</sup> o de les CD4<sup>+</sup> de la làmina pròpia també és més alta en els pacients amb malaltia de Crohn<sup>46</sup>. A més, s'ha descrit un percentatge més alt de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> en la mucosa inflamada de malalts de Crohn i de colitis ulcerosa comparat amb mucosa sana<sup>125</sup> (això també s'ha observat per IFN- $\gamma$ ).

Aïllant les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de la làmina pròpia de pacients amb malaltia de Crohn s'ha observat, tant en zones inactives com actives, una major expressió de **IL-23R** i **RORC**<sup>46</sup>. **STAT-3**, que transdueix i activa la transcripció en resposta a senyalització a través del IL-6R i IL-23R, presenta una major expressió i fosforilació en la làmina pròpia dels pacients amb malaltia de Crohn i amb colitis ulcerosa<sup>105</sup>.

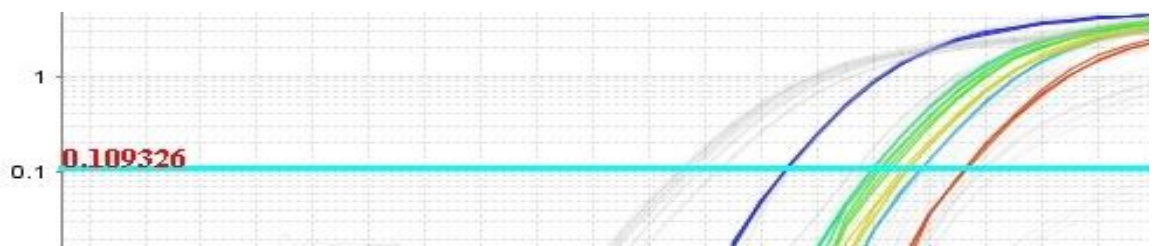
L'altra citocina característica de la població Th17, la **IL-22**, també es troba augmentada en els pacients amb malaltia de Crohn. Així, els trànscrips d'ARN missatger es troben més elevats en biòpsies de zones amb inflamació<sup>127</sup> així com també els nivells de IL-22 en plasma són més alts en els pacients amb malaltia de Crohn, ja estiguin en fase inactiva o activa<sup>128</sup>. A més però aquests nivells de IL-22 en plasma es correlacionen amb l'activitat de la malaltia així com amb els polimorfismes del gen IL-23R; els portadors d'al·lels de conferència de risc per la malaltia de Crohn presenten nivells de IL-22 més elevats en plasma<sup>129</sup>.

El paper de la IL-23 sobre la població Th17 encara està lluny de ser totalment clar. Tot i que per les dades obtingudes en ratolins sabem que sense IL-23 no es desenvolupen les cèl·lules Th17, és encara desconegut el paper que juga en humans. L'addició de IL-23 *in vitro* a cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica induïx una expansió de les cèl·lules Th17. Aquesta expansió s'observa en limfòcits de pacients amb malaltia de Crohn però no en individus control<sup>130</sup>. Curiosament però, la IL-23 no només induïx l'expressió de IL-17

sinó també d'IFN- $\gamma$ <sup>130</sup>. Aquests experiments ens mostren que la línia divisòria entre la població Th1 i Th17 no és clara i que l'efecte i la interrelació entre totes les citocines i altres factors expressats pot ser molt complex.



# Objectius







## OBJECTIUS

Discernir el paper relatiu dels limfòcits Th1 i Th17 en la patogènia de la malaltia de Crohn pot ser decisiu a l'hora d'avaluar noves dianes farmacològiques específiques que no deixin el pacient en un estat d'immunosupressió i per tant amb el sistema immunitari incapacitat per fer front a certs tipus d'infeccions. L'estadi de remissió o activitat de la malaltia és decisiu en el requeriment d'un o altre fàrmac i per tant és important estudiar ambdós estadis de la malaltia així com discernir si l'exacerbació en la resposta de les poblacions limfocitàries en la malaltia de Crohn es dona principalment a nivell local, en la mucosa intestinal inflamada o si també actua a nivell sistèmic. Un altre aspecte important que podria fer variar l'elecció terapèutica és el moment de l'evolució en que es troba el pacient amb la malaltia de Crohn, ja que és plausible que el sistema immunitari no es comporti de la mateixa manera en els primers brots de la malaltia que quan aquesta ja ha esdevingut una inflamació crònica i recurrent amb anys d'evolució.

Així els objectius d'aquest estudi han sigut:

- Avaluar la participació relativa de les poblacions limfocitàries Th17 i Th1 en un mateix grup de pacients amb malaltia de Crohn tant en la mucosa intestinal no afecta i en la inflamada com en circulació sistèmica.
- Caracteritzar la participació de les poblacions limfocitàries Th17 i Th1 en pacients amb malaltia de Crohn en els diferents estadis de remissió i activitat.
- Determinar el paper dels limfòcits Th17 i Th1 en l'inici de la malaltia i estudiar possibles canvis en aquestes poblacions com a conseqüència de l'evolució de la malaltia.



## Material i mètodes





## MATERIAL I MÈTODES

### Pacients

En aquest estudi s'han inclòs controls sans i pacients amb malaltia de Crohn inactiva i activa. Els controls sans no presentaven cap patologia aguda ni crònica coneguda en el moment de l'estudi. El diagnòstic de la malaltia de Crohn es va establir en base a símptomes clínics, paràmetres endoscòpics inequívocs d'inflamació discontinua a l'intestí prim i/o còlon, així com també anormalitats histològiques tal com es descriu a la guia de la European Crohn and Colitis Organisation<sup>54</sup>. L'activitat de la malaltia es defineix en base a 2 criteris: 1) presència de signes i símptomes clínics d'activitat de la malaltia i 2) lesions endoscòpiques clares d'activitat o augment en plasma de la proteïna C reactiva (PCR) (>0,8 mg/dL) en l'absència de complicacions de tipus infeccions. Els períodes de remissió o inactivitat s'han definit com la completa absència de símptomes i recuperació dels nivells normals de la PCR (<0,8 mg/dL). Els pacients amb activitat de la malaltia van ser dividits en 2 grups: debut per la malaltia, quan les mostres van ser obtingudes com a màxim en les 32 setmanes posteriors a l'aparició dels primers símptomes que van portar al diagnòstic de la malaltia i, pacients amb la malaltia avançada quan com a mínim ja havien passat 2 anys des del diagnòstic de la malaltia. Un total de 34 pacients amb malaltia de Crohn (13 amb malaltia inactiva, 9 debuts amb malaltia activa i 12 amb malaltia activa avançada) van ser inclosos en aquest estudi (Taula 5).

	Controls	Malalts inactius	Malaltia activa	
			Debuts	Crònics
<b>n</b>	12	13	9	12
<b>Edat (anys)</b>	33.9 (24-64)	38.9 (28-55)	27.8 (17-38)	39.4 (25-73)
<b>Sexe (H/D)</b>	6/6	4/9	5/4	5/7
<b>Temps des del debut de la malaltia</b>	n.a.	9 anys (1-27)	10 setmanes (1-32)	7 anys (2-11)
<b>Tractament<sup>1</sup></b>	n.a.	3/8/2/0	7/0/2/0	6/4/2/0
<b>Proteïna C reactiva (mg/dL)</b>	n.a.	<0.8	2.36 (0.7-5.7)	5.05 (0.5-13.5)
<b>Malaltia ileal/ileocolònica/colònica</b>	n.a.	3/7/3	4/5/0	2/6/4

**Taula 5.** Característiques dels individus control i dels malalts de Crohn inclosos en l'estudi de cèl·lules de sang perifèrica. Les dades representen la mitja i el rang. n.a = no aplicable.

<sup>1</sup> Sense medicació o 5-asa/immunosupressors/corticosteroids/antibiòtics.

Les biòpsies intestinals es van obtenir de 55 individus sotmesos a colonoscòpia. En aquest tipus de mostra vam utilitzar com a controls sans biòpsies obtingudes de pacients amb càncer colorectal sempre recollint la mostra de la zona del còlon més distal a la ubicació del tumor. Les biòpsies van ser utilitzades per a l'extracció d'ARN i/o per aïllar les cèl·lules mononuclears presents en la làmina pròpia intestinal (Taula 6).

	<b>Controls</b>	<b>Malalts de Crohn</b>
<b>n</b>	16	39
<b>Edat (anys)</b>	66.7 (47-87)	37.5 (17-75)
<b>Sexe (H/D)</b>	8/8	16/23
<b>Temps des del debut de la malaltia</b>	n.a.	8.9 anys (0-29)
<b>Malaltia ileal/ileocolònica/colònica</b>	n.a.	3/26/10
<b>Localització biòpsia amb activitat inflamatòria<sup>1</sup></b>	n.a.	5/30/4

**Taula 6.** Característiques dels individus control i malalts de Crohn inclosos en els estudis de mucosa intestinal. De tots ells es van obtenir biòpsies colonoscòpiques per a l'extracció de RNA o per a l'aïllament de cèl·lules i posterior marcatge intracel·lular. Les dades representen la mitja i el rang. n.a = no aplicable.

<sup>1</sup> íleum/còlon/no registrat.

L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona i les mostres varen ser recollides després que el pacient firmés el corresponent consentiment informat.

### **Manipulació i cultiu de sang total**

La sang de controls sans i pacients va ser extreta en tubs heparinitzats i diluïda (1:4) en medi amb antibiòtics: RPMI suplementat amb 10 µg/ml gentamicina (BioWhittaker, Lonza, Barcelona, Espanya), 100 U/ml penicil·lina, 100 U/ml estreptomycina i 250 ng/ml amfotericina B (BioWhittaker, Lonza). La sang diluïda es va incubar en plaques de 24 pous durant 18 hores. A continuació la sang es va centrifugar i el sobrenedant es va congelar a -80°C per a determinar posteriorment la concentració d'algunes citocines.

### **Aïllament i cultiu de les cèl·lules mononuclears de sang**

Les cèl·lules es varen aïllar de sang total mitjançant Ficoll-Hypaque (Sigma, Madrid, Espanya), un gradient de densitat per centrifugació. En alguns experiments les cèl·lules

mononuclears van ser resuspeses en medi complet (MC): RPMI suplementat amb 10% sèrum boví fetal (BioSera, Ringmer, Gran Bretanya) i antibiòtics, a  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml. En altres experiments els limfòcits  $CD4^+$  van ser aïllats a partir de les cèl·lules mononuclears de sang mitjançant beads magnètiques conjugades a anticossos anti- $CD4$  humans (Miltenyi Biotec, Madrid, Espanya). Els limfòcits  $CD4^+$  (puresa > 98%) es van resuspindre en MC a  $1 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml i van ser cultivats durant 6 dies en presència de 100 U/ml de IL-2 (eBioscience, San Diego, Estats Units).

### **Activació cel·lular i marcatge intracel·lular de citocines**

Tant les cèl·lules mononuclears totals com els limfòcits  $CD4^+$  cultivats van ser activats amb PMA/ionomicina (Sigma; 25 ng/ml i 1 µg/ml respectivament) durant 4 hores en presència de 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma). Les cèl·lules es van rentar, fixar, permeabilitzar i marcar amb anticossos utilitzant els reactius Fix & Perm (Caltag-Invitrogen, Barcelona, Espanya) i seguint el protocol recomanat pel fabricant. Els següents anticossos conjugats a fluorocroms van ser utilitzats per al marcatge de citocines: FITC-anti-IFN- $\gamma$ ; FITC, PE o Alexa Fluor 647-anti-IL-17A, Alexa Fluor 647-anti-IL-21, Alexa Fluor 647-anti-TNF- $\alpha$ , FITC-anti-IL-6 (tots de eBioscience) i PE-anti-IL-22 (R&D Systems, Minneapolis, Estats Units). Després de rentar les cèl·lules es van fixar amb 0,1% paraformaldehid i es van adquirir i analitzar en un citòmetre FACSCantoII amb el software FACSDiva (BDBioscience, Madrid, Espanya).

### **Activació cel·lular i detecció de la producció de citocines**

Per estudiar la producció i secreció de citocines, els limfòcits  $CD4^+$  van ser activats de diferents formes durant el cultiu de 6 dies que ja hem explicat anteriorment. Per aconseguir la senyalització cel·lular via TCR vam utilitzar 1 µg/ml d'anticòs anti- $CD3$  prèviament enganxat a placa i 1 µg/ml d'anti- $CD28$  soluble (BDBioscience). A més en algunes condicions aquesta activació es va fer també en presència o absència d'algunes citocines estimuladores de les diferents poblacions de limfòcits T col·laboradors: 1 ng/ml de proteïna recombinant humana IL-12 (eBioscience) o 50 ng/ml de IL-23 (R&DSYSTEMS). Després dels 6 dies de cultiu es van recollir els sobrenedants i es van guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per a la posterior determinació de citocines.

La concentració de citocines tant en el sobrenedant d'aquests limfòcits  $CD4^+$  cultivats com en el sobrenedant del cultiu de sang total va ser determinada per ELISA. La IL-17 i la IL-23 van ser determinades utilitzant parelles d'anticossos (eBioscience) amb un límit de detecció de 15 pg/ml i 31 pg/ml respectivament. Per a la detecció d'IFN- $\gamma$  i IL-6 vam emprar un ELISA kit (Mabtech, Nacka Strand, Suècia) amb un límit inferior de 31 pg/ml i 15 pg/ml respectivament. Per a la IL-22 vam utilitzar el DuoSet ELISA development kit (R&DSYSTEMS) amb un límit de detecció de 31 pg/ml.



### **Cultiu dels limfòcits CD4<sup>+</sup> en presència de medi condicionat**

Per aquests experiments 50 µl de medi complet varen ser substituïts per 50 µl de medi condicionat d'individus controls, malalts inactius i malalts actius.

Per medi condicionat entenem els sobrenedants resultants del cultiu de 6 dies dels limfòcits CD4<sup>+</sup>.

Les cèl·lules CD4<sup>+</sup> d'individus controls i malalts inactius van ser cultivades en 100 µl de medi complet o 50 µl medi complet + 50 µl de medi condicionat.

Després de 6 dies de cultiu les cèl·lules CD4<sup>+</sup> van ser activades amb PMA/ionomicina/Brefeldina A durant 4 hores i marcades intracel·lularment per a la detecció de citocines.

### **Aïllament de cèl·lules mononuclears de làmina pròpia**

Les cèl·lules mononuclears de la làmina pròpia (LPMCs) es van aïllar seguint, amb alguna modificació, un protocol prèviament descrit<sup>131</sup>. En resum, les biòpsies d'individus controls i de zones sanes i afectes de malalts de Crohn van ser incubades durant 30 minuts a temperatura ambient (TA) amb 1 (biòpsies inflamades) o 5 mM (biòpsies sanes) dithiothreitol (Sigma). Després de rentar les biòpsies van ser incubades per 3 cops durant 30 minuts amb 1 mM EDTA (Promega, Madison, Estats Units) també a TA. Després de rentar es van cultivar les biòpsies durant tota la nit a 37°C en MC en aquest cas suplementat amb una major quantitat d'antibiòtics: 250 U/ml penicil·lina, 250 U/ml estreptomycina i 625 ng/ml amfotericina B. Durant el cultiu les LPMCs migren fora de la biòpsia podent ser recollides i separades fàcilment del teixit restant. Un cop aïllades les LPMCs van ser contades i estimulades amb PMA/ionomicina durant 4 hores en presència de Brefeldina A. A continuació es va realitzar el marcatge intracel·lular de citocines seguint el protocol descrit prèviament.

### **Extracció de ARN i PCR a temps real**

L'ARN tant de biòpsies com del limfòcits CD4<sup>+</sup> aïllats i cultivats es va extreure amb el RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. L'ARN va ser retrotranscrit a ADN complementari (cDNA) utilitzant el High-Capacity cDNA Archive RT kit (Applied Biosystems, Foster City, Estats Units). A continuació vam realitzar una PCR a temps real, amb triplicats per cada mostra amb la TaqMan Universal PCR Master Mix i amb primers i sondes Taqman (Applied Biosystems; Taula 7) per IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN- $\gamma$  i IL-6 en el cas de les biòpsies, i per IL23R, IL12R $\beta$ 2 en el cas dels limfòcits CD4<sup>+</sup>. En els 2 casos GUS va ser el gen endogen emprat. La PCR a temps real es va dur a terme en el 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les deltaCts ( $\Delta$ Ct = Ct gen d'interès - Ct gen endogen) es van

calcular per cada gen i per cada mostra i, a partir d'aquí es va calcular també la taxa d'increment de cada gen d'interès utilitzant la fórmula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  on  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  mostra pacient –  $\Delta Ct$  mitja dels controls.

Molècula amplificada	Referència Applied Biosystems	Nº seqüència de referència
<b>IL-17 A</b>	Hs00174383_m1	NM_002190.2
<b>IL-17 F</b>	Hs00369400_m1	NM_052872.3
<b>IL-22</b>	Hs00220924_m1	NM_020525.4
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Hs00174143_m1	NM_000619.2
<b>IL-6</b>	Hs00174131_m1	NM_000600.2
<b>IL-23R</b>	Hs00332759_m1	NM_144701.2
<b>IL-12R<math>\beta</math>2</b>	Hs00155486_m1	NM_001559.2
<b>Gus-B</b>	4326320E	NM_000181.1

**Taula 7.** Referències dels primers i sondes Taqman utilitzats per a l'amplificació del cDNA de les molècules detallades.

### Immunohistoquímica de IL-17

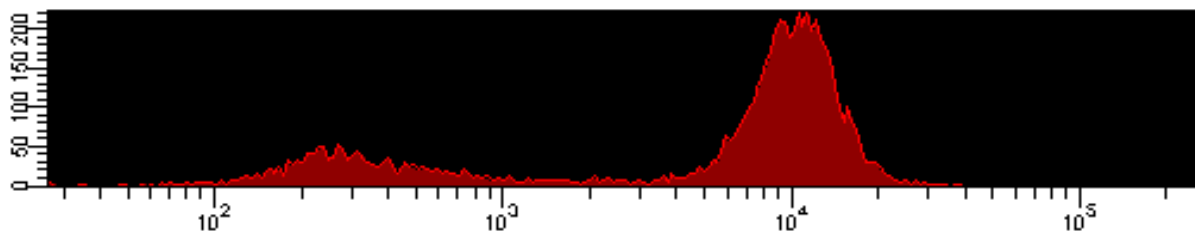
Biòpsies d'individus control, pacients amb malaltia de Crohn debut i avançats van ser seleccionades, requerint en els malalts la documentació endoscòpica i histològica de la presència d'activitat moderada-greu de la malaltia. Les seccions de 2  $\mu$ m de gruix procedents de blocs de teixit parafinat van ser desparafinades i processades per a la tinció immunohistoquímica de forma automàtica utilitzant l'equip BOND Max (Vision BioSystems, Barcelona, Espanya) i el protocol recomanat pel fabricant. En resum, es procedeix primer a un desenmascarament de l'antigen a pH 6.0 durant 20 minuts. Per a la detecció de la IL-17 es va utilitzar un anticòs policlonal obtingut en cabra (R&D Systems, 1/200). La detecció es va dur a terme amb un anticòs secundari de conill anti-cabra i finalment un polímer anti-conill conjugat amb peroxidasa. El cromogen utilitzat per al revelat de la immunodetecció fou la diaminobenzidina. Finalment les seccions varen ser contrastades amb la tinció d'hematoxilina, deshidratades i muntades per a l'examen microscòpic. Com a control negatiu, algunes seccions van ser processades substituint l'anticòs primari per immunoglobulina de cabra no específica a la mateixa concentració, obtenint mostres negatives per a la tinció.

### Anàlisi estadístic

Si no s'indica el contrari les dades són expressades amb la mitja $\pm$ error estàndard. En les comparacions entre 2 grups l'anàlisi escollit és el Mann-Whitney, anàlisi de tipus no paramètric ja que totes les dades dels nostres estudis no s'ajusten a una distribució

normal. En les comparacions entre 3 o més grups hem aplicat un anàlisi ANOVA amb la correcció de Bonferroni per a múltiples comparacions. Algunes dades han sigut analitzades utilitzant també el test aparellat i la correlació de Spearman. En tots els casos s'ha considerat estadísticament significatiu un p-valor  $< 0,05$ .

# Resultats



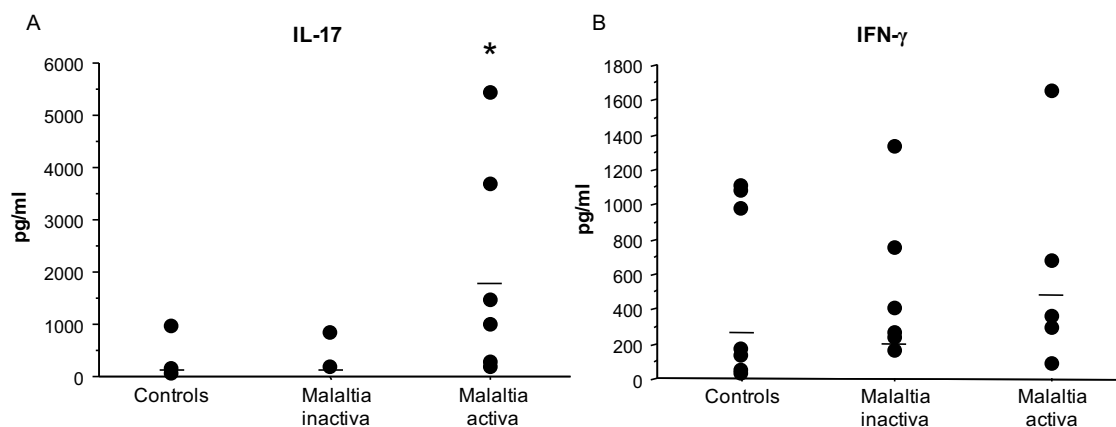


## RESULTATS

### Augment de IL-17 en el cultiu de sang total de pacients amb malaltia de Crohn activa

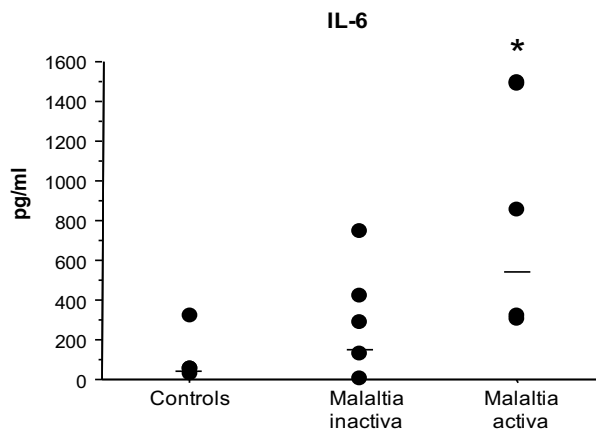
Estudis previs van demostrar una correlació entre l'activitat de la malaltia de Crohn i nivells elevats de IL-17 en plasma<sup>123</sup>. En el nostre grup de malalts corroborarem un augment d'aquesta citocina en els malalts amb activitat ( $1720,1 \pm 779,7$  pg/ml (mitja  $\pm$  mitja de l'error estàndard),  $n=7$ ) respecte als malalts inactius ( $115,53 \pm 92,6$  pg/ml,  $n=9$ ;  $p=0.0031$ ) i als controls ( $115,4 \pm 94,6$  pg/ml,  $n=10$ ;  $p=0.0026$ ; Figura 14A).

En canvi pel que fa a IFN- $\gamma$  no hem trobat diferències entre els grups estudiats. La quantitat mitja d'IFN- $\gamma$  ajuntant tots els grups és  $263 \pm 72$  pg/ml ( $n=37$ , Figura 14 B).



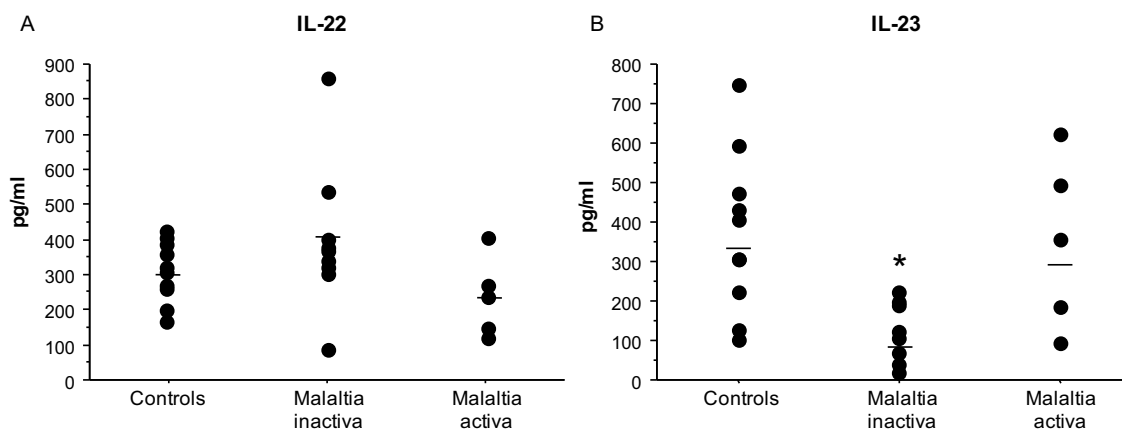
**Figura 14.** Quantitat de les citocines IL-17 (A) i IFN- $\gamma$  (B) mesurades per ELISA en els sobredants de sang total incubada 18 hores. Cada punt representa un individu i la ratlleta indica la mitja aritmètica del grup. \*  $p$ -valor  $< 0.005$  respecte a malaltia inactiva i a controls.

Com a control que el nostre grup de malalts es troba dins els paràmetres ja observats vam mesurar la concentració de IL-6 en els sobredants de sang total. L'augment d'aquesta citocina en plasma s'ha correlacionat amb l'activitat de la malaltia de Crohn<sup>132,133</sup>. També en el nostre grup de malalts trobem que la concentració d'aquesta citocina és major en els sobredants dels que presenten activitat ( $560 \pm 228$  pg/ml,  $n=8$ ) respecte als malalts inactius ( $146 \pm 74$  pg/ml,  $n=11$ ;  $p=0.03$ ) i als controls ( $59 \pm 39$  pg/ml,  $n=8$ ;  $p=0.016$ , Figura 15).



**Figura 15.** Quantitat de la citocina IL-6 mesurada per ELISA en els sobredants de sang total incubada 18 hores. Cada punt representa un individu i la ratlleta indica la mitja aritmètica del grup. \* p-valor < 0.05 respecte a malaltia inactiva i a controls.

Davant l'augment de IL-17 observat en els pacients amb malaltia activa també vam mesurar altres citocines relacionades amb la població Th17, la IL-22 i la IL-23. En el cas de la primera, detectem aquesta citocina en quantitats molt similars en tots els grups d'estudi (mitja conjunta de tots els grups =  $326 \pm 32$  pg/ml,  $n = 24$ , Figura 16 A). En canvi, en el cas de la IL-23 observem que els malalts inactius presenten una menor concentració d'aquesta citocina ( $86 \pm 25,4$  pg/ml,  $n = 11$ ) en el cultiu de sang total respecte als malalts actius ( $290,1 \pm 98,2$  pg/ml,  $n = 6$ ,  $p = 0.037$ ) però també respecte als controls sans ( $336,2 \pm 67,1$  pg/ml,  $n = 11$ ;  $p = 0.0034$ , Figura 16 B).



**Figura 16.** Quantitat de les citocines IL-22 (A) i IL-23 (B) mesurades per ELISA en els sobredants de sang total incubada 18 hores. Cada punt representa un individu i la ratlleta indica la mitja aritmètica del grup. \* p-valor < 0.05 respecte a malaltia activa i a controls.

Tenint en compte que alguns dels pacients en el moment de la recollida de la mostra es troben en tractament amb immunosupressors, vam fer un subanàlisi per determinar que aquest tractament independentment de l'estadi de la malaltia no afectés les concentracions de les citocines mesurades en els sobredants del cultiu de sang total. La concentració de totes les citocines estudiades no va resultar significativament diferent entre el grup de malalts que està en tractament amb immunosupressors i els que no es troben sota aquest tractament (Taula 8).

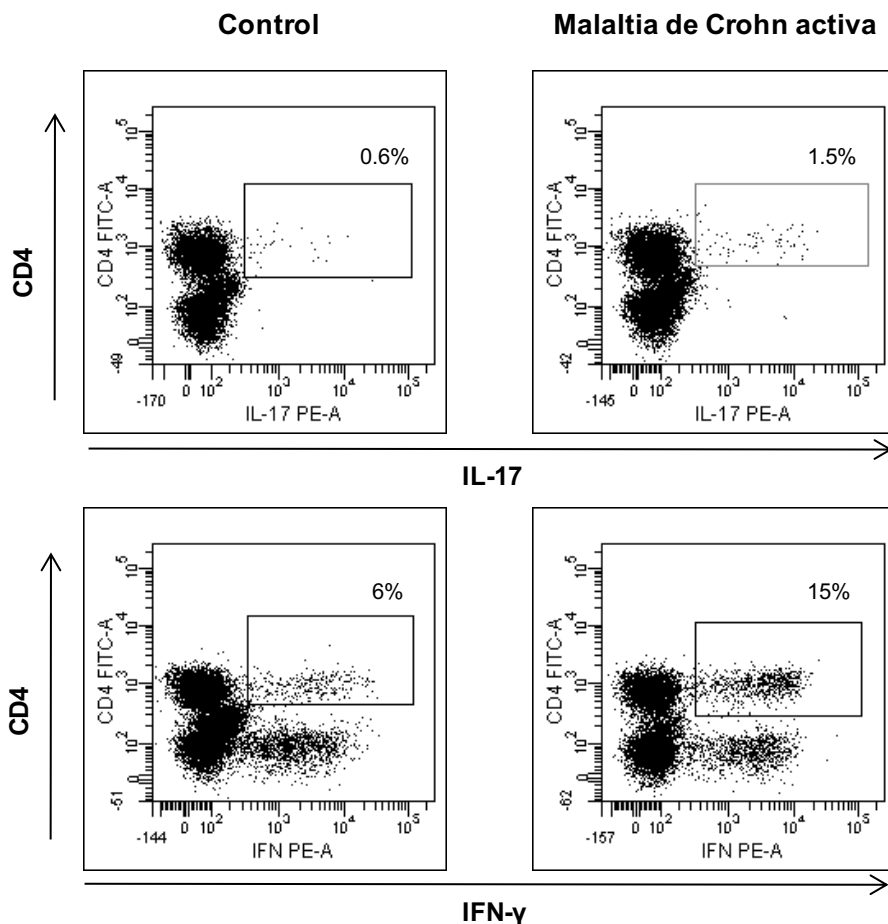
Citocina	Malalts amb immunosupressors	n	Malalts sense immunosupressors	n	p-valor
IFN- $\gamma$	292 $\pm$ 121	17	204 $\pm$ 109	6	0.97
IL-17	701 $\pm$ 449	12	1167 $\pm$ 867	4	0.8
IL-23	114 $\pm$ 42	12	264 $\pm$ 103	5	0.11
IL-22	302 $\pm$ 41	10	429 $\pm$ 156	4	0.39
IL-6	829 $\pm$ 590	11	355 $\pm$ 162	10	0.82

**Taula 8.** Concentració en pg/ml de les diferents citocines estudiades en el grup de malalts tractats o no amb immunosupressors. Els valors es mostren com la mitja $\pm$ SEM.

#### **La producció de IL-17 i IFN- $\gamma$ és més elevada en les cèl·lules CD4<sup>+</sup> circulants dels malalts actius**

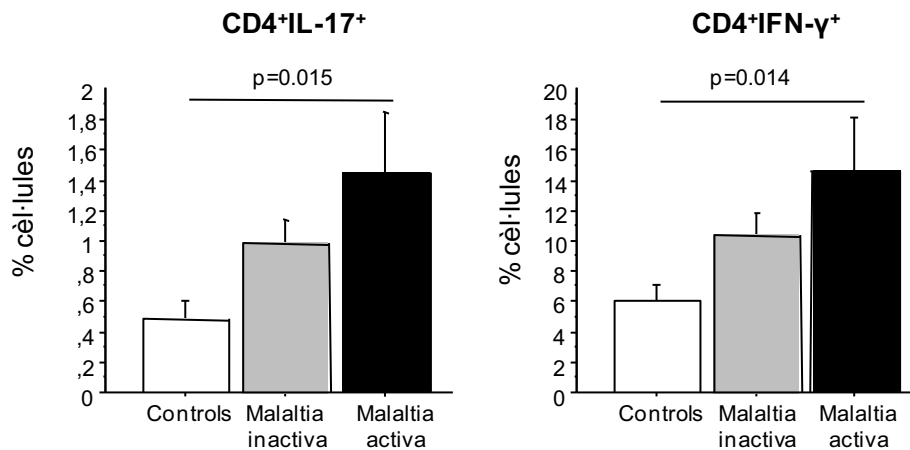
Quan vam caracteritzar l'origen cel·lular de la producció d'aquestes citocines en sang perifèrica, vam identificar que l'IFN- $\gamma$  és produït tant per cèl·lules CD4<sup>+</sup> com CD4<sup>-</sup>, mentre que la IL-17 només per part de les CD4<sup>+</sup> (Figura 17).





**Figura 17.** Producció de les citocines IL-17 i IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica. Les citocines foren detectades per marcatge intracel·lular després d'incubar les cèl·lules durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. Dot plots representatius d'un individu control i un malalt amb activitat. El percentatge que es mostra és respecte a la població CD4<sup>+</sup>.

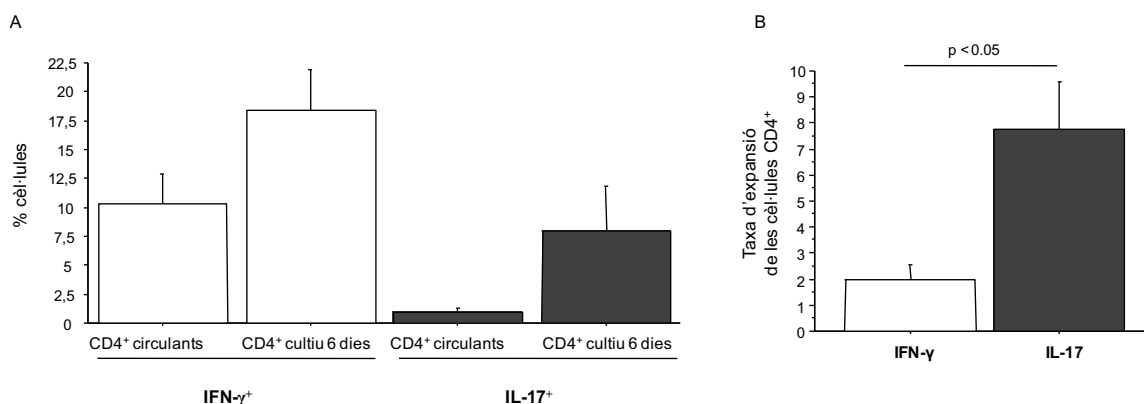
Si considerem només les cèl·lules CD4<sup>+</sup> trobem que en els controls sans, les cèl·lules Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) representen un 6% (2,4-9,1%) de les CD4<sup>+</sup>, mentre que només un 0,5% (0,2-0,9%) són Th17 (IL-17<sup>+</sup>). A més, tant el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> com IL-17<sup>+</sup> és significativament més alt en els pacients amb malaltia de Crohn que presenten activitat de la malaltia respecte als controls, mentre que els malalts inactius presenten uns percentatges intermedis entre els dos grups, sense arribar a ser significativament diferents (Figura 17 i Figura 18).



**Figura 18.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica productores de IL-17 i IFN- $\gamma$ . Les citocines foren detectades per marcatge intracel·lular després d'incubar les cèl·lules durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. Els gràfics mostren el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> per les dues citocines estudiades. El p-valor significatiu entre el grup de malalts actius i controls es mostra en cada cas. Controls n= 6; malaltia inactiva n= 10; malaltia activa n= 6.

### Enriquiment de la població Th17 en el cultiu de limfòcits CD4<sup>+</sup>

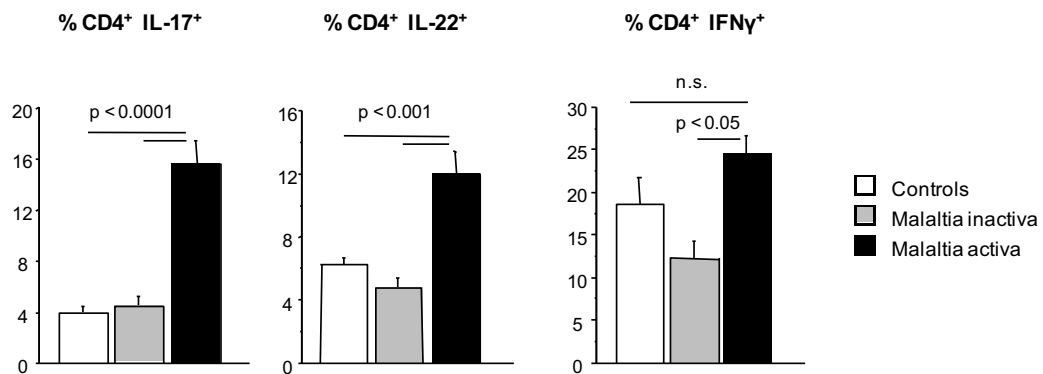
Donat el major percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presents en la sang perifèrica dels malalts actius, vam aïllar i cultivar les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> circulants per tal d'estudiar-les en major detall. Durant el cultiu de 6 dies en presència de IL-2, els limfòcits CD4<sup>+</sup> proliferen però de forma diferencial entre les poblacions Th1 i Th17. Pel que fa a les cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  trobem una expansió mitja dels diferents grups de  $1,98 \pm 0,6$  cops respecte al percentatge mesurat en les cèl·lules mononuclears abans de ser cultivades. D'altra banda, les cèl·lules productores de IL-17 mostren una expansió fins a 10,8 cops superior en el cas dels malalts actius (mitja de tots els grups=  $7,7 \pm 1,8$ ;  $p < 0,05$  respecte a la mitja de l'enriquiment observat per les cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$ ; Figura 19 A i B).



**Figura 19.** (A) Percentatge de cèl·lules positives per IFN- $\gamma$  i IL-17. Es compara el percentatge de cèl·lules positives en dues condicions cel·lulars diferents: en les CD4<sup>+</sup> circulants, només estimulades durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A; i en les CD4<sup>+</sup> aïllades i mantingudes en cultiu amb IL-2 durant 6 dies i reestimulades les últimes 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. (B) Taxa d'expansió de les CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  i IL-17 mantingudes en cultiu durant 6 dies respecte a les circulants.

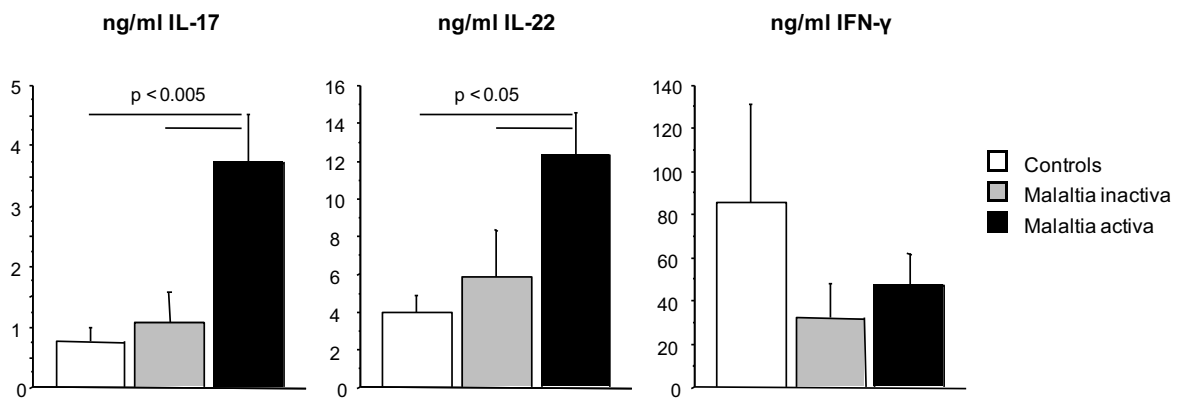
Així doncs, el que ja havíem observat en les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica directament marcades es va fer més evident després del cultiu, arribant a percentatges significativament molt més alts de cèl·lules CD4<sup>+</sup> productores de IL-17 en els malalts actius respecte als controls i als malalts inactius. En les cèl·lules CD4<sup>+</sup> cultivades també vam mesurar la IL-22, tant per marcatge intracel·lular com per producció en el sobrenedant, observant el mateix comportament que per a la IL-17 i corroborant per tant les diferències descrites en la població Th17.

També en el cas de les cèl·lules productores de IFN- $\gamma$  trobem un major percentatge en els malalts actius respecte als inactius (Figura 20).



**Figura 20.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> positives per les citocines IL-17, IL-22 i IFN-γ, després del cultiu de 6 dies. El p-valor o la manca de diferència (n.s.) es mostra en cada cas. Controls n= 12; malaltia inactiva n= 13; malaltia activa n= 12.

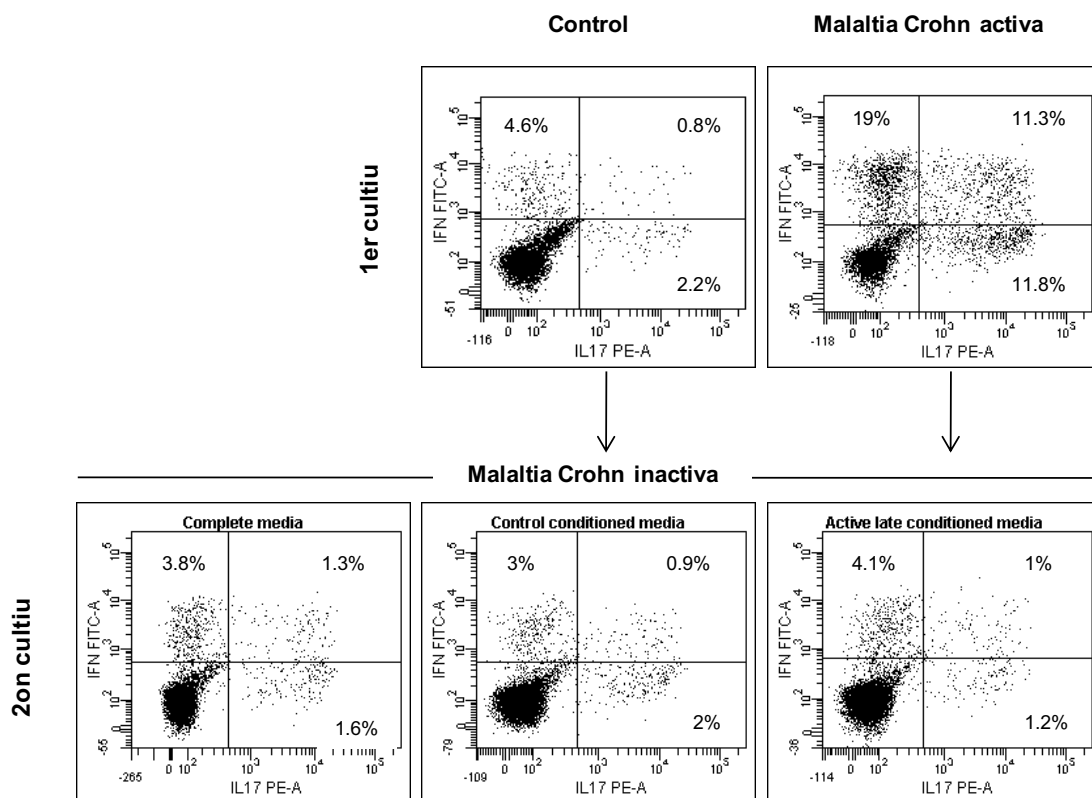
Per completar la informació respecte a la producció d'aquestes 3 citocines, les vam mesurar en els sobrenedants de les cèl·lules cultivades durant 6 dies, trobant en el cas de les citocines Th17 la mateixa diferència ja observada en el percentatge de cèl·lules: els malalts actius produeixen més IL-17 i IL-22 que els malalts inactius i que els controls. En canvi, la producció d'IFN-γ és igual en tots els grups.



**Figura 21.** Gràfiques de la quantitat (ng/ml) de citocina (IL-17, IL-22 i IFN-γ) produïda en el sobrenedant dels limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies. Controls n= 12; malaltia inactiva n= 13; malaltia activa n= 12.

## Efecte del medi condicionat de malalts actius sobre les cèl·lules CD4<sup>+</sup>

Basant-nos en la major expansió de la població Th17 durant el cultiu *ex vivo* observada en els malalts actius, vam hipotetitzar que les cèl·lules CD4<sup>+</sup> d'aquest grup de malalts podia estar produint algun factor autocrí soluble que induís de forma preferencial l'expansió dels limfòcits Th17. Per provar això, vam cultivar cèl·lules CD4<sup>+</sup> d'individus control o de malalts de Crohn inactius en 1) medi complet normal o 2) medi condicionat pel cultiu previ durant 6 dies de cèl·lules CD4<sup>+</sup> dels diferents grups de malalts. Les cèl·lules d'individus control o malalts inactius es van comportar de la mateixa manera en presència del medi complet normal que en presència dels diferents medis condicionats. Inclús en presència del medi condicionat per cèl·lules CD4<sup>+</sup> dels malalts actius que manifesten una gran expansió de les cèl·lules Th17, les cèl·lules dels malalts inactius i controls no responen amb una major expansió sinó totalment comparable a les demés condicions de cultiu (Figura 22). Així doncs, sembla que les diferències observades en els malalts actius no són degudes a un factor soluble produït pels limfòcits CD4<sup>+</sup>.



**Figura 22.** Dot plots representatius dels experiments de cultiu amb medi prèviament condicionat. Al 1er cultiu, les cèl·lules d'un malalt de Crohn actiu mostren una major producció de IL-17

respecte al control. En el 2on cultiu, les cèl·lules d'un malalt de Crohn inactiu són cultivades durant 6 dies amb medi complet fresc o amb els sobrenedants obtinguts del 1er cultiu. En tots els plots s'indica el percentatge de cèl·lules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>.

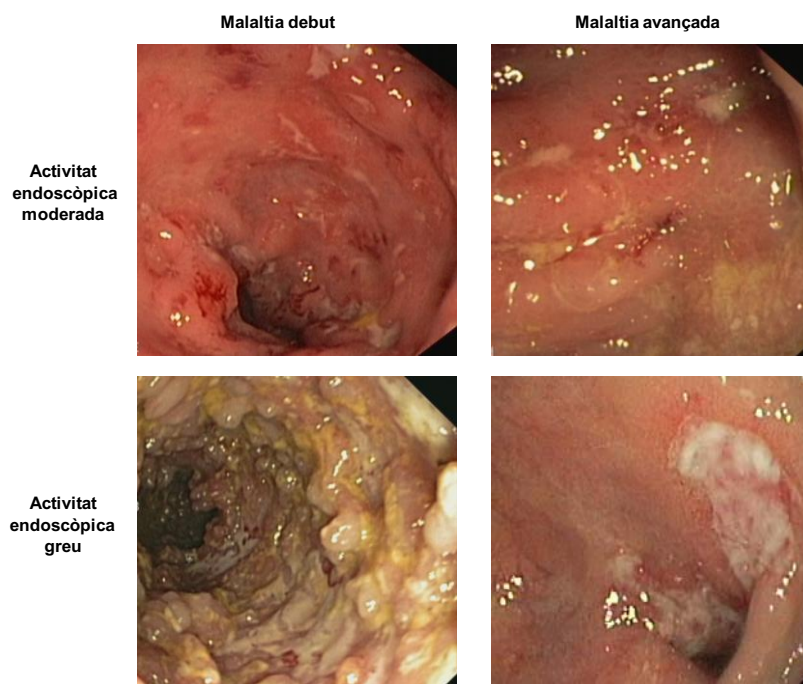
### **Pacients debut per la malaltia presenten una activitat clínica i endoscòpica similar als malalts avançats**

Fins ara hem mostrat que la malaltia de Crohn activa s'associa amb un augment de la població Th17 en sang perifèrica. No sabem però quin paper juguen aquestes cèl·lules en els diferents estadis durant l'evolució de la malaltia; si poden estar involucrades en l'inici de la malaltia induint el reclutament de neutròfils al lloc de la inflamació, o si l'augment d'aquestes cèl·lules Th17, essent conseqüència de la desregulació d'altres cèl·lules del sistema immunitari, és ja un signe de cronicitat.

Per estudiar la importància biològica de les poblacions T efectores en sang perifèrica i esbrinar si juguen un paper en l'inici de la malaltia, varem incloure un nou grup d'estudi. Es tracta de malalts de Crohn que presenten el seu primer brot d'activitat de la malaltia.

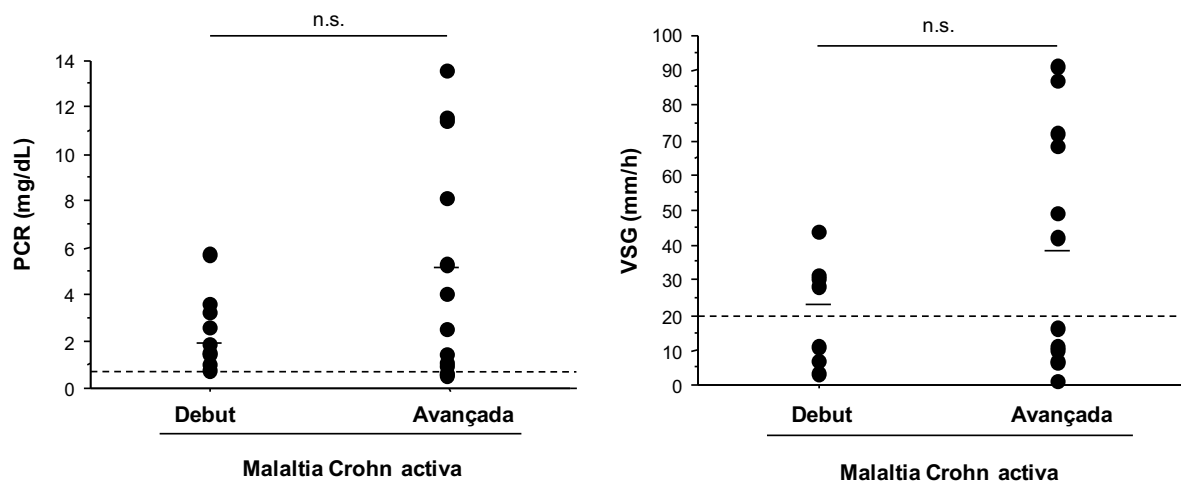
La inclusió d'aquests malalts ha estat un repte, ja que en molts casos els malalts es diagnostiquen ja en fases avançades de la malaltia. Alguns dels que en un principi entraven com casos de nou diagnòstic al nostre centre havien de ser exclosos un cop revisàvem els antecedents degut a que ja havien presentat símptomes en anys anteriors sense haver sigut diagnosticats de malaltia de Crohn. Així doncs, els criteris de selecció dels malalts debut han sigut estrictes i pel fet de voler comparar aquest grup amb els malalts avançats vam creure molt important determinar la intensitat de l'activitat en els dos casos per tal que fos comparable. L'equip de metges amb el que col·labora el nostre grup va avaluar l'activitat de tots els pacients participants a l'estudi. La selecció es va basar en 2 criteris de determinació de l'activitat: a) presència de símptomes clínics d'activitat de la malaltia (dolor abdominal, diarrea, febre, afectació de l'estat general) i, b) lesions endoscòpiques clares d'activitat de la malaltia o proteïna C reactiva elevada (>0,8mg/dL) en absència de qualsevol tipus d'infecció.

L'activitat endoscòpica es classifica en 3 graus d'intensitat: lleu (essent l'eritema i la pèrdua del patró vascular els trets característics), moderada (friabilitat i erosions) i greu (úlceres superficials o profundes). Tots els pacients amb malaltia de Crohn activa inclosos a l'estudi presentaven activitat endoscòpica moderada-greu. En el 71% i el 85% dels pacients debut i amb malaltia avançada respectivament es va detectar la presència d'úlceres en algun tram de l'intestí.



**Figura 23.** Fotografies realitzades durant proves endoscòpiques representatives de pacients amb malaltia de Crohn debut i avançada.

A part de la proteïna C reactiva, un altre paràmetre sistèmic que s'utilitza per avaluar la intensitat de l'activitat és la velocitat de sedimentació globular (VSG). Ambdós paràmetres van ser estudiats en els nostres grups de malalts actius sense que hi trobéssim diferències significatives entre ells (Figura 24).

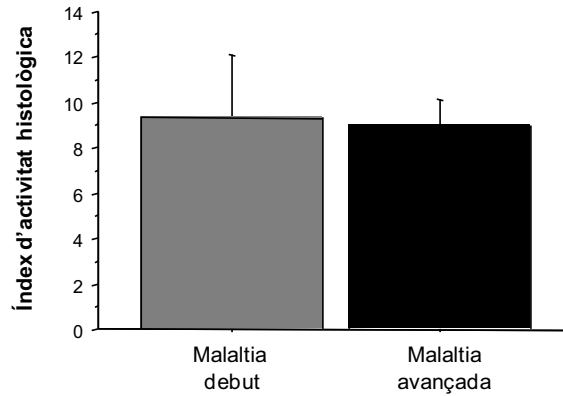


**Figura 24.** Nivells de proteïna C reactiva (PCR) i de velocitat de sedimentació globular (VSG) en els 2 grups de malalts que presenten activitat de la malaltia: debut i avançats. En les dues gràfiques la línia discontinua senyala el límit superior de l'interval de referència del paràmetre. Malaltia debut n= 8; malaltia avançada n= 12.

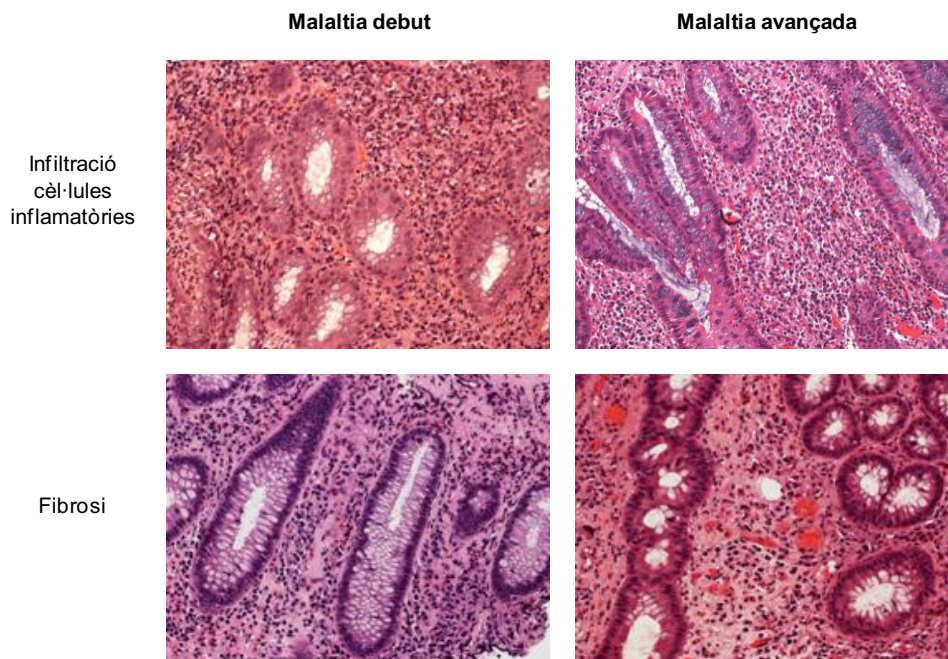
Un altre paràmetre que hem pogut estudiar per confirmar *a posteriori* l'activitat dels pacients amb malaltia de Crohn ha sigut l'infiltrat inflamatori valorat en talls histològics de biòpsies (excepte dels 4 pacients reclutats a través d'altres hospitals, dels quals no teníem accés a aquestes mostres). L'índex d'activitat va ser calculat (a cegues i per una patòloga experimentada) per tots els pacients amb malaltia de Crohn debut reclutats al nostre hospital (n=5) i alguns amb malaltia avançada (n=4) sense trobar diferències entre els grups (Figura 25A). Per al càlcul de l'índex d'activitat histològica ens vam basar en un índex prèviament descrit<sup>134</sup> i el vam adaptar, valorant de 0 a 3 cada un dels següents paràmetres: dany epitelial, alteració de l'arquitectura, inflamació crònica (infiltració limfòcits), inflamació aguda (infiltració polimorfonuclears), criptitis, abscessos, erosions/ulceracions, granulomes i fibrosi. Tots els pacients inclosos en aquest estudi presenten en algun tram de l'intestí inspeccionat infiltració de cèl·lules inflamatòries i fibrosi (Figura 25B).



A



B

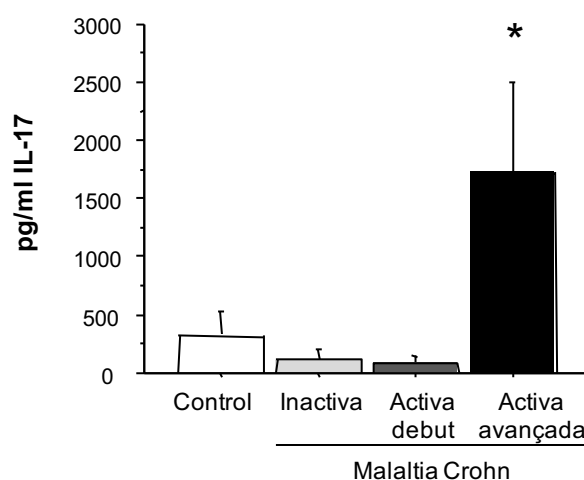


**Figura 25.** (A) Índex d'activitat histològica valorat en les biòpsies d'íleon i/o còlon dels pacients amb malaltia de Crohn debut (n=5) i avançada (n=4). Els dos grups presenten un grau d'activitat molt similar. El valor d'aquest índex per a una mucosa sana és 0.

(B) Talls histològics de biòpsies intestinals contrastats amb la tinció d'hematoxilina-eosina. Les fotografies de pacients debut i amb malaltia avançada són representatives de l'infiltrat de cèl·lules inflamatòries i la fibrosi observats en tots els talls afectes estudiats. Augment 200x.

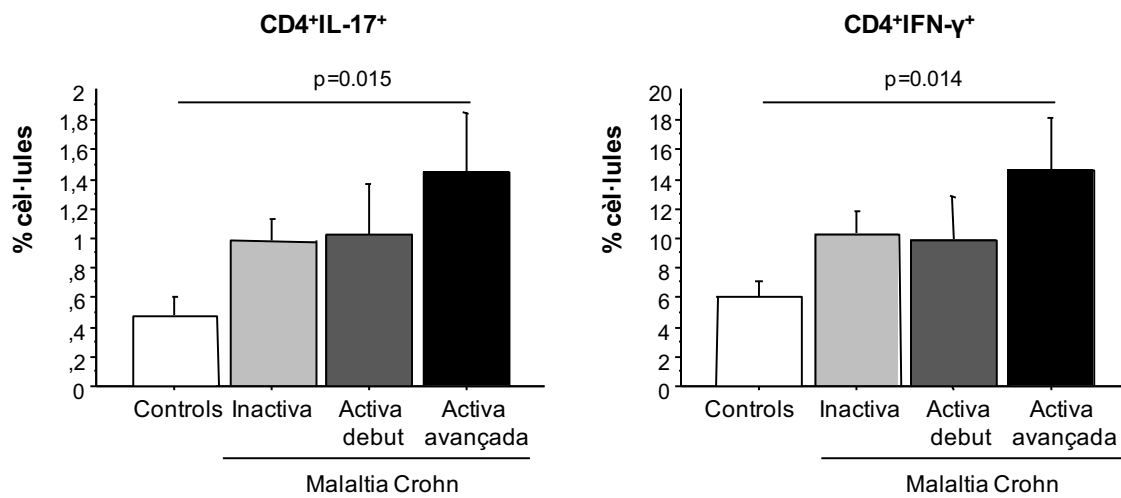
### Els pacients debut per a la malaltia no presenten una major resposta Th17 a perifèria tot i presentar activitat clínica

Tot i la presència d'activitat clínica, els malalts debut per a la malaltia presenten una concentració de IL-17 en sobredants del cultiu de sang total significativament menor ( $74,99 \pm 61,88$  pg/ml,  $n=6$ ) que la detectada en els malalts actius ( $1720,1 \pm 779,7$  pg/ml,  $n=7$ ;  $p=0.0055$ ) estudiats prèviament (tots ells amb una malaltia que anomenem avançada i amb una monitorització mitja de 7 anys (2-11 anys)) (Figura 26).



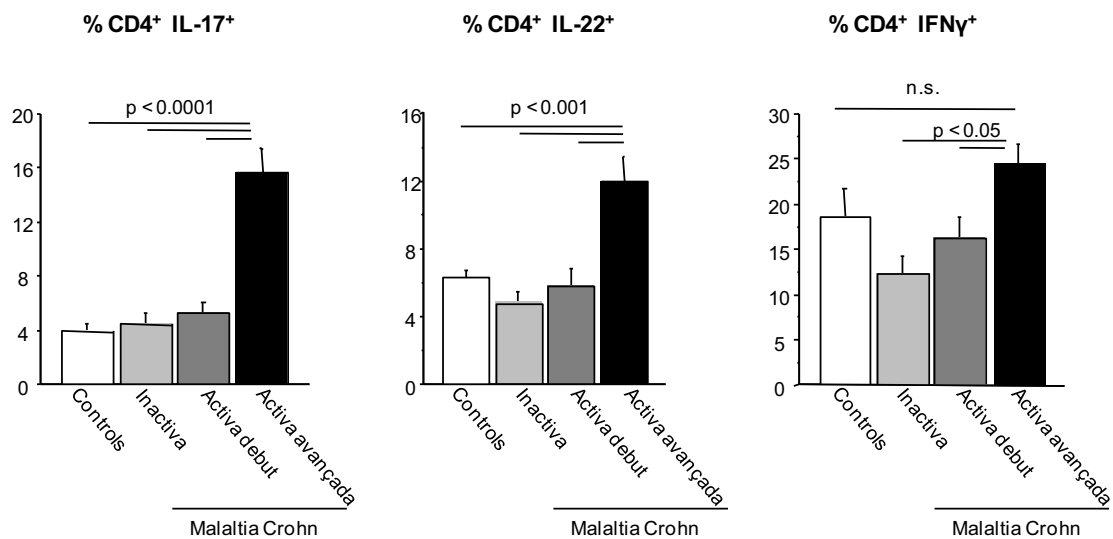
**Figura 26.** Quantitat de la citocina IL-17 mesurada per ELISA en el sobredant de sang total incubada 18 hores. Les dades d'aquesta figura són les mateixes que en la Figura 14A afegint però les dades del grup de pacients debut per a la malaltia. \*  $p$ -valor  $< 0.006$  respecte a malaltia inactiva, activa debut i a controls.

A més el percentatge de cèl·lules  $CD4^+IL-17^+$  mesurades directament de la fracció de mononuclears de sang perifèrica tampoc no era més alt que en els controls (controls:  $0,48 \pm 0,12\%$ ,  $n=6$  respecte malalts actius debut:  $1,02 \pm 0,34\%$ ,  $n=6$ ;  $p=n.s.$ ). Aquests malalts actius debut tampoc no es comportaven com els actius avançats pel que fa a l'IFN- $\gamma$  sinó que el percentatge d'aquestes cèl·lules era molt similar al dels malalts inactius (Figura 27).



**Figura 27.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica productores de IL-17 i IFN- $\gamma$ . Les citocines foren detectades per marcatge intracel·lular després d'incubar les cèl·lules durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. Els gràfics mostren el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> per les dues citocines estudiades. Les dades d'aquesta figura són les mateixes que en la Figura 18 afegint però les dades del grup de pacients debut per a la malaltia. El p-valor significatiu entre el grup de malalts actius i controls es mostra en cada cas.

Igualment, quan varem cultivar les cèl·lules CD4<sup>+</sup> d'aquests malalts també vam trobar que en aquest cas tant les cèl·lules Th1 com les Th17 no s'expandien tant com les dels malalts actius avançats, sinó que es comportaven igual que les dels malalts inactius o els individus controls (Figura 28).

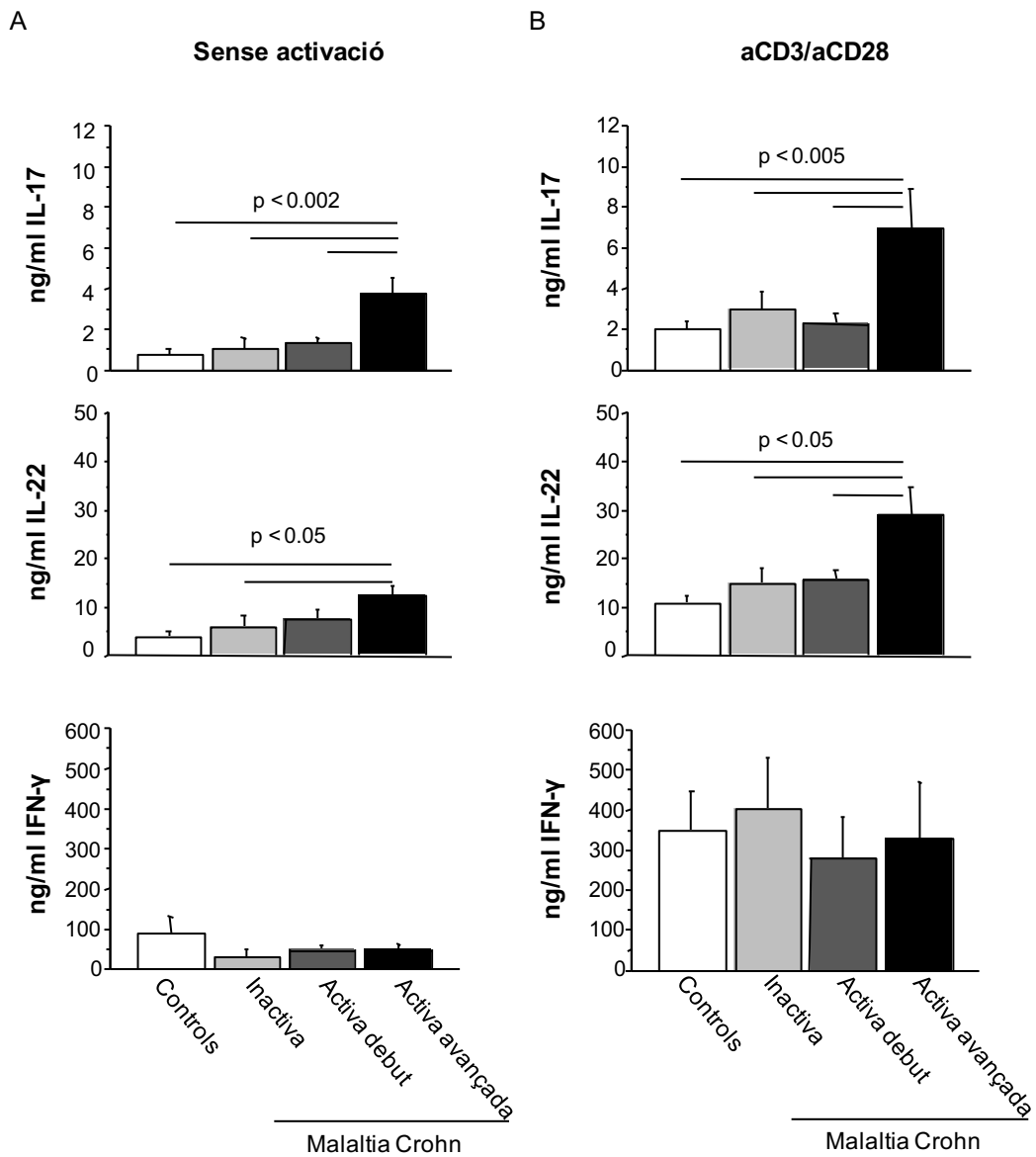


**Figura 28.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> positives per les citocines IL-17, IL-22 i IFN-γ, després del cultiu de 6 dies. Les dades d'aquesta figura són les mateixes que en la Figura 20 afegint però les dades del grup de pacients debut per a la malaltia. El p-valor o la manca de diferència (n.s.) es mostra en cada cas. Controls n= 12; malaltia inactiva n= 13; activa debut n= 9; activa avançada n=12.

### La producció de citocines Th17 és major només en els malalts actius en estadis avançats

A banda del percentatge de cèl·lules productores, la quantitat de citocines produïdes en el sobrenedant del cultiu ens aporta una dada més funcional sobre aquestes poblacions de limfòcits. Així doncs vam mesurar la IL-17 i la IL-22 com a citocines del llinatge Th17 i l'IFN-γ del Th1. En absència d'activació policlonal (a-CD3/a-CD28) i en concordança amb el major percentatge de cèl·lules positives, vam observar un augment significatiu de la concentració de IL-17 i IL-22 en els sobrenedants de les cèl·lules dels malalts actius avançats respecte als actius debut, als inactius i als controls (Figura 29 A, panells superiors). En canvi, la producció de IFN-γ era igual entre tots els grups d'estudi (Figura 29 A, panell inferior).

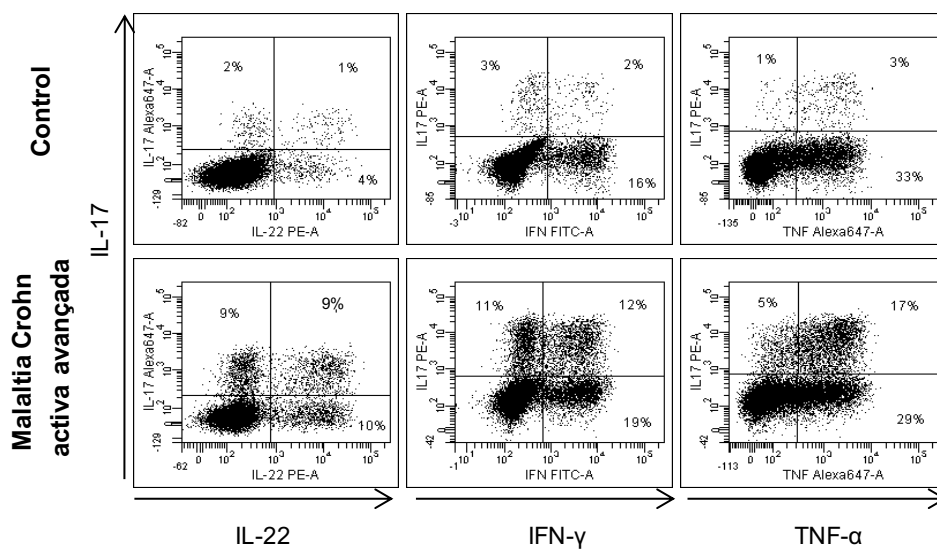
L'activació policlonal amb anti-CD3/CD28 provoca un augment en la producció de totes les citocines (test aparellat,  $p < 0.05$  per a cada una d'elles). Les diferències ja observades sense estimulació es fan d'aquesta forma encara més evidents entre malalts actius avançats i la resta de grups, observant una major producció de les citocines Th17 però no d'IFN-γ (Figura 29 B).



**Figura 29.** Producció de les citocines IL-17, IL-22 i IFN- $\gamma$  mesurades per ELISA en els sobrenedants dels cultius de 6 dies de les cèl·lules CD4<sup>+</sup>. (A) Condició de cultiu basal, sense activació policlonal de les cèl·lules, (B) condició de cultiu amb activació amb anti-CD3/anti-CD28. Els p-valors significatius es mostren en cada cas. Controls n= 12; malaltia inactiva n= 13; activa debut n= 9; activa avançada n=12.

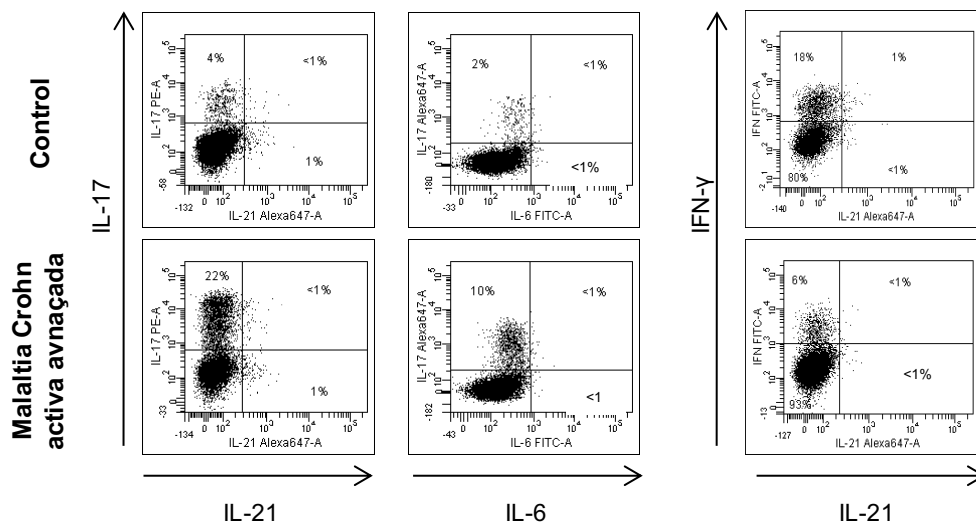
### Les cèl·lules Th17 de sang perifèrica produeixen IL-22, IFN- $\gamma$ i TNF- $\alpha$

Donat el major nombre de cèl·lules Th17 en els pacients amb malaltia de Crohn amb activitat, vam voler esbrinar si a més d'aquesta major capacitat d'expansió també es comportaven diferent respecte a la producció d'altres citocines. Els nostres resultats corroboren la producció de IL-22 per part dels limfòcits Th17, amb un 33% de cèl·lules IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>. A més però les cèl·lules Th17 són capaces de co-produir juntament amb la IL-17 citocines típicament Th1, com el TNF- $\alpha$  (>80% de les Th17 produeixen TNF- $\alpha$ ) i l'IFN- $\gamma$  (>40%) (Figura 30).



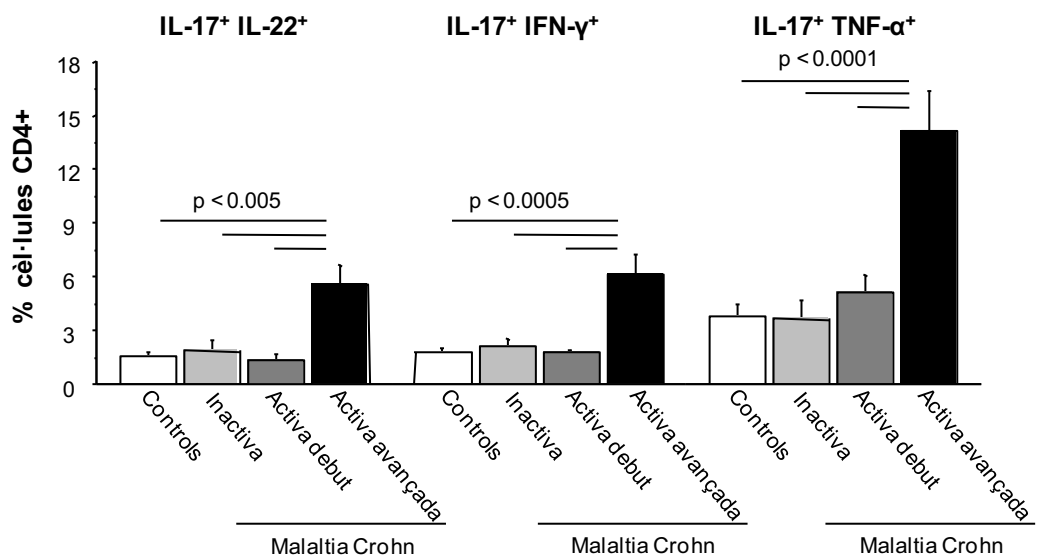
**Figura 30.** Dot plots representatius d'un control i un pacient amb malaltia de Crohn activa avançada. Els plots mostren el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> que produeixen IL-17 juntament amb IL-22, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ .

Una altra citocina que en ratolí s'ha descrit com a partícep en la diferenciació i també produïda per la mateixa subpoblació Th17, és la IL-21<sup>135</sup>. En humans el seu paper autocrí i la relació amb el llinatge Th17 no sembla tan clara<sup>136</sup>. Els nostres resultats mostren que el percentatge de cèl·lules productores de IL-21 és molt baix en tots els grups (1-1,5%) i aquest baix percentatge té una major associació amb cèl·lules Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) que amb cèl·lules Th17 (IL-17<sup>+</sup>). Pel que fa a la citocina pro-inflamatòria IL-6, no es va detectar en els limfòcits CD4<sup>+</sup> aïllats de sang perifèrica (Figura 31).



**Figura 31.** Dot plots representatius d'un control i un pacient amb malaltia de Crohn activa avançada. Els plots mostren el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> que produeixen IL-17 juntament amb IL-21 i IL-6. A la dreta es mostren dos plots de la producció de IFN-γ i IL-21.

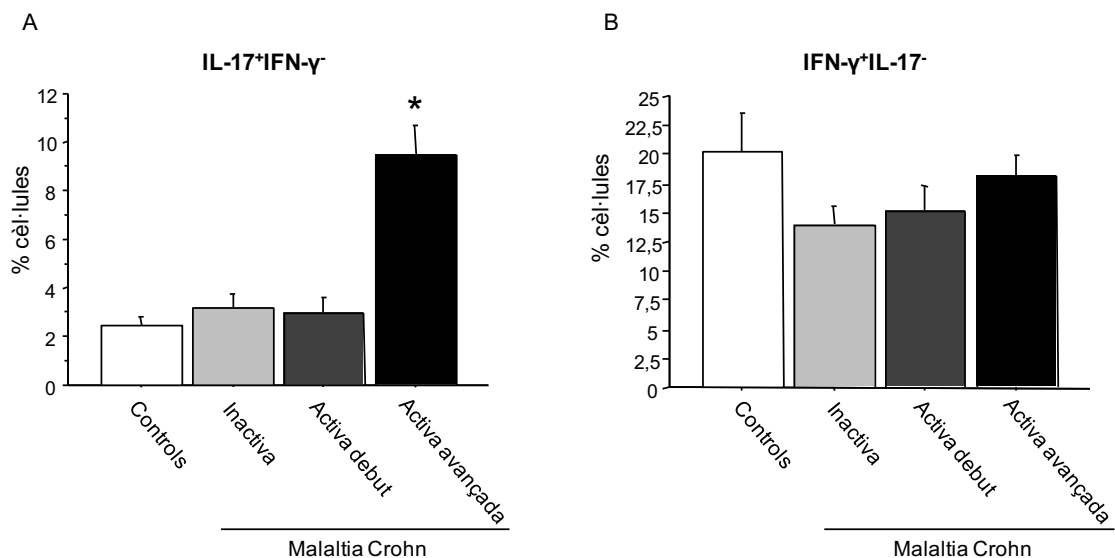
Aquesta heterogeneïtat que mostren els limfòcits Th17 produint diferents citocines és comú a tots els grups estudiats, i no trobem diferències entre controls i pacients amb malaltia de Crohn. Ara bé, en concordança amb el major percentatge de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> descrit en els individus amb malaltia avançada i activa, també aquestes cèl·lules dobles productores IL-17IL-22, IL-17IFN-γ i IL-17TNF-α són més abundants en aquest grup de malalts (Figura 32).



**Figura 32.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> dobles productores de IL-17IL-22, IL-17IFN- $\gamma$  i IL-17TNF- $\alpha$ . Els p-valors significatius es mostren en cada cas. Controls n= 8; malaltia inactiva n= 7; activa debut n= 8; activa avançada n=10.

Degut a l'alt percentatge de cèl·lules dobles productores de IFN- $\gamma$  i IL-17, vam investigar quin pes tenien aquestes cèl·lules en els percentatges de cada una d'aquestes citocines per separat. Així, vam reanalitzar els percentatges de cèl·lules positives per IFN- $\gamma$  i per IL-17 però excloent aquelles cèl·lules positives simultàniament per les dues citocines (Figura 33). D'aquesta manera vam observar que el major percentatge de cèl·lules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presents en els malalts actius avançats era degut a les dobles productores de IFN- $\gamma$  i IL-17 (Figura 27).

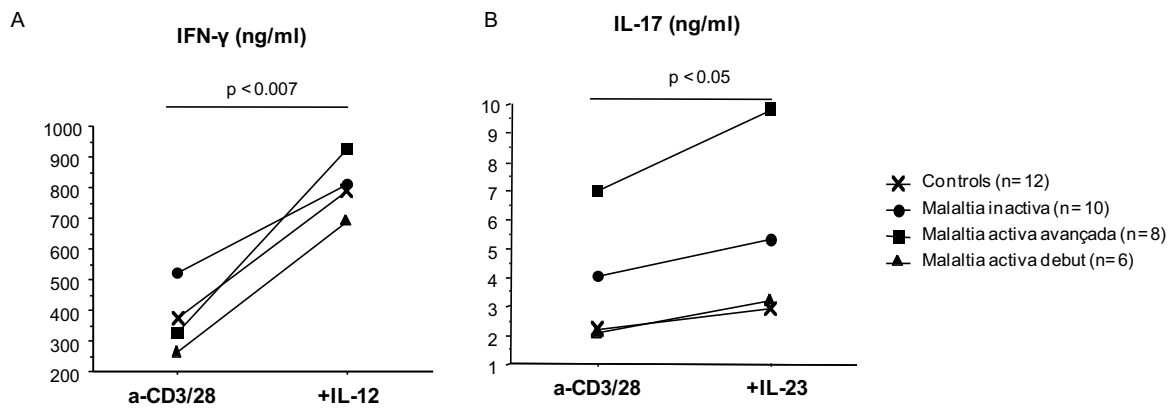




**Figura 33.** Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> productores (A) només de IL-17 i (B) només de IFN- $\gamma$ . En ambdós gràfics s'han exclòs les cèl·lules dobles productores de IL-17 i IFN- $\gamma$ . \* p-valor < 0.0001 respecte dels controls, malalts inactius i malalts actius debut. Controls n= 9; malaltia inactiva n= 8; activa debut n= 9; activa avançada n=12.

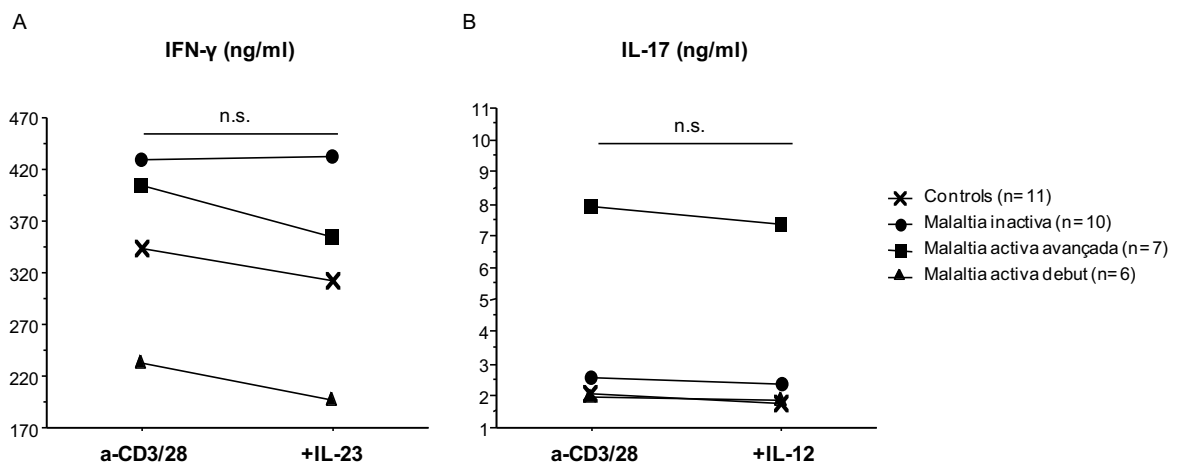
### Les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de controls i pacients responen de forma comparable als estímuls amb IL-12 i IL-23

La citocina IL-12 dirigeix la diferenciació dels limfòcits Th1 amb la conseqüent producció d'IFN- $\gamma$ . D'altra banda, la IL-23 sola no pot induir la diferenciació dels limfòcits Th17 però sí és necessària per al manteniment i expansió d'aquesta població. Per comprovar si la resposta a aquestes citocines estava alterada en els pacients amb malaltia de Crohn vàrem cultivar els limfòcits CD4<sup>+</sup> aïllats i activats amb a-CD3/a-CD28 amb IL-12 o IL-23. Com era d'esperar la IL-12 indueix una gran producció d'IFN- $\gamma$  en els limfòcits CD4<sup>+</sup>. L'augment de la producció de IL-17 en resposta a l'estimulació amb IL-23 va ser més discreta, tot i ser significatiu en tots els grups respecte a l'activació policlonal sola (Figura 34).



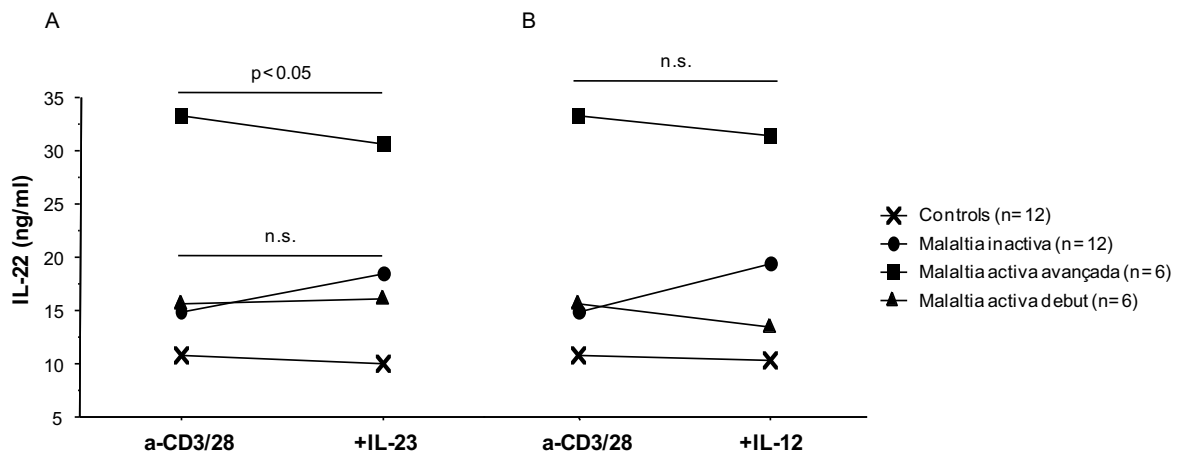
**Figura 34.** Producció de IFN- $\gamma$  (A) i IL-17 (B) per part dels limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies i estimulats amb anti-CD3/CD28 sols o amb l'addició de IL-12 (A) o IL-23 (B). En tots els grups l'addició de la IL-12 o de la IL-23 augmenta la producció de IFN- $\gamma$  i de IL-17 respectivament. Test aparellat,  $p < 0.05$  per a cada un dels grups.

S'ha descrit un efecte de la IL-23 sobre l'augment de la producció d'IFN- $\gamma$  així com també un efecte d'inhibició de la IL-12 sobre la producció de IL-17<sup>137</sup>, per això també vam analitzar aquesta possible influència en les cèl·lules dels nostres pacients. En ambdós casos les citocines inductores dels llinatges Th17 i Th1 no tenen cap efecte sobre la producció de IFN- $\gamma$  i IL-17 respectivament (Figura 35).



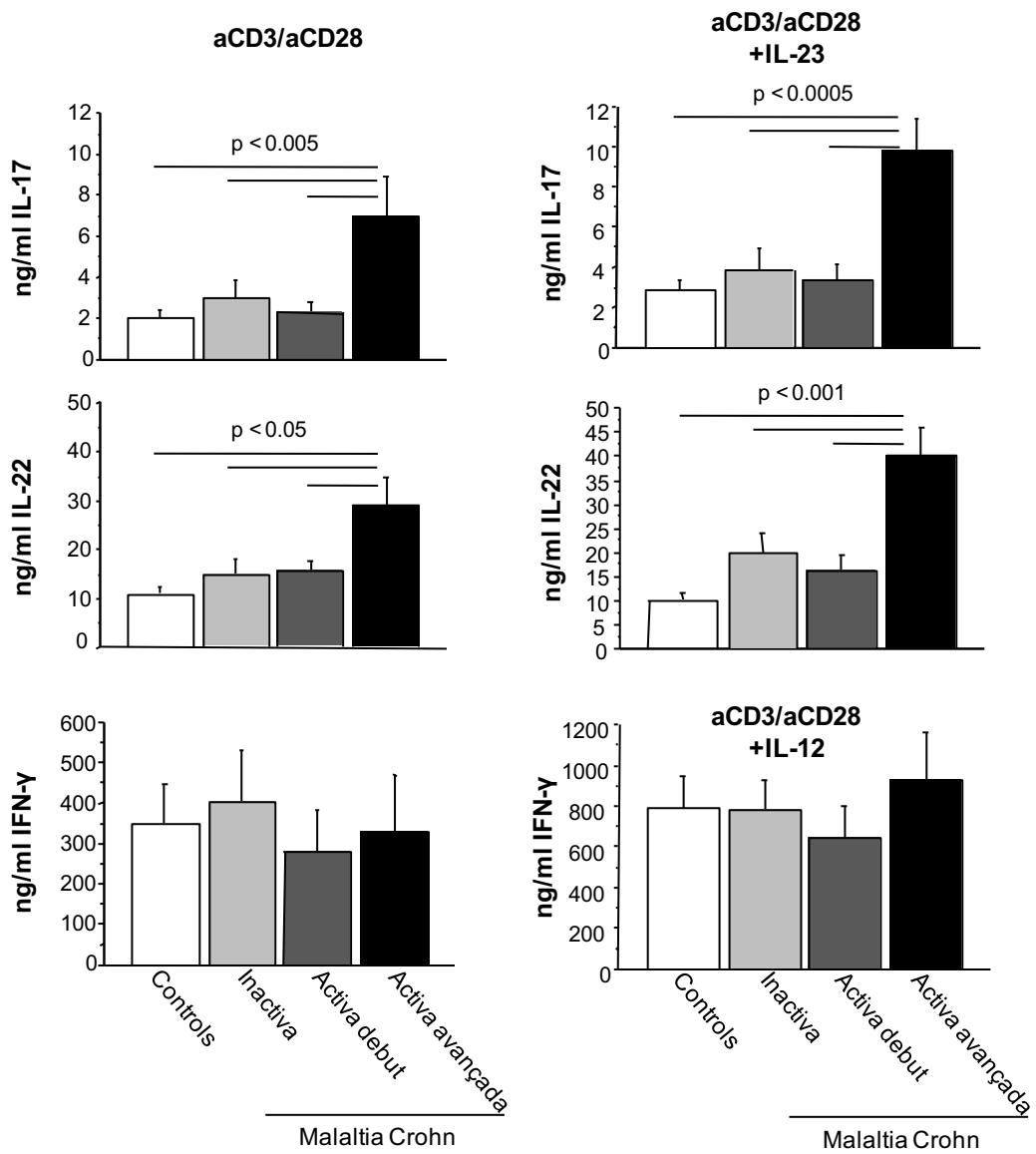
**Figura 35.** Producció de IFN- $\gamma$  (A) i IL-17 (B) per part dels limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies i estimulats amb anti-CD3/CD28 sols o amb l'addició de IL-23 (A) o IL-12 (B). En tots els grups l'addició de la IL-12 o de la IL-23 no induïx un canvi en la producció de IL-17 o de IFN- $\gamma$  respectivament. Test aparellat, n.s.= no significatiu.

Donat que la IL-23 té un efecte sobre la producció de IL-17 però no sobre la de IFN- $\gamma$ , vam mesurar també si tenia algun efecte sobre la producció d'una altra citocina produïda per la població Th17, la IL-22. En aquest cas només observem un efecte disminuint la producció de IL-22 en els malalts actius avançats, mentre que la resta de grups no presenten cap canvi de producció en resposta a l'estimulació amb IL-23 (Figura 36A). D'altra banda, la IL-12 no té cap efecte sobre la producció de IL-22, com ja havíem observat amb la IL-17 (Figura 36B).



**Figura 36.** Producció de IL-22 per part dels limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies i estimulats amb anti-CD3/CD28 sols o amb l'addició de IL-23 (A) o IL-12 (B). Test aparellat; s'indica amb el p-valor l'única diferència significativa observada, l'efecte de la IL-23 només sobre el grup de malalts actius avançats. n.s.= no significatiu.

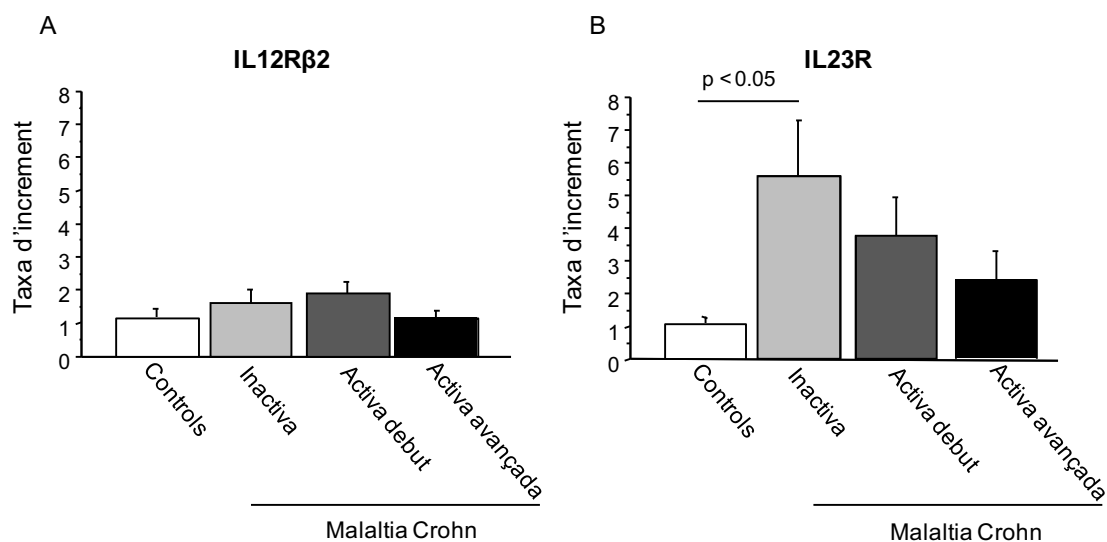
Així doncs, la producció de IFN- $\gamma$  en resposta a l'estimulació amb IL-12 va ser totalment comparable entre tots els grups d'estudi. En canvi, les diferències observades entre la gran producció de citocines Th17, tant IL-17 com IL-22, per part dels malalts actius avançats i la menor producció per part de la resta de grups es pronuncien més sota l'estimulació amb IL-23 (Figura 37).



**Figura 37.** Producció de IL-17, IL-22 i IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies i estimulats amb anti-CD3/CD28 sols o amb l'addició de IL-23 o IL-12. Els p-valors significatius es mostren en cada cas. Controls n= 12; malaltia inactiva n= 11; activa debut n= 7; activa avançada n=9.

## Expressió dels receptors IL23R i IL12Rβ2 en les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica

Una gran part de les cèl·lules CD4<sup>+</sup>IL23R<sup>+</sup> s'han identificat com a limfòcits Th17<sup>9</sup>, així doncs ambdós paràmetres poden ser correlacionats. Donada la major freqüència de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> en els limfòcits CD4<sup>+</sup> dels pacients amb malaltia de Crohn activa i avançada volíem comprovar que aquesta població podia ser caracteritzada com IL23R<sup>+</sup>. Per això vam mesurar els trànscrips de ARN missatger de IL23R (subunitat específica del receptor de la IL-23) i de IL12Rβ2 (subunitat específica del receptor de la IL-12) per PCR a temps real en els limfòcits CD4<sup>+</sup> aïllats de sang perifèrica i cultivats durant 6 dies. No vam detectar diferències entre els grups en els nivells d'expressió de IL12Rβ2 (Figura 38A). En canvi sí vam observar una tendència a una major expressió de IL23R en els diferents grups de pacients amb malaltia de Crohn tot i que només els pacients amb malaltia inactiva presenten un augment significatiu respecte als controls (Figura 38 B).

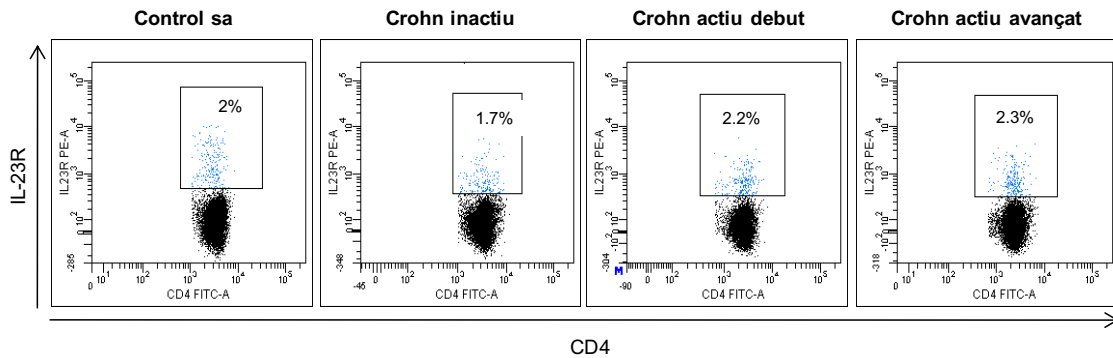


**Figura 38.** Taxa d'increment dels trànscrips d'ARN missatger de IL12Rβ2 (A) i IL23R (B) en limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats durant 6 dies. La taxa d'increment s'ha calculat respecte a l'expressió mitjana del grup control. Controls n= 5; malaltia inactiva n= 6; malaltia debut n= 4; malaltia avançada n= 6.

## Detecció del receptor IL23R a la membrana cel·lular

Per tal de veure si aquesta diferència observada a nivell d'ARN la trobàvem també a nivell de proteïna i poder caracteritzar la subpoblació Th17 com a IL23R<sup>+</sup> vam utilitzar un anticòs fluorescent contra el receptor de la IL-23 i ho vam mesurar per citometria de

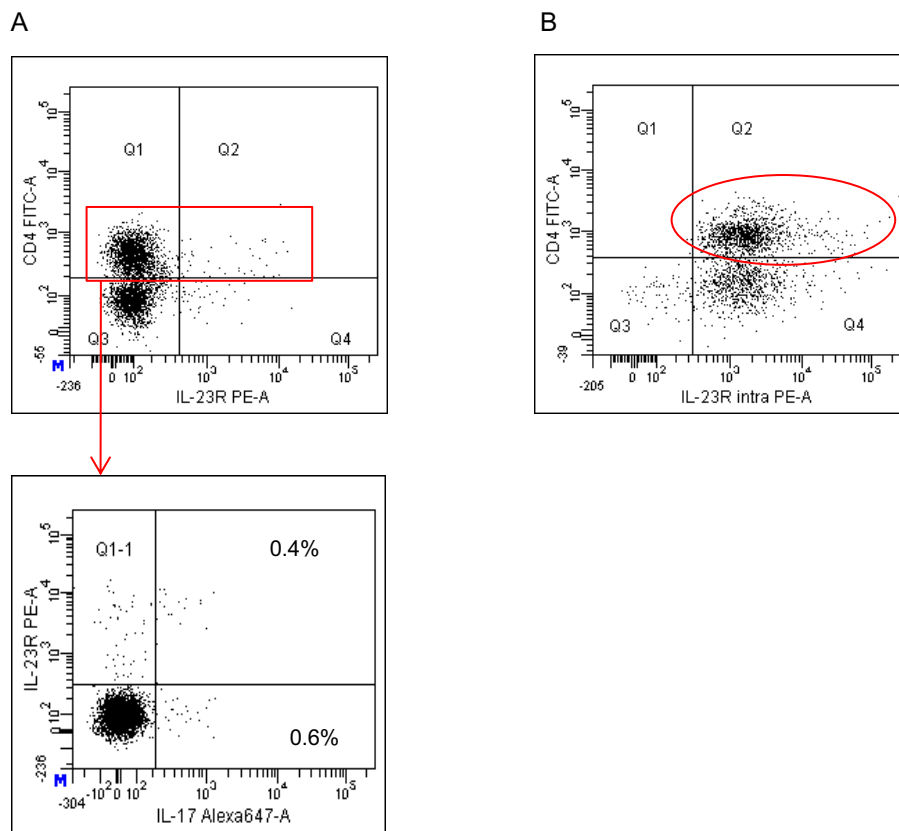
fluxe. Marcant els limfòcits CD4<sup>+</sup> circulants trobem que entre 0,5-2,5% expressen IL-23R (Figura 39), percentatges que s'assemblen molt als percentatges descrits anteriorment (Figura 27) de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> presents en sang perifèrica.



**Figura 39.** Dot plots representatius de cada un dels diferents grups d'estudi que mostren el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup> circulants positives per IL-23R.

L'objectiu primordial però era detectar simultàniament la producció de IL-17 i l'expressió del IL-23R. Així, quan vam intentar fer el marcatge després del cultiu i conjuntament amb el de les citocines intracel·lulars ens vam trobar un seguit de problemes. Si marcàvem el receptor abans de fixar i permeabilitzar la cèl·lula detectàvem una expressió molt baixa del receptor. Si el marcàvem un cop havíem fixat i permeabilitzat teníem >70% de cèl·lules positives, la qual cosa ens suggeria un marcatge inespecífic. Davant aquesta situació vam pensar que potser durant el cultiu els limfòcits internalitzaven el receptor de la IL-23R i per tant no en podíem treure la informació que volíem.

Així doncs, tot i el baix percentatge de limfòcits Th17, vam provar de caracteritzar aquest receptor en les cèl·lules mononuclears fresques aïllades per gradient de Ficoll. I altre cop ens vam trobar amb el mateix problema, fent el marcatge de forma extracel·lular el percentatge de cèl·lules positives era molt baix i no concordava totalment amb la producció de IL-17 (Figura 40 A). Si marcàvem el receptor de forma intracel·lular totes les cèl·lules CD4<sup>+</sup> eren també IL-23R<sup>+</sup> (Figura 40 B).

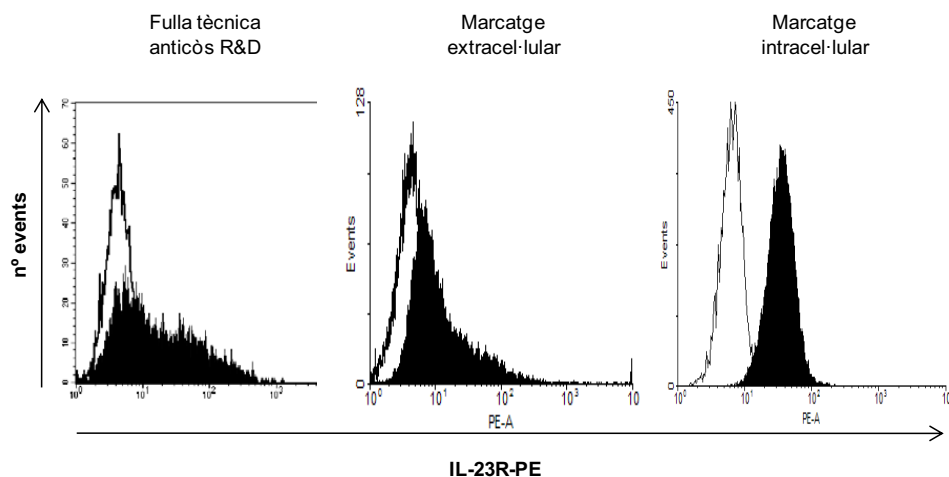


**Figura 40.** Dot plots representatius que mostren el marcatge de IL-23R en les cèl·lules CD4<sup>+</sup>. (A) Marcatge del receptor abans de fixar i permeabilitzar les cèl·lules i, (B) marcatge del receptor un cop les cèl·lules han sigut permeabilitzades.

Aquest fenomen d'inespecificitat de l'anticòs un cop havíem permeabilitzat la cèl·lula ho vam confirmar utilitzant la línia cel·lular amb la que la casa comercial de l'anticòs mostrava com a vàlid el marcatge. Així, vam reproduir el marcatge amb la línia cel·lular K562 quan aquest era de forma extracel·lular, però quan permeabilitzàvem la cèl·lula també en aquest cas totes passaven a ser positives (Figura 41). Vàrem veure, a més, que la incubació amb els factors d'activació amb que estimulàvem els limfòcits per poder analitzar la producció de citocines no afectaven aquestes cèl·lules en quant a l'expressió del receptor de la IL-23 en membrana.

Finalment vàrem abandonar aquests experiments conclouent que el protocol de fixació i permeabilització de la cèl·lula necessari per a la detecció de la IL-17 no ens permetia fer un co-marcatge de IL-23R amb els anticòssos disponibles comercialment. Altres estudis han reportat també dificultats en el marcatge del IL-23R. En estudis amb humans només un article mostra el plot del marcatge de IL-23R i no és simultani amb el marcatge

intracel·lular de IL-17<sup>9</sup>. En ratolí s'ha generat un ratolí GFP-IL23R per tal de poder identificar aquestes cèl·lules<sup>138</sup>.



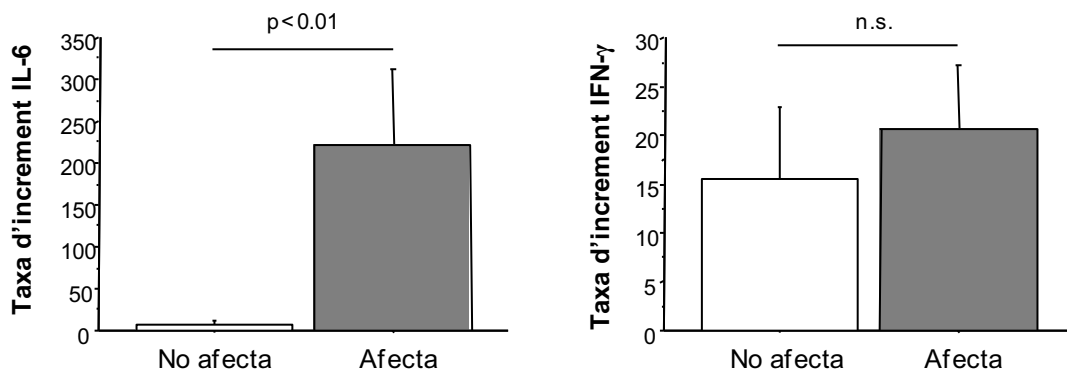
**Figura 41.** Histogrames que mostren el marcatge de IL-23R en la línia cel·lular K562. L'histograma de l'esquerra és el que la casa R&D presenta com a exemple de marcatge de l'anticòs. El central és el que vam obtenir marcant les cèl·lules directament, i l'histograma de la dreta és l'obtingut quan les cèl·lules eren sotmeses al protocol de fixació i permeabilització.

### Major expressió de les citocines Th17 en la mucosa intestinal inflamada

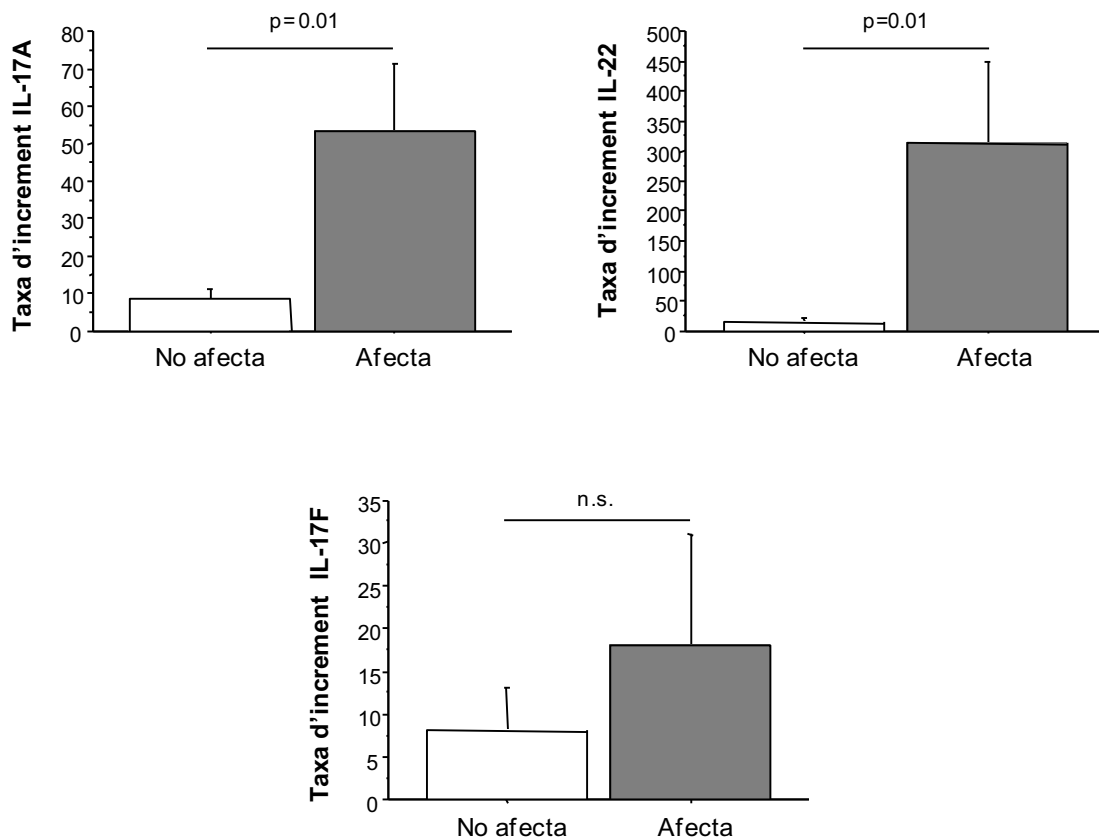
Després d'estudiar les cèl·lules Th17 circulants en sang perifèrica, vam estudiar aquesta població al lloc d'inflamació. A partir de biòpsies recollides de les zones amb i sense lesions inflamatòries de pacients amb malaltia de Crohn, vam calcular la taxa d'increment del ARN d'algunes citocines relacionades amb les diferents poblacions de limfòcits T col·laboradors de les zones no inflamades i inflamades respecte a l'expressió mitja en biòpsies control. Totes les citocines estudiades presentaven una taxa d'increment significativament més elevada en les zones inflamades de les biòpsies dels pacients amb malaltia de Crohn respecte a les biòpsies de controls sans.

El transcrit de la IL-6, com a citocina indicadora d'inflamació, la trobem > 200 vegades augmentada a la zona inflamada respecte la no inflamada. Pel que fa a IFN- $\gamma$  no hem trobat diferències significatives entre aquestes dues zones (Figura 42), mentre que sí les hem trobades per dues de les citocines característiques de la població Th17. El ARN missatger dels gens de la IL-17 i la IL-22 està 45 vegades i 300 vegades, respectivament, més alt a la zona inflamada respecte la no inflamada. En canvi, una altra citocina típica de la població Th17, la IL-17F no presenta diferències d'expressió entre la zona sana i afecta (Figura 43).





**Figura 42.** Taxa d'increment dels transcrits d'ARN missatger de IL-6 i IFN- $\gamma$  presents en biòpsies de làmina pròpia intestinal extretes de zones sanes i afectes de pacients amb malaltia de Crohn. La taxa d'increment s'ha calculat respecte a l'expressió mitja de 5 biòpsies control. Zona no afecta n= 11; zona afecta n= 12. El p-valor significatiu o l'absència de diferència (n.s) es mostra en cada cas.

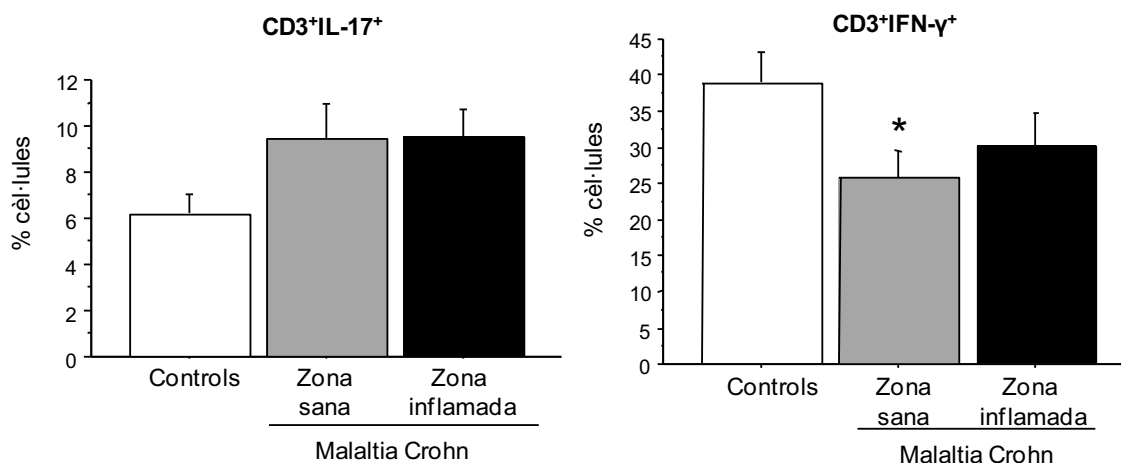


**Figura 43.** Taxa d'increment dels transcrits d'ARN missatger de diverses citocines Th17 presents en biòpsies de làmina pròpia intestinal extretes de zones sanes i afectes de pacients amb malaltia de Crohn. La

taxa d'increment s'ha calculat respecte a l'expressió mitja de 5 biòpsies control. Zona no afecta n= 10; zona afecta n= 12. El p-valor significatiu o l'absència de diferència (n.s) es mostra en cada cas.

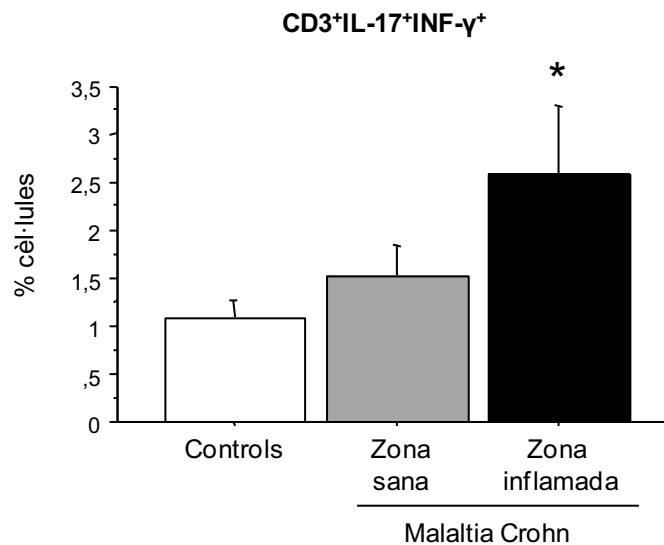
### Producció de IL-17 i IFN- $\gamma$ a la mucosa intestinal

A diferència del baix percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> que observem en perifèria, a la mucosa intestinal trobem una major proporció d'aquestes cèl·lules en concordança amb estudis previs<sup>46,126</sup>. El percentatge de cèl·lules Th17 a la mucosa intestinal, però, és igual en tots els nostres grups d'estudi independentment de la presència o absència d'inflamació (mitja de tots els grups junts 8,4%±0,7 cèl·lules IL-17<sup>+</sup>, n= 57). Pel que fa al percentatge de cèl·lules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> trobem un percentatge molt alt ja en la mucosa intestinal dels individus control (38,9%±4,3; n= 12) mentre que les zones sanes dels malalts de Crohn tenen un percentatge significativament menor (25,7%±3,8; n= 13). El percentatge de cèl·lules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presents en la mucosa inflamada dels pacients amb malaltia de Crohn (30,3%±4,3; n= 15) no és diferent respecte la resta de grups (Figura 44).



**Figura 44.** Percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> o IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presents a la mucosa intestinal. Les citocines foren detectades per marcatge intracel·lular després d'incubar les cèl·lules durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. \*p<0.05 respecte als controls.

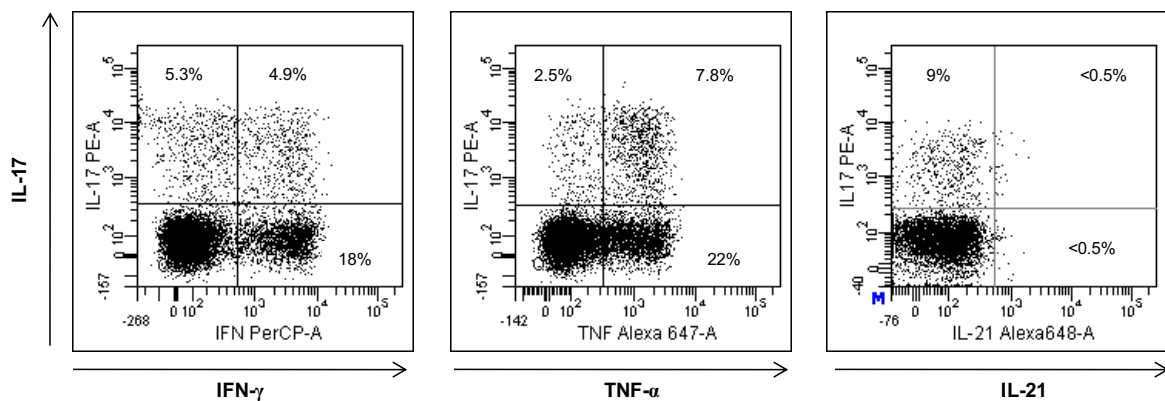
Igual que a perifèria, també a la mucosa intestinal es troba un nombre considerable de limfòcits dobles productors de IL-17 i IFN- $\gamma$ . Aquestes cèl·lules positives per ambdues citocines són més abundants a la mucosa inflamada dels malalts de Crohn (Figura 45).



**Figura 45.** Percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> presents a la mucosa intestinal. Les citocines foren detectades per marcatge intracel·lular després d'incubar les cèl·lules durant 4 h amb PMA, ionomicina i brefeldina A. \*p<0.05 respecte als controls. Controls n= 10; zona sana n= 10; zona inflamada n= 13.

#### **Les cèl·lules Th17 intestinals també produeixen IFN- $\gamma$ i TNF- $\alpha$ però no IL-21**

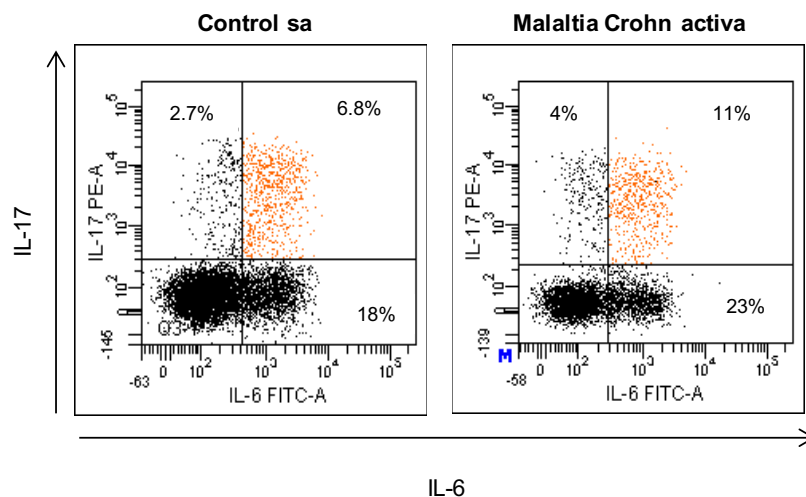
De manera similar al que havíem observat en les cèl·lules de sang, els limfòcits Th17 presents en la làmina pròpia intestinal expressen IFN- $\gamma$  juntament amb la IL-17 (Figura 45 i Figura 46). A més, entre les cèl·lules Th17 que infiltren el teixit trobem un percentatge elevat (72% $\pm$ 2,5) de cèl·lules dobles positives per IL-17 i TNF- $\alpha$ . De forma també similar al que havíem observat en sang perifèrica, els limfòcits Th17, tampoc en el teixit intestinal expressen IL-21 (Figura 46).



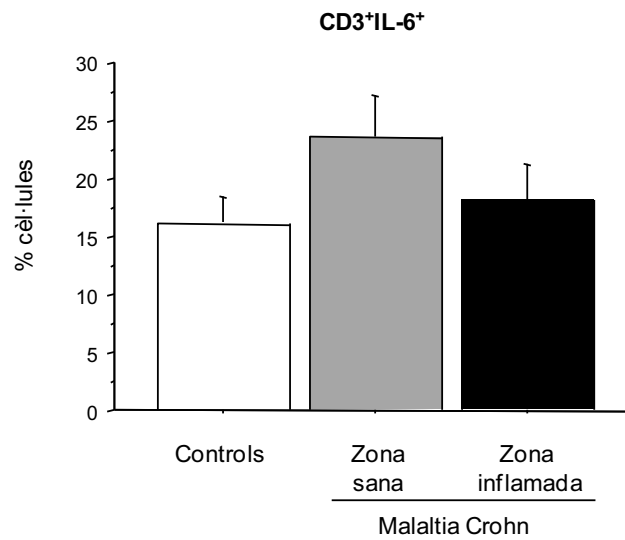
**Figura 46.** Dot plots representatius de les cèl·lules aïllades de làmina pròpia intestinal d'un malalt de Crohn amb activitat. Els plots mostren els percentatges de cèl·lules CD3<sup>+</sup> productores de IL-17IFN- $\gamma$ , IL-17TNF- $\alpha$  i IL-17IL-21.

### Les cèl·lules Th17 i Th1 de mucosa intestinal presenten co-producció de IL-6 com a característica diferencial

No es va detectar producció de IL-6 en els limfòcits de sang perifèrica després de l'estimulació (Figura 31). En canvi, sí que es va detectar producció d'aquesta citocina per part dels limfòcits presents a la làmina pròpia intestinal. La IL-6 és produïda tant per cèl·lules provinents de controls sans com per cèl·lules provinents de zones inflamades de pacients amb malaltia de Crohn (Figura 47), sense diferències significatives entre les diferents zones (Figura 48).

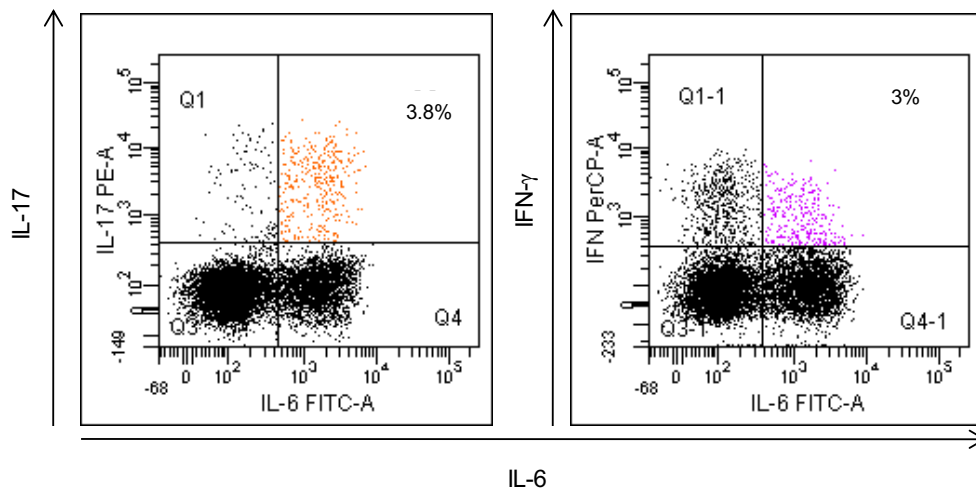


**Figura 47.** Dot plots representatius d'un control sa i un pacient amb malaltia de Crohn activa. Els plots mostren els percentatges de cèl·lules CD3<sup>+</sup> productores de IL-17 i IL-6.



**Figura 48.** Percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup> de la làmina pròpia intestinal productores de IL-6. No es van observar diferències en el percentatge total de IL-6 entre els diferents grups. Controls n= 9; zona sana n= 10; zona inflamada n=10.

La producció de IL-6 per part dels limfòcits de la mucosa intestinal no és exclusiva d'una sola població limfocitària sinó que vam observar que tant les cèl·lules Th17 com les Th1 la co-expressen juntament amb la IL-17 o l'IFN- $\gamma$  respectivament.



**Figura 49.** Dot plots representatius de biòpsies no afectes d'un pacient amb malaltia de Crohn. Els plots mostren els percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup> dobles productores de IL-6/IL-17 i IL-6/IFN- $\gamma$ .

### **La malaltia de Crohn debut ja presenta una resposta Th17 i Th1 elevada al lloc d'inflamació**

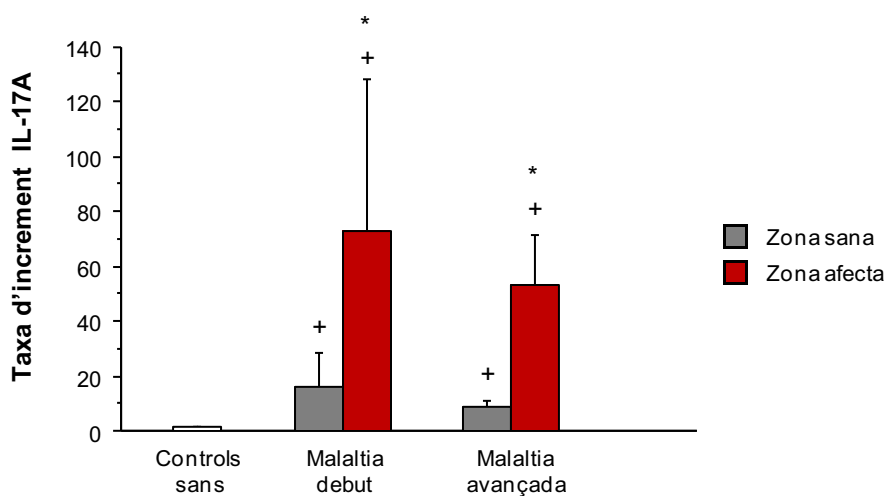
Després de les diferències observades en les cèl·lules Th17 de sang perifèrica dels pacients debut i avançats per la malaltia, vam estudiar si les cèl·lules de la mucosa intestinal es comportaven de la mateixa manera en aquests grups de malalts. Degut a la dificultat de diagnòstic d'aquests pacients debut per la malaltia de Crohn ha sigut impossible comptar amb biòpsies fresques d'aquests malalts ja que en moltes ocasions la classificació dels pacients ha estat *a posteriori* de l'avaluació clínica i endoscòpica i, per tant, de la recollida de mostres.

D'aquest grup de pacients doncs, no hem disposat de cèl·lules fresques aïllades de làmina pròpia per poder quantificar els percentatges de limfòcits Th1 i Th17. L'estratègia per identificar aquestes poblacions a la làmina pròpia ha hagut de ser una altra:

- 1) Determinació dels nivells d'ARN missatger en les zones afectes respecte les no afectes. Amb aquesta tècnica i amb 6 pacients debut hem pogut establir una diferència significativa dels transcrits de les citocines IL-17 (A i F), IL-22, IFN- $\gamma$  i IL-6 entre aquestes dues zones ja en els estadis inicials de la malaltia (Taula 9). En la Figura 50 mostrem en un gràfic conjunt la comparació entre els pacients debut i avançats per als transcrits de IL-17A a manera d'exemple, ja que el comportament dels transcrits de les citocines IL-22 i IL-6 és molt similar.

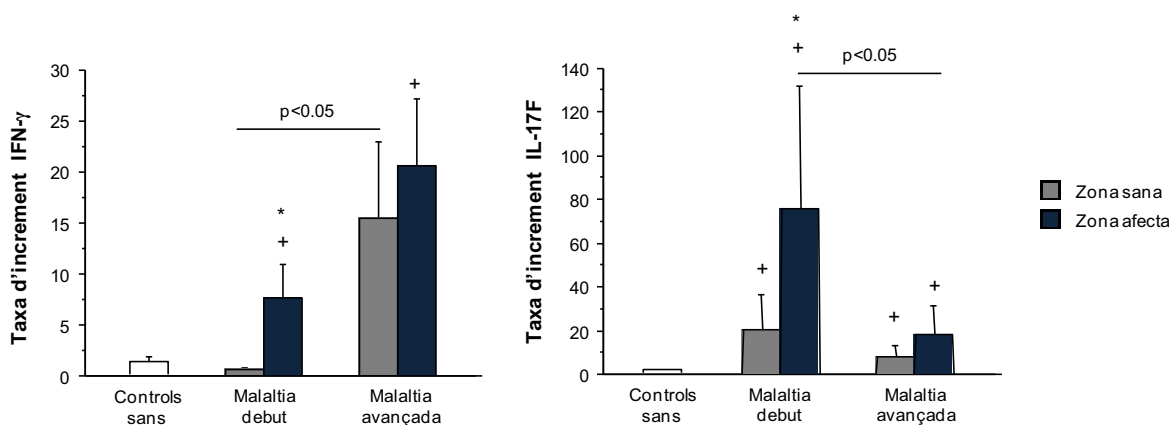
	<b>Zona sana</b>	<b>Zona afecta</b>
<b>IL-17A</b>	16,3±11,8	72,8±55,8*
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,66±0,2	7,6±3,3*
<b>IL-17F</b>	20,7±16	75,9±56*
<b>IL-22</b>	12,6±8	86,2±41,9*
<b>IL-6</b>	1,3±0,6	19,4±8,2*

**Taula 9.** Taxa d'increment respecte a la mitja de biòpsies control. Les dades són la mitja±error estàndard, n=6. \*p<0.05 respecte zona sana.



**Figura 50.** Taxa d'increment dels transcrits de IL-17A en les biòpsies de mucosa intestinal de controls sans i les zones sanes i afectes de pacients amb malaltia debut i avançada. Ja els pacients debut presenten nivells més elevats del ARN missatger de IL-17A en les zones afectes. La taxa d'increment en els pacients debut és similar a la dels malalts avançats, tant si comparem les zones sanes com les afectes. + p-valor < 0.05 respecte a la taxa d'increment de les biòpsies de controls sans. \* p-valor < 0.05 entre les zones afectes i sanes d'un mateix grup de pacients.

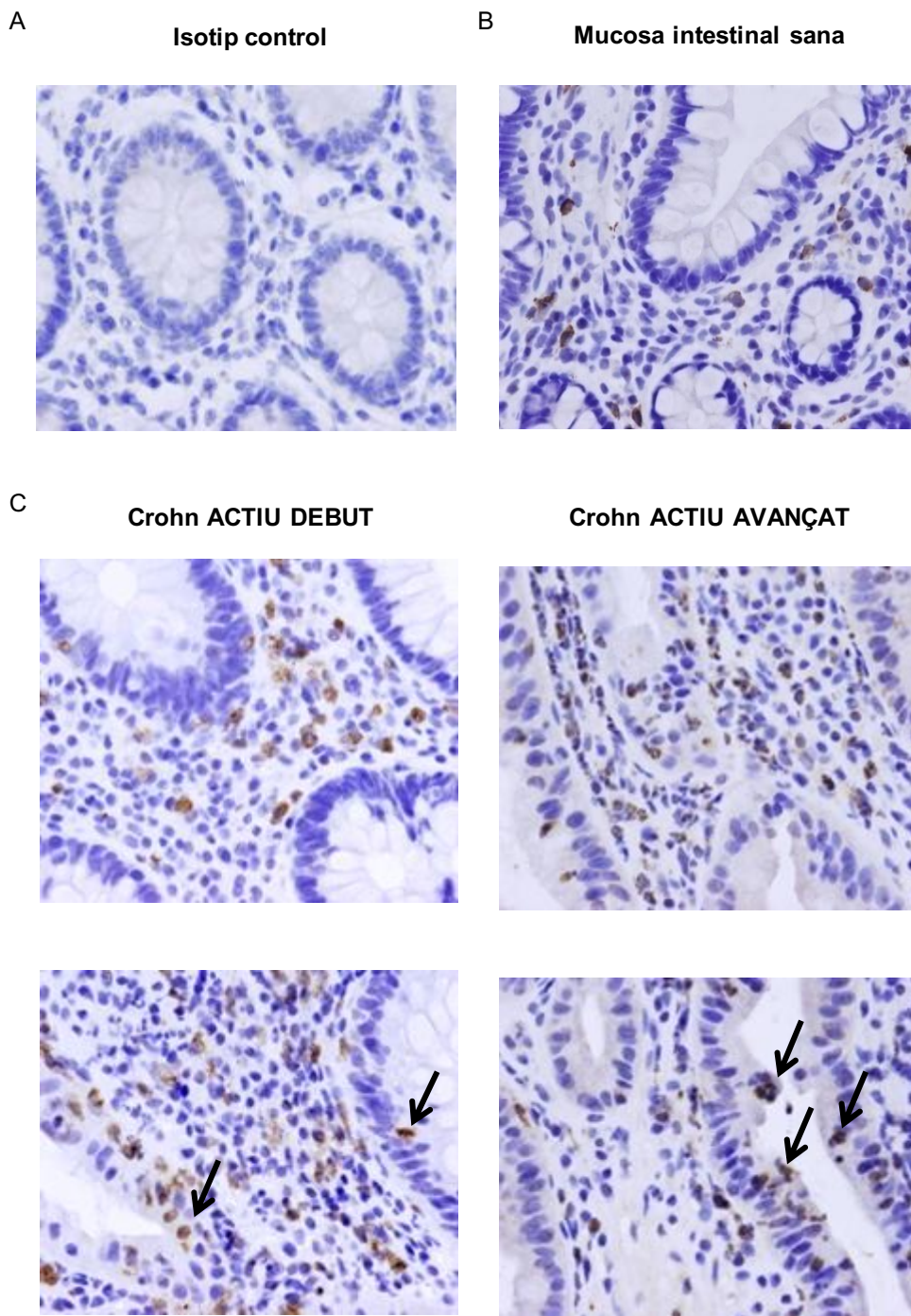
En canvi els transcrits de les citocines IFN- $\gamma$  i IL-17F mostren un perfil diferent en les biòpsies de la malaltia debut i la malaltia avançada. Els transcrits de IFN- $\gamma$  són significativament més elevats en les zones inflamades dels pacients que debuten per la malaltia mentre que a la malaltia avançada aquests transcrits augmenten a les zones no afectes i passem a no tenir diferència entre la zona no afecta i afecta. El comportament dels transcrits de la IL-17F és diferent, en aquest cas també observem un augment significatiu en les zones inflamades dels pacients que pateixen el primer brot de la malaltia però en la malaltia avançada l'expressió de IL-17F ja no és tan elevada i és similar a l'expressió de la zona no afecta (Figura 51). És important remarcar també que de totes les citocines mesurades només la IL-17A i F presenten un increment dels transcrits en les zones no afectes respecte a les biòpsies de controls sans (Figura 50 Figura 51).



**Figura 51.** Taxa d'increment dels transcrits d'IFN- $\gamma$  i IL-17F en les biòpsies de mucosa intestinal de controls sans i les zones sanes i afectes de pacients amb malaltia debut i avançada. + p-valor < 0.05 respecte a la taxa d'increment de les biòpsies de controls sans. \* p-valor < 0.05 entre les zones afectes i sanes d'un mateix grup de pacients. També s'indiquen les diferències significatives entre les zones sanes dels dos grups de malalts per als transcrits d'IFN- $\gamma$  i entre les zones afectes per als transcrits de IL-17F.

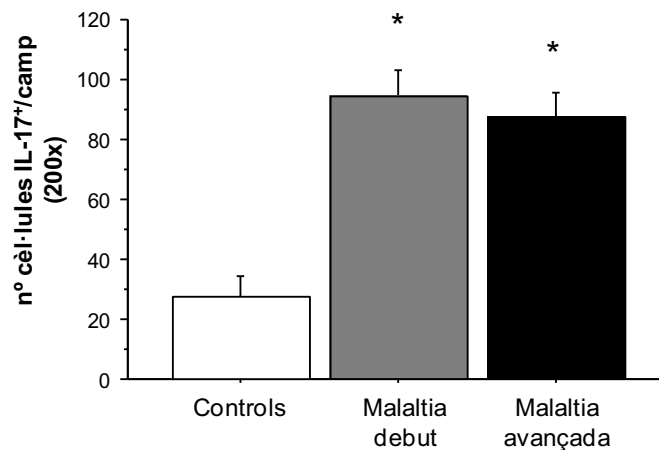
- 2) Tinció per immunohistoquímica de IL-17. Per realitzar aquesta tècnica vam poder disposar de biòpsies d'íleum i còlon parafinades que es recullen rutinàriament al servei d'Anatomia Patològica de l'hospital. Com ja havíem observat amb el marcatge intracel·lular en fresc, la mucosa intestinal sana presenta també cèl·lules Th17 ( $27,6 \pm 7$  cèl·lules/camp, 200x, n= 5, 2 camps/ pacient) (Figura 52B). Ara bé, la mucosa intestinal afectada amb infiltrat de cèl·lules inflamatòries presenta un major nombre de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> tant en els pacients amb malaltia debut ( $94,2 \pm 8,8$  cèl·lules/camp, 200x, n= 7, 2 camps/ pacient, p<0,0001) com en els que pateixen malaltia avançada ( $87,3 \pm 8,4$  cèl·lules/camp, 200x, n= 13, 2 camps/ pacient, p<0,0001) (Figura 52C i Figura 53). Amb aquest marcatge posem de manifest que tot i que els percentatges de limfòcits CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> es mantenen sense diferències entre els grups d'estudi (Figura 44), el nombre total de cèl·lules Th17 a la mucosa intestinal és més elevat quan hi ha inflamació probablement degut a una major infiltració al teixit intestinal de cèl·lules inflamatòries i, per tant, de limfòcits CD3<sup>+</sup>.





**Figura 52.** Immunohistoquímica de IL-17. Fotografies (400x) representatives del marcatge control amb l'isotip corresponent (A) i de mucosa intestinal sana (B) on es veuen cèl·lules IL-17<sup>+</sup>. Al panell inferior (C) es mostren fotografies representatives de mucosa intestinal inflamada de pacients amb malaltia de Crohn debut i avançada. En aquests dos grups de pacients el marcatge

per IL-17 és més abundant que en la mucosa sana i molt similar entre ells. Amb fletxes s'indica la localització intraepitelial d'algunes cèl·lules IL-17<sup>+</sup>.

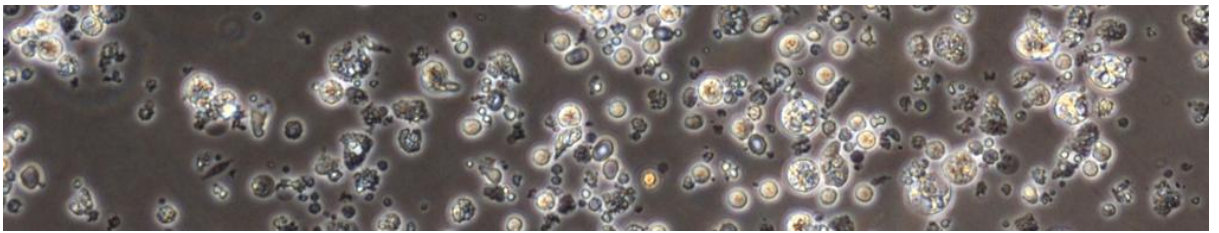


**Figura 53.** Nombre de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> comptabilitzades per tinció immunohistoquímica en biòpsies intestinals de controls sans i biòpsies afectes de pacients amb malaltia de Crohn debut i avançada. \*p-valor < 0,0001 respecte als controls.

La tinció de les cèl·lules IL-17<sup>+</sup> sembla seguir un patró distint en la mucosa sana que en l'afecta, les cèl·lules IL-17<sup>+</sup> en les biòpsies inflamades dels pacients presenten un marcatge més difús, en moltes ocasions no es veu el marcatge perfectament delimitat dins el citoplasma, a diferència del que observem en la mucosa sana. A més, les cèl·lules positives per la tinció presenten també una distribució diferent, com per exemple, en el compartiment intraepitelial (Figura 52C).



## Discussió





## DISCUSSIÓ

La malaltia de Crohn forma part de les malalties inflamatòries de base immunitària cròniques. Aquestes malalties afecten a adults joves, i també a nens, que en edats molt primerenques es veuen ja sotmesos a la consegüent reducció de la qualitat de vida que comporta la seva malaltia. Per la majoria de pacients, la malaltia de Crohn està associada amb la dependència vital a fàrmacs immunosupressors i a repetides cirurgies, la qual cosa resulta, a més dels evidents perjudicis per al pacient, en un cost a nivell social i econòmic.

Tot i l'augment en la incidència i prevalença de la malaltia de Crohn, i en els esforços i medis que s'estan destinant a la investigació dels mecanismes responsables de la seva patofisiologia, encara no disposem del coneixement de l'etiologia de la malaltia així com tampoc d'una cura definitiva. Així, la medicina moderna no ha estat capaç encara d'alterar la història natural de la malaltia de Crohn que es segueix manifestant com sempre, amb estadis de remissió i activitat que de forma crònica afecten molt negativament la vida dels pacients afectats.

Les teràpies disponibles per a la malaltia de Crohn són paliatives i es basen en l'ús de corticosteroides per induir la remissió i l'ús d'immunosupressors per prevenir les exacerbacions d'activitat inflamatòria. Aquestes teràpies però no són eficients en més del 70% de pacients que finalment necessitaran cirurgia (el 50% d'ells inclús repetides cirurgies) per tal de controlar la malaltia. Tot i l'augment de l'eficiència de les noves teràpies amb anticossos bloquejants anti-TNF, aquestes tampoc són capaces d'induir la remissió en el 40% dels pacients. A més, dels pacients que sí mostren una primera resposta a aquestes teràpies, la meitat la perden durant els 6 primers mesos de tractament. D'aquesta manera, si sumem les eficàcies de totes les teràpies actuals per a la malaltia de Crohn trobem que només aconseguen una millora significativa en una quarta part dels pacients amb malaltia de Crohn.

Cal doncs, apuntar la necessitat de seguir augmentant el coneixement dels mecanismes fisiopatològics subjacents a les diferents manifestacions de la malaltia de Crohn per tal no només de poder establir noves dianes farmacològiques sinó també d'identificar aquelles que són més importants en cada individu i en cada moment de la malaltia. La malaltia de Crohn es caracteritza per ser una malaltia multifactorial amb una gran heterogeneïtat de manifestacions clíniques, amb una diversitat de factors de risc genètics i ambientals així com per una variabilitat molt gran dels seus pacients a l'hora de respondre als diferents tractaments. Així, el coneixement dels diferents factors, entre ells els immunitaris, que poden estar involucrats en cada una d'aquestes manifestacions tan

diverses és fonamental per a la implementació del que ha de ser la medicina en un futur no gaire llunyà, un tractament personalitzat que s'ajusti a les necessitats concretes.

L'estudi del sistema immunitari acumula, poc a poc, aquest coneixement sense el qual la medicina contemporània no pot avançar cap a la millora de la qualitat de vida dels pacients amb malalties inflamatòries cròniques.

En situació d'inflamació intestinal, com ja s'ha descrit en la malaltia de Crohn, trobem una major infiltració de cèl·lules a la làmina pròpia de la mucosa. Aquestes cèl·lules migren atretes per l'ambient de quimiocines i citocines produïdes a nivell local donant lloc a una acumulació de cèl·lules del sistema immunitari innat, com neutròfils i monòcits, i de l'adquirit, limfòcits. En la fisiopatologia de la malaltia de Crohn juguen un paper important els limfòcits CD4<sup>+</sup> que mitjançant la producció de citocines medien el reclutament de noves cèl·lules al teixit inflammat, l'activació funcional de cèl·lules immunitàries ja infiltrades o de cèl·lules no immunitàries residents al teixit. Per tant, l'alteració en les citocines produïdes pels limfòcits T CD4<sup>+</sup> és clau en l'evolució i la cronificació de la malaltia. També a nivell sistèmic s'identifiquen canvis en les poblacions limfocitàries així com en la producció de citocines com a conseqüència de la inflamació local crònica i persistent.

En els estudis inclosos en aquesta tesi doctoral mostrem que els pacients amb malaltia de Crohn en fase activa presenten una major producció de IL-17 i IL-6 en sobredants de sang total com ja s'ha descrit prèviament en plasma<sup>123,132</sup> però no trobem diferències en la producció d'IFN- $\gamma$  entre individus sans i malalts es trobin en fase activa o inactiva (Figura 14).

Aquesta manca de diferència pot sopendre ja que la malaltia de Crohn es considera una malaltia inflamatòria de base immunitària mediada per la hiperactivació dels limfòcits Th1. La nostra dada sobre la mesura d'IFN- $\gamma$  en sobredants del cultiu de sang total concorda però amb estudis previs en que la producció de IL-12, citocina inductora de la producció d'IFN- $\gamma$ , mesurada en plasma o en el sobredant de PBMCs és igual entre pacients amb malaltia de Crohn i controls<sup>91,139</sup>.

A diferència de l'IFN- $\gamma$  que és produït per diversos tipus cel·lulars, només hem detectat producció de IL-17 per part de cèl·lules CD4<sup>+</sup>, que en els malalts de Crohn actius representen un percentatge més elevat respecte als controls sans. Si ens centrem en el percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> també detectem un augment significatiu en els malalts actius (Figura 18).

El cultiu d'aquests limfòcits CD4<sup>+</sup> productors de citocines Th1 i Th17 ens ha portat a confirmar el que hem observat *ex vivo* en plasma i PBMCs acabats d'aïllar, però també hem pogut fer noves observacions. Els limfòcits productors de IL-17 mostren una major capacitat de proliferació *in vitro* que els productors de IFN- $\gamma$  (Figura 19). Aquesta

diferència és encara més exagerada en els pacients amb malaltia de Crohn que presenten activitat. Així vam investigar la presència d'un possible mediador produït pels propis limfòcits, i en major quantitat pels dels pacients amb malaltia activa, que pogués actuar específicament sobre els limfòcits Th17 induint la seva expansió. Els experiments realitzats no apunten a l'existència de tal mediador i, per tant, només podem hipotetitzar que la major capacitat proliferativa observada en els limfòcits Th17 podria ser una característica intrínseca d'aquestes cèl·lules, que pot reflexar una diferència d'estat entre el llinatge Th1 i Th17 circulants, en tant que es reconeix una major capacitat proliferativa en les cèl·lules memòria que en les efectores<sup>140</sup>. Una altra hipòtesi possible seria que la major expansió observada per part dels limfòcits Th17 pot ser un efecte de la IL-2 present en el cultiu sobre aquesta població concreta. Tot i que s'ha descrit que la IL-2 té un lleu efecte inhibitor sobre la diferenciació dels limfòcits naïve cap a cèl·lules Th17, en cèl·lules ja diferenciades no s'observa aquest efecte<sup>8</sup>. De fet, en limfòcits CD4<sup>+</sup> memòria s'ha descrit que la IL-2 produeix una expansió de la població Th17 amb el conseqüent augment de la producció de IL-17<sup>141</sup>.

Després dels 6 dies de cultiu observem també que els limfòcits CD4<sup>+</sup> dels malalts actius presenten un major percentatge de cèl·lules productores de IL-17 així com de IL-22, una altra citocina característica del llinatge Th17, però també un percentatge major de cèl·lules IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> encara que en aquest cas només respecte als malalts inactius (Figura 20). Pel que fa a la producció d'aquestes citocines en canvi, la diferència entre els malalts actius i la resta de grups estudiats és molt pronunciada en el cas de les citocines Th17 mentre que la producció de IFN- $\gamma$  és molt similar en tots els grups (Figura 21). Estudis previs havien descrit limfòcits capaços de produir simultàniament IL-17 i IFN- $\gamma$ <sup>126,142</sup>. Els limfòcits CD4<sup>+</sup> de tots els nostres grups d'estudi també presenten aquesta capacitat de la doble producció de citocines Th17 i Th1 (Figura 30) però el percentatge de dobles productores IL-17IFN- $\gamma$  és més elevat en els malalts actius (Figura 32). Així doncs, el marcatge intracel·lular simultani ens va permetre poder estudiar per separat les cèl·lules només productores de IL-17, les cèl·lules només productores de IFN- $\gamma$  i les cèl·lules dobles productores de IL-17IFN- $\gamma$ . Amb aquest anàlisi hem pogut veure com les discrepàncies observades entre el percentatge i la producció d'IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits CD4<sup>+</sup> podien ser explicades per aquesta població doble productora que podem anomenar Th17/Th1. La diferència en el percentatge de cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  és deguda a l'alt percentatge de cèl·lules dobles productores presents en els pacients amb malaltia activa (Figura 33). Aquesta població de cèl·lules productores d'ambdues citocines podria explicar també el major percentatge observat en els malalts actius de limfòcits CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> mesurat *ex vivo*, abans de ser separats i cultivats (Figura 18). En aquest cas però, no vam realitzar un marcatge simultani de les dues citocines i per tant no podem assegurar que sigui així tot i que marcatges simultanis posteriors realitzats en



pacients amb malaltia de Crohn activa no inclosos en aquest estudi mostren la presència en sang perifèrica de limfòcits CD4<sup>+</sup> dobles productors de IL-17 i IFN- $\gamma$ .

Les observacions realitzades demostren que és preferentment la resposta efectora dels limfòcits Th17, i no la dels Th1, la que es mostra exacerbada en sang perifèrica dels malalts de Crohn en fase activa. Més important però és l'observació que aquesta resposta exacerbada en sang perifèrica de les cèl·lules Th17 és un signe exclusiu de la malaltia activa avançada que no detectem en els pacients debut de la malaltia, que es comporten com els pacients en fase inactiva i els controls sans. Aquest grup de malalts debut, tot i presentar un grau d'activitat similar als dels malalts avançats (Figura 23, Figura 24 i Figura 25), presenten una baixa producció de IL-17 en plasma (Figura 26) que es correlaciona amb el baix nombre de cèl·lules productores de IL-17 en mononuclears aïllats de sang perifèrica (Figura 27), en els limfòcits CD4<sup>+</sup> cultivats (Figura 28) i amb la menor producció de les citocines Th17 per part d'aquestes cèl·lules (Figura 29).

En la majoria de treballs en que s'ha investigat la resposta del sistema immunitari en la malaltia de Crohn s'han inclòs els malalts de forma independent de l'estadi de la malaltia en que es troben. Una primera aproximació a la idea que el sistema immunitari pot actuar de forma diferent durant l'evolució de la malaltia queda reflexada en dos treballs del laboratori del Dr. Colombel on investiguen quins són els mecanismes que actuen en la recurrència post-quirúrgica de la malaltia. Descriuen doncs algunes diferències a nivell d'expressió de citocines i infiltració cel·lular entre lesions primerenques aparegudes en els 3 mesos següents després de sotmetre's a resecció intestinal i lesions cròniques de l'intestí reseccionat. En concret, descriuen un augment de la IL-4<sup>143</sup>, la IL-5 i de la infiltració d'eosinòfils<sup>144</sup> en les lesions primerenques, mentres que l'IFN- $\gamma$  es troba disminuït en aquest estadi de la lesió en comparació amb les lesions cròniques. Tot i que en aquests casos l'objecte d'estudi són malalts que ja porten anys d'evolució aquests estudis aporten una primera evidència que la resposta immunitària canvia durant l'evolució de la malaltia de Crohn.

Altres estudis portats a terme en malalts pediàtrics han investigat la resposta del sistema immunitari en aquells malalts que presenten el primer brot de la malaltia. Només un d'ells<sup>145</sup> compara la resposta immunitària dels malalts que presenten el seu primer brot d'activitat amb malalts que porten anys d'evolució. En aquest article es descriu una major sensibilitat dels clons aïllats de la mucosa intestinal dels malalts debut a l'estimulació amb IL-12 (mesuren producció de IFN i IL-10), tot i que de forma basal no troben diferències entre aquests malalts i els que porten anys d'evolució en la producció d'IFN- $\gamma$ . El teixit intestinal afecte dels malalts debut presenta una major expressió de IL-12/IL-23p40 i de IL-12R $\beta$ 2 respecte al dels malalts avançats.

Altres estudis pediàtrics<sup>146,147</sup> en que només comparen els malalts debut amb individus control i analitzen la freqüència de limfòcits Th1 i Th2 en sang perifèrica, troben un

menor percentatge de cèl·lules productores de IFN- $\gamma$  en els malalts debut de Crohn. En un dels articles<sup>146</sup> s'assenyala la importància de tenir en compte que la població Th1 augmenta amb l'edat tant en individus sans com malalts i que això podria ser una de les causes de les diferències observades entre els malalts pediàtrics i els adults.

A nivell clínic s'ha proposat recentment una definició de la malaltia de Crohn debut o primerenca necessària per a una intervenció terapèutica capaç de modificar el curs clínic de la malaltia<sup>148</sup>. En altres malalties inflamatòries de base immunitària com l'artritis reumatoide ja es treballa amb aquesta distinció entre estadis inicials i avançats de la malaltia. La malaltia de Crohn inicial o debut és definida com: aquells malalts adults o pediàtrics amb menys de 2 anys d'evolució, amb activitat de la malaltia, sense disfuncions gastrointestinals ni danys severos com fistules, abscessos o estenosi. A més aquests malalts no poden haver estat sotmesos a cirurgia ni poden haver estat tractats amb agents potencialment modificadors del curs de la malaltia (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexate, anti-TNF). Aquests criteris poden ser molt útils en l'anàlisi o el disseny d'estudis clínics. De fet, en diversos estudis clínics d'anti-TNFs ja s'ha descrit una major eficàcia en el manteniment de la remissió<sup>149</sup> i una menor incidència d'efectes adversos<sup>150</sup> en els pacients amb menys d'1 any d'evolució de la malaltia respecte a aquells que porten més de 5 anys d'evolució.

El nostre estudi és el primer que considera la malaltia de Crohn en adults diferenciant entre els estadis inicials i avançats de la malaltia. Quan es tracta d'investigar els mecanismes immunitaris cel·lulars subjacents a les manifestacions patològiques hem de ser més estrictes en la definició del que considerem malalts debut de Crohn. La definició clínica pot ser molt útil en l'estudi de l'efectivitat de fàrmacs però a nivell de l'estudi de la resposta del sistema immunitari implicada en la patofisiologia de la malaltia hem de distingir entre el 1er brot de la malaltia i els següents ja que els desencadenants poden ser ben diferents com ho indica el fet que la primera manifestació de la malaltia no es dona de mitja fins a la segona o tercera dècada de vida, mentre que un cop ha aparegut la freqüència de rebrots d'activitat és molt més elevada. Així doncs, l'estudi dels diferents estadis de la malaltia ens pot portar a un major coneixement de quins són els mecanismes implicats en l'origen però també en la recurrència de la malaltia.

L'estudi dels limfòcits Th17 circulants i infiltrats al teixit ens ha portat a algunes observacions sobre aquesta població independents de la malaltia inflamatòria intestinal, ja que són característiques que hem observat tant en els controls sans com en els malalts. A més de produir IL-17 hem vist com els limfòcits Th17 poden coproduir IFN- $\gamma$ , la qual cosa ens dona una idea de la manca de rigidesa que hi ha entre els diferents llinatges de limfòcits T col·laboradors. Una altra mostra d'aquesta heterogeneïtat és la coproducció de TNF- $\alpha$  i IL-17. El TNF- $\alpha$  és una citocina produïda per molts tipus cel·lulars però en el cas dels limfòcits T col·laboradors sempre s'ha associat als Th1. Els nostres resultats

mostren com més d'un 80% dels limfòcits Th17 també coexpressen TNF- $\alpha$  traient-li l'exclusivitat al llinatge Th1. De fet, ja s'havia descrit que els clons Th17 de zones inflamades presenten una major expressió de TNF- $\alpha$  que els clons Th1<sup>49</sup>.

En el cas de les cèl·lules Th17 sembla que la plasticitat és encara major que en els altres llinatges. La transició de cèl·lules Th17, transferides a un ratolí SCID, cap a Th1 s'ha descrit en aquest model de colitis. Aquests ratolins finalment presenten a l'intestí una població mixta Th17 i Th1 igual que els ratolins transferits convencionalment amb cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup><sup>151</sup>. Sembla que aquesta plasticitat però s'observa només en les cèl·lules Th17 generades *in vitro*, que sota estímuls de IL-12 i IL-4 canvien la seva expressió de citocines cap a Th1 i Th2 respectivament. En canvi els limfòcits Th17 estudiats *ex vivo* mantenen l'expressió de les seves citocines característiques tot i ser sotmesos a l'estimulació amb citocines pro-Th1 i Th2. Aquestes dades semblen indicar que al coneixement que tenim de la diferenciació dels limfòcits Th17 li falta algun factor que *in vivo* fa que aquest llinatge memòria sigui estable<sup>152</sup>.

Un altre dels fets que fa pensar en una major plasticitat d'aquestes cèl·lules Th17 és que comparteixen el TGF- $\beta$  com a factor necessari de diferenciació amb els limfòcits Treg. S'ha descrit que aquestes cèl·lules Treg tenen la capacitat de transformar-ser en cèl·lules productores de IL-17 passant per estadis intermedis de coexpressió de Foxp3 i IL-17<sup>153</sup> i, inclús s'ha descrit la capacitat supressora d'aquestes cèl·lules Foxp3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup><sup>154</sup>. No sabem si aquesta capacitat supressora és un vestigi que queda en unes cèl·lules que es troben en transició cap al llinatge Th17 o si aquestes cèl·lules estan totalment diferenciades i presenten característiques mixtes de dues poblacions que nosaltres hem classificat com diferents. En qualsevol cas, aquests estudis ens mostren que els limfòcits T col·laboradors mostren una gran flexibilitat en les seves funcions i producció de citocines la qual cosa els capacita per a l'adaptació a ambients dinàmics.

Una prova d'aquesta capacitat d'adaptació és el tret diferencial que els limfòcits T col·laboradors en circulació no expressen IL-6 (Figura 31) com ja s'havia observat<sup>155</sup>, mentre que els aïllats de làmina pròpia sí presenten aquesta coproducció (Figura 47). Aquesta producció de IL-6 és comú a controls sans i pacients amb la malaltia de Crohn en qualsevol estadi, i no és exclusiva de la població Th17 sinó que trobem coproducció també de IFN- $\gamma$  i IL-6. La funció que pugui tenir aquesta producció específica en el teixit intestinal així com els estímuls que l'indueixen són qüestions que resten per resoldre. En un article dels anys 90 es va reportar la producció de IL-6 per part de limfòcits CD3<sup>+</sup> infiltrats a la làmina pròpia de pacients amb malaltia de Crohn<sup>156</sup> i també s'ha descrit aquesta producció recentment en limfòcits Th17 diferenciats *in vitro* a partir de cèl·lules naïve de sang perifèrica<sup>13</sup>. Una possibilitat que pensem que seria interessant de ser investigada és la inducció de l'expressió de la IL-6 en els limfòcits a través de l'activació via "toll-like receptors" (TLRs). És ampliament conegut que una de les vies de senyalització que porten a la transcripció de la IL-6 en macròfags i altres tipus cel·lulars

és a través de l'activació de diferents TLRs<sup>157</sup>. Està descrit que els limfòcits CD4<sup>+</sup> expressen la majoria de TLRs descrits fins al moment tot i que en menor quantitat que altres cèl·lules del sistema immunitari innat. A més, sabem que la coestimulació dels limfòcits amb lligands de TLRs té un efecte sobre la capacitat de proliferació i que l'activació de Treg a través del TLR2 reverteix la seva capacitat supressora<sup>158</sup>. Recentment s'ha descrit també que l'activació de limfòcits CD4<sup>+</sup> amb el lligand del TLR2 indueix una major expressió de IL-17<sup>159</sup>. Hipotetitzem doncs que els limfòcits que es troben en un ambient com la làmina pròpia intestinal, on els lligands de molts TLRs hi tenen fàcil accés i de fet s'hi troben en quantitats reduïdes, són susceptibles de ser modulats per aquesta via de senyalització que portaria a la transcripció d'alguns mediadors inflamatoris com la IL-6.

Una altra observació del nostre grup de controls i pacients amb malaltia de Crohn és que les cèl·lules Th17 no expressen IL-21. Això va en contra d'algunes observacions realitzades en ratolí en que la IL-21 és produïda per les cèl·lules Th17 i juga un paper autocrí en el seu manteniment i expansió<sup>160,161</sup>. En humans s'ha descrit que la IL-21 conjuntament amb el TGF- $\beta$  indueixen la diferenciació de cèl·lules Th17<sup>15</sup> però també a nivell funcional s'ha relacionat amb l'expansió i activació del llinatge Th1<sup>162</sup>. En la malaltia de Crohn s'ha descrit un augment de la producció de IL-21 a la làmina pròpia intestinal però no en els limfòcits circulants on el percentatge de cèl·lules productores de IL-21 és molt baix, <2% i similar als que nosaltres detectem, i igual entre malalts i controls sans<sup>163</sup>. En canvi, la descripció de l'augment del percentatge de cèl·lules IL-21<sup>+</sup> en l'intestí dels malalts no coincideix amb les nostres observacions. Inclús en les zones afectes dels malalts de Crohn detectem uns percentatges mínims de cèl·lules CD3<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> (<1%, Figura 46). Una de les possibles explicacions d'aquesta diferència seria que tot i utilitzar el mateix anticòs (clon eBio3A3-N2 (3A3-N2)) en l'article citat l'empren conjugat amb PE, un dels fluorocroms més intensos, mentre que en el nostre estudi l'hem utilitzat conjugat amb Alexa 647. En experiments realitzats hem pogut observar diferències en la detecció d'altres citocines utilitzant un mateix anticòs conjugat amb un o altre fluorocrom, la qual cosa ens fa pensar que aquesta podria ser una de les causes dels percentatges tan diversos de IL-21 descrits. Deixant de banda aquesta diferència, a l'article citat mostren que la majoria de limfòcits IL-21<sup>+</sup> són IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> i en un percentatge molt més baix IL-17<sup>+</sup> i IL-4<sup>+</sup>. A més responen a l'estimulació amb IL-12 produint més IL-21. Aquestes observacions en humans suggereixen un paper de la IL-21 relacionat amb el llinatge Th1 més que amb el Th17, a diferència del descrit en ratolí.

En tots els nostres grups d'estudi hem observat l'efecte inductor esperat de la IL-12 sobre la producció d'IFN- $\gamma$  i de la IL-23 sobre la producció de IL-17 (Figura 34). L'efecte de la IL-23 no és però el mateix sobre una altra citocina característica del llinatge Th17, la IL-22. En aquest cas la IL-23 no afecta a la producció de IL-22 en la

majoria dels grups estudiats però en el cas dels pacients amb malaltia de Crohn activa i avançada observem una disminució de la producció de IL-22 en resposta a IL-23 (Figura 36A). Per tant sembla que les citocines característiques del llinatge Th17 estan regulades de forma diferencial almenys pel que fa a la resposta a IL-23. De fet s'ha descrit un efecte inductor de la IL-12 sobre la producció de IL-22 i una major correlació d'aquesta citocina amb els limfòcits Th1 i la producció d'IFN- $\gamma$ <sup>164</sup>. Els nostres resultats mostren en general un comportament molt similar de la IL-17 i la IL-22 i diferent respecte a l'IFN- $\gamma$ . A més, en cap dels nostres grups d'estudi observem un efecte de la IL-12 sobre la producció de IL-22 (Figura 36B).

La IL-12 així com l'IFN- $\gamma$  en tant que citocines del llinatge Th1 poden inhibir el llinatge Th17<sup>46,137</sup>. Els nostres resultats però no corroboren això, ja que en cap dels grups estudiats trobem que la IL-12 tingui algun efecte sobre la producció de IL-17 o de IL-22. En canvi, de la IL-23 no s'ha descrit un efecte inhibidor sobre el llinatge Th1 sinó que contràriament s'ha observat un efecte inductor sobre la producció d'IFN- $\gamma$ <sup>46,137,165</sup>. En els nostres pacients i controls no hem observat cap efecte de la IL-23 sobre la producció d'IFN- $\gamma$  (Figura 35A). La inhibició de llinatges limfocitaris entre sí està descrita i acceptada a nivell de diferenciació però en el nostre cas en que treballem amb l'expansió i activació de cèl·lules memòria l'efecte de les diferents citocines sobre cada un dels llinatges pot ser molt diferent en funció del tipus de cèl·lules estudiades i de les condicions de cultiu; a més la heterogeneïtat i plasticitat dels limfòcits T col·laboradors fan pensar en una multiplicitat de possibles respostes davant estímuls concrets.

Una de les variables que poden explicar aquesta disparitat de respostes, és l'expressió diferencial dels receptors de les citocines estudiades. Així vam mesurar l'expressió tant de la subunitat específica del receptor de la IL-12 com la de la IL-23. Tots els nostres grups de pacients i controls sans presenten una expressió molt similar de la subunitat IL12R $\beta$ 2 en cèl·lules CD4<sup>+</sup> de sang perifèrica. En canvi, pel que fa a l'expressió de la subunitat IL23R sembla que hi ha una tendència a que els pacients amb malaltia de Crohn presentin una major expressió respecte als controls sans tot i que la diferència només és significativa en el cas dels pacients amb malaltia inactiva (Figura 38). El marcatge del receptor de la IL-23 expressat en la membrana cel·lular ens indica una expressió proteica similar en tots els grups estudiats (Figura 39), tot i que la correlació amb la població Th17 va ser impossible d'establir degut a les dificultats tècniques del marcatge d'aquest receptor juntament amb el marcatge intracel·lular de citocines, com ja hem detallat als Resultats.

Les diferències observades en la població Th17 de sang perifèrica en els pacients amb malaltia activa i avançada poden ser un reflexe del procés inflamatori local que té lloc en l'intestí. En el nostre grup de pacients trobem que les zones d'intestí macroscòpicament

inflamades presenten un augment significatiu dels trànscrips de totes les citocines estudiades, IL-17A i F, IL-22, IL-6 i IFN- $\gamma$  respecte a l'intestí sa d'individus control. Aquesta observació es correspon amb estudis previs en que ja s'ha descrit l'augment en els trànscrips d'aquestes citocines<sup>101,123,127</sup>. Ara bé, quan analitzem l'expressió d'aquestes citocines entre les zones afectes i no afectes dels pacients amb malaltia de Crohn, trobem un augment de IL-17A, IL-22 i IL-6, però no d'IFN- $\gamma$  ni de IL-17F a les zones inflamades. En un estudi recent en que estudien la presència de trànscrips d'ARN missatger per IFN- $\gamma$  i IL-17 en biòpsies quirúrgiques no observen diferències entre les zones inflamades i no inflamades dels pacients amb malaltia de Crohn, tant pels trànscrips d'IFN- $\gamma$  com pels de IL-17<sup>46</sup>. És important mencionar que a diferència d'aquest estudi que acabem de comentar, les biòpsies utilitzades en el nostre estudi van ser totes recollides de pacients sotmesos a colonoscòpia per avaluació de l'extensió i severitat de la malaltia. Totes les mostres que vam incloure provenen de zones de mucosa intestinal afecta i sana, clarament distingibles per la inflamació macroscòpica. En canvi, moltes de les mostres quirúrgiques s'obtenen de pacients sotmesos a resecció per malaltia estenosant. L'ambient pro-inflamatori pot ser molt diferent en cada cas i podria explicar les diferències observades entre els nostres resultats i els de l'estudi comentat. Les nostres dades donen suport a la hipòtesi que les citocines Th17 juguen un rol predominant en la resposta inflamatòria intestinal local.

Quan vam estudiar el perfil transcripcional d'aquestes citocines en la mucosa intestinal dels pacients que debutaven per la malaltia vam observar gairebé les mateixes diferències en la IL-17A, la IL-22 i la IL-6 detectades ja en els pacients amb malaltia avançada entre les zones amb inflamació i les no inflamades. A més però els trànscrips tant d'IFN- $\gamma$  com de IL-17F es troben significativament elevats en les zones inflamades dels pacients debut. En cada cas l'explicació sembla diferent. L'IFN- $\gamma$  augmenta en les zones no afectes de la mucosa intestinal a mesura que la malaltia avança, mentre que la IL-17F sembla que disminueix la seva expressió en les zones inflamades dels pacients amb malaltia avançada.

De les citocines estudiades només IL-17A i F es troben augmentades a les zones no afectes dels pacients amb malaltia de Crohn respecte les biòpsies sanes. Aquesta diferència ja l'observem en els pacients que debuten per la malaltia i es manté durant la seva evolució. La taxa d'increment d'IFN- $\gamma$  a les zones no inflamades augmenta només en els pacients amb malaltia avançada però sense arribar a ser significativament diferent a la de les biòpsies sanes d'individus control.

Aquestes dades considerades en conjunt suggereixen un paper de la població Th17 en l'activitat de la malaltia, tant en els estadis inicials com més avançats, a nivell de la inflamació intestinal local. Però a més, els trànscrips per dues de les citocines Th17 es troben elevats en el teixit intestinal no afecte dels pacients que presenten els primers brots de la malaltia, la qual cosa suggereix que aquesta població es troba ja alterada a

nivell local i de forma independent del procés inflamatori concomitant. En canvi, pel que fa a l'IFN- $\gamma$  el podem relacionar també amb l'activitat de la malaltia en els pacients que pateixen els primers brots, però l'augment dels transcrits en les zones no afectes que apareix en estadis més avançats arriben als mateixos nivells d'expressió observats en les zones inflamades.

Tot i l'increment de les diferents citocines estudiades en les zones afectes dels pacients amb malaltia de Crohn, limfòcits productors d'aquestes citocines, com les cèl·lules CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  i IL-17, poden ser aïllats de la mucosa intestinal sana<sup>126,145</sup>. Els nostres resultats corroboren també aquesta observació tant per marcatge intracel·lular dels limfòcits aïllats de la làmina pròpia intestinal (Figura 44) com per marcatge immunohistoquímic (Figura 52B).

En contrast a l'observat a nivell de transcrits d'ARN missatger en les biòpsies de zones afectes, quan aïllem les cèl·lules de la lamina pròpia de biòpsies endoscòpiques fresques, no trobem diferències significatives en el percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, tot i que observem una tendència a l'augment en els pacients amb malaltia de Crohn, tant en les zones sanes com inflamades. Un estudi previ ha mostrat un augment en les cèl·lules IL17<sup>+</sup>, però no en les IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, de la làmina pròpia dels pacients amb malaltia de Crohn<sup>126</sup>, mentre que altres no mostren canvis en les cèl·lules Th17 quan es compara la mucosa intestinal de pacients amb activitat amb la de controls sans<sup>46,166</sup>. Un tercer tipus de resultats són estudis que mostren un augment en ambdós llinatges cel·lulars de limfòcits CD3<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup> i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> a la mucosa inflamada de pacients amb malaltia de Crohn<sup>125,163</sup>. Encara està per determinar si l'augment de IL-17 observat a nivell transcripcional a la mucosa afecta de malalts de Crohn actius pot ser atribuït a l'augment del nombre total de cèl·lules CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, a l'augment en la producció de la IL-17, o inclús si aquest augment pot ser degut a la producció per part d'altres tipus cel·lulars productors de IL-17, com s'ha suggerit dels macròfags CD68<sup>+123</sup> en l'intestí humà o també d'altres poblacions descrites en ratolí com les "lymphoid tissue inducer-like cells" CD3<sup>-</sup>Thy1<sup>+167</sup>. Aquesta última opció de la producció de IL-17 per part d'altres cèl·lules no CD4<sup>+</sup> és recolzada per l'observació que els transcrits d'ARN missatger de IL-17 mesurats en biòpsia són més elevats en la malaltia de Crohn activa, però quan s'aïllen les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i s'analitza també l'ARN de IL-17 només d'aquestes cèl·lules la diferència es perd<sup>46</sup>.

Com hem comentat en la introducció altres estudis han mostrat un augment en la producció d'IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits T de la làmina pròpia inflamada de malalts de Crohn comparat amb controls sans<sup>92,102,168</sup>. Aquests estudis mesuren la producció d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules T un cop estimulades amb combinacions d'anti-CD2 o anti-CD3, amb anti-CD28, o estimulades en presència de PMA i anticossos anti-CD3. En

aquests casos mostren que hi ha un increment en la producció d'IFN- $\gamma$  per part de les cèl·lules aïllades de zones afectes de malalts de Crohn. En canvi, i de forma similar al que observem nosaltres, quan la producció de les cèl·lules s'estudia en absència d'estimulació, tampoc troben una major producció d'IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits aïllats de biòpsies inflamades de pacients. És més, els nostres resultats mostren una disminució del percentatge de cèl·lules CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en les zones sanes de mucosa intestinal dels pacients amb malaltia de Crohn. Les zones inflamades de làmina pròpia de pacients amb malaltia de Crohn no presenten doncs un percentatge més elevat ni de limfòcits Th17 ni Th1 però sí en canvi de la població que anomenem Th17/Th1, és a dir, d'aquelles cèl·lules dobles productores de IL-17 i IFN- $\gamma$  (Figura 45).

Hem de tenir en compte però que aquestes dades són percentatges respecte a cèl·lules CD3<sup>+</sup>, i sabem que en la làmina pròpia intestinal inflamada hi ha una gran infiltració de cèl·lules tant del sistema immunitari innat com adquirit, entre elles de limfòcits CD3<sup>+</sup>. D'aquesta manera, tot i que els percentatges de cèl·lules CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> no revelin diferències entre l'intestí sa i l'inflamat, el nombre total de limfòcits CD3 infiltrats al teixit és major en l'intestí que pateix un procés inflamatori i, per tant, seria d'esperar que també ho sigui el nombre de cèl·lules Th17. Així doncs, vam realitzar un marcatge immunohistoquímic de IL-17 en talls intestinals tant d'individus controls com de pacients debut i avançats amb malaltia de Crohn activa. El marcatge per IL-17 és efectivament més abundant en la làmina pròpia intestinal dels pacients que presenten infiltració inflamatòria deguda a l'activitat de la malaltia de Crohn que en l'intestí sa d'individus control (Figura 53). A més, com ja hem observat amb els transcrits d'ARN missatger, la IL-17 és tan abundant en l'intestí dels pacients que pateixen el primer brot de la malaltia com en els que ja porten anys d'evolució de la malaltia.

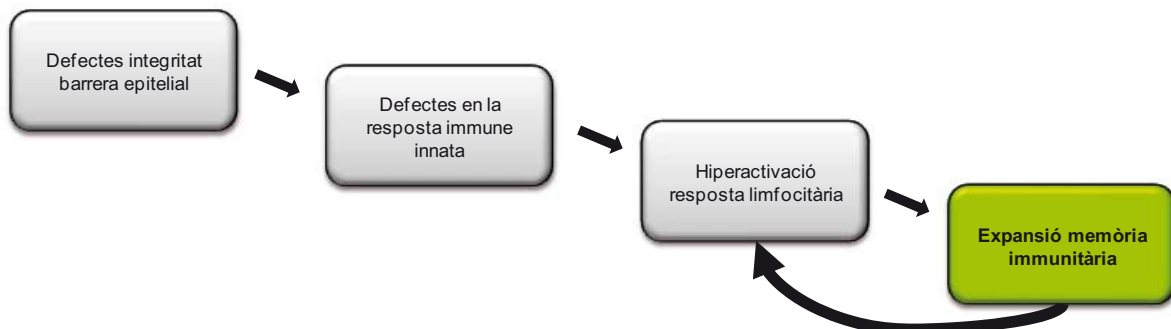
Compilant els resultats dels estudis inclosos en aquesta tesi doctoral, proposem un model per explicar les diferències observades entre les respostes local i sistèmica en els malalts debut per la malaltia. En els estadis inicials de la malaltia es dona una major activació dels limfòcits T de la mucosa intestinal però en canvi aquesta resposta no l'observem en els limfòcits T circulants, com seria d'esperar d'una resposta immunitària local. Proposem doncs, que com a resultat d'aquesta major resposta dels limfòcits T front als antígens intestinals, es desenvolupen cèl·lules T memòria, que per la seva naturalesa longeva persisteixen tant a la mucosa intestinal com en circulació. Això explicaria que només observem un augment d'aquestes cèl·lules Th17 circulants en malalts que ja han patit més d'un brot de la malaltia i per tant ja han generat les cèl·lules memòria.

Encara està per veure quin seria el significat biològic de la presència d'aquestes cèl·lules efectores potencialment pro-inflamatòries en circulació. Estudis en models experimentals han mostrat que els limfòcits T memòria circulants, i no només els de la làmina pròpia intestinal, presenten capacitat colitogènica <sup>169</sup>. Els limfòcits T colitogènics (és a dir,

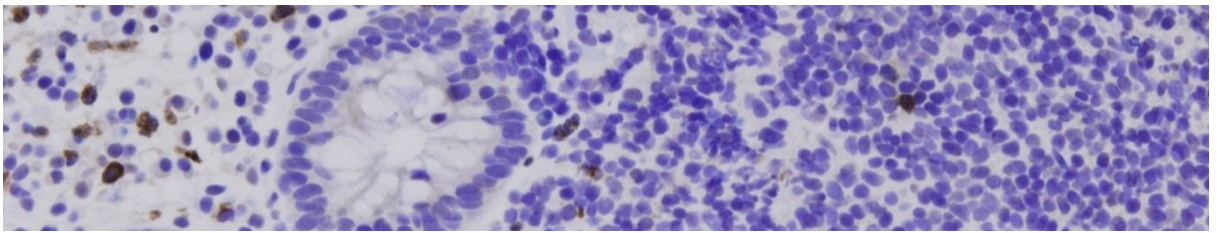


aquelles cèl·lules amb capacitat per induir colitis quan es transfereixen a un nou hoste limfopènic) s'han identificat doncs no només a nivell local, on es produeix l'activació dels limfòcits efectors, com en la lamina pròpia intestinal en els ratolins colítics, sinó també en sang perifèrica com limfòcits T memòria<sup>170,171</sup>. A més aquests limfòcits memòria no estan contínuament recirculant sinó que poden residir a òrgans amb alta concentració de IL-7, citocina que manté aquesta població en homeòstasi, com al moll de l'os<sup>169,172</sup>. Aquest fet podria explicar que els malalts inactius presentin un percentatge menor dels limfòcits Th17 en circulació i que, en resposta a una alarma d'activitat, podrien mobilitzar-se i/o expandir-se i passar a circulació on els detectem en els pacients amb malaltia de Crohn activa avançada.

Aprofitant el model de 3 estadis per al desenvolupament de la malaltia de Crohn proposat per Segal et al. podríem nosaltres afegir un 4rt estadi en que aquesta població de cèl·lules Th17 que hem trobat augmentada en circulació sistèmica dels pacients amb malaltia de Crohn activa i avançada jugui un paper en la recurrència de la malaltia. Aquest 4rt estadi amb l'intervenció dels limfòcits T memòria ens permetria donar una explicació diferent de l'origen inicial de la malaltia que dels rebrots d'activitat següents i potser començar a entendre com les teràpies anti-TNF i immunosupressores són eficaces en una malaltia inflamatòria de base immunitària amb defectes a nivell del sistema immunitari innat.



## Conclusions





## CONCLUSIONS

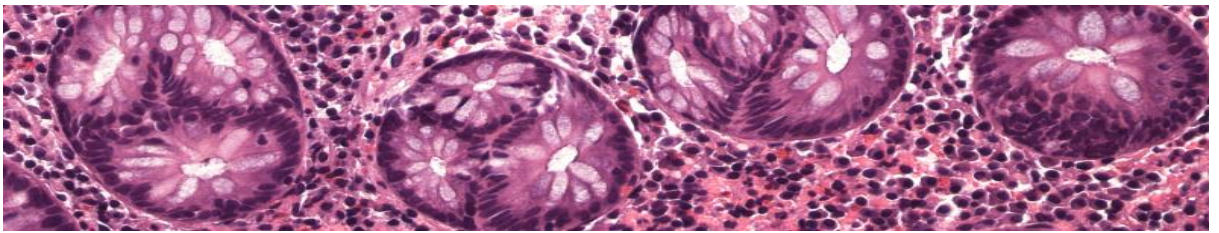
- Els períodes d'activitat de la malaltia de Crohn s'associen a una resposta sistèmica exacerbada de la població Th17, essent la producció de IL-17 en sobrenedant de sang total, el percentatge de limfòcits CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> i la producció de IL-17 per part d'aquestes cèl·lules més elevada que en els pacients amb malaltia inactiva i els controls sans.
- La població Th1 circulant no presenta un augment tan generalitzat com la Th17, sinó que només s'associa amb l'activitat de la malaltia de Crohn en l'augment del percentatge de limfòcits CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> circulants i en el de limfòcits que denominem dobles productors Th17/Th1.
- Els pacients amb malaltia de Crohn que presenten el primer brot de la malaltia no presenten a nivell sistèmic un augment de la resposta Th17.
- La mucosa intestinal inflamada dels pacients amb malaltia de Crohn presenta un augment en els transcrits de diverses citocines com la IL-6, la IL-17 i la IL-22 però no en els transcrits d'IFN- $\gamma$ .
- La mucosa intestinal inflamada dels pacients debut per la malaltia presenten també un augment en els transcrits de les citocines Th17 estudiades, però a més presenten també un augment dels transcrits d'IFN- $\gamma$ .
- El percentatge de limfòcits CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> és similar en la làmina pròpia sana d'individus control i en la làmina pròpia no afecta i en la inflamada dels pacients amb malaltia de Crohn. El percentatge de limfòcits CD3<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> és més elevat en les zones inflamades de la mucosa intestinal dels pacients amb malaltia de Crohn.
- El nombre de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> infiltrades a la mucosa intestinal inflamada és igual en els pacients debut per la malaltia i els que es troben en estadis més avançats, i és significativament més elevat que en la mucosa intestinal sana.

En resum, els pacients amb malaltia de Crohn que presenten activitat de la malaltia per primer cop presenten una resposta sistèmica Th17 i Th1 normal, a diferència dels malalts que ja porten anys d'evolució de la malaltia. Tot i això, els malalts debut presenten en la mucosa intestinal el perfil transcripcional de mucosa inflamada observat ja en malalts actius avançats i un nombre de cèl·lules IL-17<sup>+</sup> infiltrades a la mucosa intestinal elevat i similar als dels pacients amb malaltia avançada.

Basant-nos doncs en aquestes observacions proposem:

1. que la diferenciació de cèl·lules efectores Th17 es dona a la mucosa intestinal afecta i juga un paper en l'amplificació de la resposta inflamatòria via producció de diferents citocines proinflamatòries i,
2. que durant els estadis avançats de la malaltia es va acumulant una població de cèl·lules Th17 memòria en perifèria que s'expandeix durant els brots d'activitat i que podria representar un mecanisme de reaparició i perpetuació de la malaltia.

## Bibliografia





## BIBLIOGRAFIA

1. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173 (1989).
2. Oppmann, B. *et al.* Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725 (2000).
3. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910-1914 (2003).
4. Harrington, L. E., Mangan, P. R. & Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 349-356 (2006).
5. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 24, 179-189 (2006).
6. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234 (2006).
7. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238 (2006).
8. Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942-949 (2007).
9. Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8, 950-957 (2007).
10. Evans, H. G., Suddason, T., Jackson, I., Taams, L. S. & Lord, G. M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 17034-17039 (2007).
11. O'Garra, A., Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nat. Immunol.* 9, 588-590 (2008).
12. Zhou, L. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240 (2008).



13. Volpe, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* 9, 650-657 (2008).
14. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat. Immunol.* 9, 641-649 (2008).
15. Yang, L. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* (2008).
16. Cosmi, L. *et al.* Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* 205, 1903-1916 (2008).
17. Santarlasci, V. *et al.* TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 39, 207-215 (2009).
18. Wright, J. F. *et al.* Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 13447-13455 (2007).
19. Yao, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 155, 5483-5486 (1995).
20. McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 27, 17-23 (2006).
21. Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28, 454-467 (2008).
22. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271-2279 (2006).
23. Shen, F., Ruddy, M. J., Plamondon, P. & Gaffen, S. L. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J. Leukoc. Biol.* 77, 388-399 (2005).
24. Xu, S. & Cao, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 7, 164-174 (2010).
25. Wolk, K. & Sabat, R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 367-380 (2006).
26. Dumoutier, L., Van, R. E., Colau, D. & Renauld, J. C. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional

- characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10144-10149 (2000).
27. Ye, P. *et al.* Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 335-340 (2001).
  28. Ishigame, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity.* 30, 108-119 (2009).
  29. Yu, J. J., Ruddy, M. J., Conti, H. R., Boonananantasarn, K. & Gaffen, S. L. The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infect. Immun.* 76, 4206-4213 (2008).
  30. Eyerich, K. *et al.* Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J. Invest Dermatol.* 128, 2640-2645 (2008).
  31. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H. C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118, 1001-1011 (2000).
  32. Milner, J. D. *et al.* Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452, 773-776 (2008).
  33. Liu, S. J. *et al.* Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J. Leukoc. Biol.* 82, 354-360 (2007).
  34. Michel, M. L. *et al.* Identification of an IL-17 $\Gamma$ Çöproducing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 995-1001 (2007).
  35. Stark, M. A. *et al.* Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 22, 285-294 (2005).
  36. Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E. & Trifilieff, A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170, 2106-2112 (2003).
  37. Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 430-438 (2001).

38. Zhou, Q., Desta, T., Fenton, M., Graves, D. T. & Amar, S. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infect. Immun.* 73, 935-943 (2005).
39. Shin, H. C., Benbernou, N., Esnault, S. & Guenounou, M. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. *Cytokine* 11, 257-266 (1999).
40. Peng, M. Y. *et al.* Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell Mol. Immunol.* 5, 203-208 (2008).
41. Fenoglio, D. *et al.* V $\delta$ 1 T lymphocytes producing IFN- $\gamma$  and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 113, 6611-6618 (2009).
42. Wershil, B. K. & Furuta, G. T. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, S380-S383 (2008).
43. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757-1764 (2007).
44. Jaensson, E. *et al.* Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* 205, 2139-2149 (2008).
45. Becker, C. *et al.* Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J. Clin. Invest* 112, 693-706 (2003).
46. Kobayashi, T. *et al.* IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682-1689 (2008).
47. Stavnezer, J. Immunoglobulin class switching. *Current Opinion in Immunology* 8, 199-205 (1996).
48. Mora, J. R. *et al.* Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science* 314, 1157-1160 (2006).
49. Pene, J. *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated th17 lymphocytes. *J. Immunol.* 180, 7423-7430 (2008).
50. Veldhoen, M. & Stockinger, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol.* 27, 358-361 (2006).

51. Palmer, M. T. & Weaver, C. T. Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup. *Nat. Immunol.* 11, 36-40 (2010).
52. Crohn, B. B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G. D. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am. J. Med.* 13, 583-590 (1932).
53. Gassull M.A., Gomollón F, Hinojosa J & Obrador A *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Arán Ediciones S.L., (2007).
54. Stange, E. F. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55 Suppl 1, i1-15 (2006).
55. Farreras & Rozman *Medicina Interna*. (Elsevier,2007).
56. Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S. & Colombel, J. F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55, 749-753 (2006).
57. Lopez, S. P. *et al.* Epidemiologic study on the current incidence of inflammatory bowel disease in Madrid. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 101, 768-772 (2009).
58. Herrinton, L. J., Liu, L., Lewis, J. D., Griffin, P. M. & Allison, J. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a Northern California managed care organization, 1996-2002. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1998-2006 (2008).
59. Chamberlin, W. M. & Naser, S. A. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med. Sci. Monit.* 12, RA27-RA33 (2006).
60. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 347, 417-429 (2002).
61. Barrett, J. C. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 955-962 (2008).
62. Cho, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 458-466 (2008).
63. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678 (2007).
64. van Beelen, A. J. *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 27, 660-669 (2007).

65. Pappu, B. P. *et al.* TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 205, 1049-1062 (2008).
66. Travis, S. P. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 55 Suppl 1, i16-i35 (2006).
67. Chowers, Y. & Allez, M. Efficacy of anti-TNF in Crohn's disease: how does it work? *Curr. Drug Targets.* 11, 138-142 (2010).
68. Yousry, T. A. *et al.* Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 354, 924-933 (2006).
69. Feagan, B. G. *et al.* Treatment of active Crohn's disease with MLN0002, a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 1370-1377 (2008).
70. Mannon, P. J. *et al.* Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2069-2079 (2004).
71. Sandborn, W. J. *et al.* A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 135, 1130-1141 (2008).
72. Hommes, D. W. *et al.* Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 55, 1131-1137 (2006).
73. Ito, H. *et al.* A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 989-996 (2004).
74. Soderholm, J. D., Malm, C., Juliusson, G. & Sjobahl, R. Long-term endoscopic remission of crohn disease after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Scand. J. Gastroenterol.* 37, 613-616 (2002).
75. Oyama, Y. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 128, 552-563 (2005).
76. Cassinotti, A. *et al.* Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut* 57, 211-217 (2008).
77. Sartor, R. B. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 24, 475-507 (1995).

78. Ma, T. Y. Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 214, 318-327 (1997).
79. Yamamoto-Furusho, J. K. & Korzenik, J. R. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J. Gastroenterol.* 12, 6751-6755 (2006).
80. Gersemann, M., Wehkamp, J., Fellermann, K. & Stange, E. F. Crohn's disease--defect in innate defence. *World J. Gastroenterol.* 14, 5499-5503 (2008).
81. Netea, M. G. *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.* 174, 6518-6523 (2005).
82. Kramer, M., Netea, M. G., de Jong, D. J., Kullberg, B. J. & Adema, G. J. Impaired dendritic cell function in Crohn's disease patients with NOD2 3020insC mutation. *J. Leukoc. Biol.* 79, 860-866 (2006).
83. Wehkamp, J. *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664 (2004).
84. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. & Deretic, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-1441 (2006).
85. Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J. & Xavier, R. J. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS. One.* 3, e3391 (2008).
86. Marks, D. J. *et al.* Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *The Lancet* 367, 668-678 (2006).
87. Smith, A. M. *et al.* Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 206, 1883-1897 (2009).
88. Korzenik, J. R. & Dieckgraefe, B. K. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 45, 1121-1129 (2000).
89. Sewell, G. W., Marks, D. J. & Segal, A. W. The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 506-513 (2009).
90. Rugtveit, J., Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Fausa, O. & Scott, H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* 35, 669-674 (1994).

91. Monteleone, G. *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112, 1169-1178 (1997).
92. Parronchi, P. *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 823-832 (1997).
93. Matsuoka, K. *et al.* T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 53, 1303-1308 (2004).
94. MacDonald, T. T., Hutchings, P., Choy, M. Y., Murch, S. & Cooke, A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin. Exp. Immunol.* 81, 301-305 (1990).
95. Mahida, Y. R., Wu, K. & Jewell, D. P. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30, 835-838 (1989).
96. Blumberg, R. S., Saubermann, L. J. & Strober, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Immunology* 11, 648-656 (1999).
97. Ina, K. *et al.* Resistance of Crohn's Disease T Cells to Multiple Apoptotic Signals Is Associated with a Bcl-2/Bax Mucosal Imbalance. *J Immunol* 163, 1081-1090 (1999).
98. MacDonald, T. T., Monteleone, G. & Pender, S. L. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 51, 2-9 (2000).
99. Neurath, M. F. Mucosal immunity in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 10 Suppl 1, S29-S31 (2004).
100. Stallmach, A. *et al.* Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 19, 308-315 (2004).
101. Breese, E., Braegger, C. P., Corrigan, C. J., Walker-Smith, J. A. & MacDonald, T. T. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 78, 127-131 (1993).
102. Fuss, I. J. *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157, 1261-1270 (1996).

103. Neurath, M. F. *et al.* The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 195, 1129-1143 (2002).
104. Parrello, T. *et al.* Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J. Immunol.* 165, 7234-7239 (2000).
105. Mudter, J. *et al.* Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 64-72 (2005).
106. Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K. & Weiner, H. L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J. Immunol.* 176, 7768-7774 (2006).
107. Chi, W. *et al.* IL-23 promotes CD4<sup>+</sup> T cells to produce IL-17 in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1218-1224 (2007).
108. Shen, H., Goodall, J. C. & Hill Gaston, J. S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1647-1656 (2009).
109. Lowes, M. A. *et al.* Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest Dermatol.* 128, 1207-1211 (2008).
110. Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest* 116, 1310-1316 (2006).
111. Hue, S. *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 203, 2473-2483 (2006).
112. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748 (2003).
113. Murphy, C. A. *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 198, 1951-1957 (2003).
114. Uhlig, H. H. *et al.* Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25, 309-318 (2006).
115. Montufar-Solis, D., Schaefer, J., Hicks, M. J. & Klein, J. R. Massive but selective cytokine dysregulation in the colon of IL-10<sup>-/-</sup> mice revealed by multiplex analysis. *Int. Immunol.* 20, 141-154 (2008).



116. Alex, P. *et al.* Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 15, 341-352 (2009).
117. Melgar, S., Karlsson, A. & Michaelsson, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288, G1328-G1338 (2005).
118. 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, 382-388 (2006).
119. Schmidt, C. *et al.* Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11, 16-23 (2005).
120. Holta, V. *et al.* IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 1175-1184 (2008).
121. Fuss, I. J. *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.* 12, 9-15 (2006).
122. Sakuraba, A. *et al.* Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137, 1736-1745 (2009).
123. Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70 (2003).
124. Nielsen, O. H., Kirman, I., Rudiger, N., Hendel, J. & Vainer, B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 180-185 (2003).
125. Rovedatti, L. *et al.* Differential regulation of interleukin 17 and interferon  $\gamma$  production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58, 1629-1636 (2009).
126. Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849-1861 (2007).
127. Brand, S. *et al.* IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 290, G827-G838 (2006).

128. Wolk, K. *et al.* IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J. Immunol.* 178, 5973-5981 (2007).
129. Schmechel, S. *et al.* Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 204-212 (2008).
130. Kleinschek, M. A. *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 206, 525-534 (2009).
131. Mahida, Y. R. *et al.* Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 377-386 (1997).
132. Nancey, S. *et al.* Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig. Dis. Sci.* 53, 242-247 (2008).
133. Mitsuyama, K. *et al.* Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 36, 45-49 (1995).
134. Lautenbach, E., Berlin, J. A. & Lichtenstein, G. R. Risk factors for early postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 259-267 (1998).
135. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448, 484-487 (2007).
136. Monteleone, G. *et al.* Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128, 687-694 (2005).
137. Hoeve, M. A. *et al.* Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 661-670 (2006).
138. Awasthi, A. *et al.* Cutting Edge: IL-23 Receptor GFP Reporter Mice Reveal Distinct Populations of IL-17-Producing Cells. *J Immunol* 182, 5904-5908 (2009).
139. Correa, I. *et al.* Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 85, 896-903 (2009).
140. Jameson, S. C. & Masopust, D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859-871 (2009).

141. Amadi-Obi, A. *et al.* TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* 13, 711-718 (2007).
142. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133 (2006).
143. Desreumaux, P. *et al.* Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 113, 118-126 (1997).
144. Dubucquoi, S. *et al.* Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. *Gut* 37, 242-246 (1995).
145. Kugathasan, S. *et al.* Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 1696-1705 (2007).
146. Holland, N. *et al.* Reduced intracellular T-helper 1 interferon-gamma in blood of newly diagnosed children with Crohn's disease and age-related changes in Th1/Th2 cytokine profiles. *Pediatr. Res.* 63, 257-262 (2008).
147. MACK, D. R., BEEDLE, S. U. S. A., WARREN, J. A. I. M., DAVIS, A. J. & GROSS, T. H. O. M. Peripheral Blood Intracellular Cytokine Analysis in Children Newly Diagnosed with Inflammatory Bowel Disease. *Pediatric Research* 51, (2002).
148. Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Colombel, J. F. & Sandborn, W. J. Early Crohn disease: a proposed definition for use in disease-modification trials. *Gut* 59, 141-147 (2010).
149. Schreiber, S. *et al.* Increased Response and Remission Rates in Short-Duration Crohn's Disease With Subcutaneous Certolizumab Pegol: An Analysis of PRECiSE 2 Randomized Maintenance Trial Data. *Am J Gastroenterol* (2010).
150. Jean Frédéric, C. *et al.* Adalimumab for Maintenance of Clinical Response and Remission in Patients With Crohn's Disease: The CHARM Trial. *Gastroenterology* 132, 52-65 (2007).
151. Lee, Y. K. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92-107 (2009).
152. Lexberg, M. H. *et al.* Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur. J Immunol* 38, 2654-2664 (2008).
153. Koenen, H. J. P. M. *et al.* Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112, 2340-2352 (2008).

154. Voo, K. S. *et al.* Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 4793-4798 (2009).
155. Villiger, P. M., Cronin, M. T., Amenomori, T., Wachsman, W. & Lotz, M. IL-6 production by human T lymphocytes. Expression in HTLV-1-infected but not in normal T cells. *J Immunol* 146, 550-559 (1991).
156. Stevens, C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 37, 818-826 (1992).
157. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820 (2010).
158. Kabelitz, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 39-45 (2007).
159. Reynolds, J. M. *et al.* Toll-like Receptor 2 Signaling in CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes Promotes T Helper 17 Responses and Regulates the Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Immunity* 32, 692-702 (2010).
160. Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480-483 (2007).
161. Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. & O'Shea, J. J. IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* 282, 34605-34610 (2007).
162. Strengell, M., Sareneva, T., Foster, D., Julkunen, I. & Matikainen, S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J. Immunol.* 169, 3600-3605 (2002).
163. Sarra, M. *et al.* Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel. Dis.* (2010).
164. Volpe, E. *et al.* Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* 114, 3610-3614 (2009).
165. Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Willems, F. & Goldman, M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur. J. Immunol.* 35, 469-475 (2005).

166. Saruta, M. *et al.* Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J. Immunol.* 178, 3293-3300 (2007).
167. Takatori, H. *et al.* Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 35-41 (2009).
168. Plevy, S. E. *et al.* A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 159, 6276-6282 (1997).
169. Kanai, T. *et al.* Persistent retention of colitogenic CD4+ memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm. Bowel. Dis.* 15, 926-934 (2009).
170. Tomita, T. *et al.* Colitogenic CD4+ effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 1630-1640 (2008).
171. Asseman, C., Read, S. & Powrie, F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 171, 971-978 (2003).
172. Tokoyoda, K. *et al.* Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 30, 721-730 (2009).

# Annex





## ANNEX

Publicació derivada dels estudis d'aquesta tesi:

- **Veny M.**, Esteller M., Ricart E., Piqué J.M., Panés J., Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 31,561-72 (2010).



# Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients

M. VENY\*, M. ESTELLER†, E. RICART†, J. M. PIQUÉ†, J. PANÉS† & A. SALAS\*

\*Department of Experimental Pathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CIBER-EHD, Barcelona, Spain; †Department of Gastroenterology, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBER-EHD, Barcelona, Spain

Correspondence to:  
Dr A. Salas, Department of Experimental Pathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC, Rosselló 161, 6<sup>a</sup> planta, Barcelona 08036, Spain.  
E-mail: azucena.salas@iibb.csic.es

## Publication data

Submitted 15 September 2009  
First decision 25 October 2009  
Resubmitted 5 November 2009  
Accepted 1 December 2009  
Epub Accepted Article 3 December 2009

## SUMMARY

### Background

Th1 and Th17 cells have been implicated in Crohn's disease (CD) pathophysiology and may play a role in disease persistence.

### Aim

To determine Th1 and Th17 responses in intestine and peripheral blood of early (<32 weeks since initial symptoms) and late (>2 years) CD patients.

### Methods

Cytokine mRNA in intestinal biopsies was determined by RT-PCR. Cytokine concentration in culture was measured by ELISA and cytokine-producing cells were identified by intracellular staining.

### Results

The inflamed mucosa showed significantly increased IL-17 mRNA levels compared with non-inflamed areas, both in early and late CD patients. However, only patients with late ( $n = 12$ ), but not early ( $n = 9$ ), active disease showed increased IL-17 production, as well as a significantly higher percentage of IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in blood, compared with controls ( $n = 12$ ) or patients in remission ( $n = 13$ ). Moreover, cultured peripheral CD4<sup>+</sup> cells from late active CD patients presented significantly higher percentages of IL-17<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and a significantly increased production of IL-17 and IL-22, but not IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

### Conclusions

Increased IL-17 gene transcription is common to early and late CD mucosa. However, exacerbated Th17 responses in the peripheral blood appear only in late disease. We propose that this population may constitute a mechanism of perpetuating the disease.

*Aliment Pharmacol Ther* 31, 561–572

## INTRODUCTION

Crohn's disease is a chronic relapsing inflammatory disease of the intestinal tract. Defects in the innate immune system's response to bacterial stimuli have been associated with triggering of the disease.<sup>1, 2</sup> Innate immune deregulation can result in adaptive immune responses. Indeed, an important aspect of Crohn's disease is the recruitment to the intestinal mucosa, and proliferation of, effector T cells, which can play central roles in both the induction and maintenance of inflammation via their production of proinflammatory cytokines.

In Crohn's disease, upregulated effector responses have been consistently described as having a predominant T helper 1 (Th1) phenotype. Increased production of IL-12 subunit (p40)<sup>3, 4</sup> and IFN- $\gamma$  in response to activation<sup>3, 5, 6</sup> is found in inflamed intestinal mucosa of Crohn's disease patients. Consistent with this finding, clinical studies using anti-p40 monoclonal antibodies (mAbs) have demonstrated some beneficial effects in Crohn's disease patients.<sup>7</sup> However, it has subsequently become clear that the p40 subunit is not an exclusive component of the Th1-promoting cytokine IL-12 (p35/p40), but is rather shared by the cytokine IL-23 (p19/p40).<sup>8</sup> Studies in mice have established the importance of IL-23 in the expansion and survival of a new branch of effector helper T cells known as Th17, which are characterized by the production of the pro-inflammatory cytokine IL-17.<sup>9, 10</sup> Interestingly, mice deficient in p19 (IL-23), but not p35 (IL-12), are resistant to experimental models of autoimmune disease<sup>11-14</sup> and have no detectable presence of Th17 cells despite exhibiting normal Th1 responses. This suggests that, at least in these models, the IL-23/Th17 axis, rather than that of IL-12/Th1, is central to disease development. Recent studies have shown increased IL-23 and/or IL-17 production in the inflamed intestinal mucosa from inflammatory bowel disease (IBD) patients,<sup>15-18</sup> as well as higher serum IL-17 concentrations during active IBD.<sup>15</sup> Nevertheless, Th1 cells are still regarded as major players and the relative contribution of each effector arm to Crohn's disease pathophysiology remains unclear.

Aside from producing proinflammatory cytokines during active disease, what role cytokine-producing effector T cells play in mucosal and peripheral sites as Crohn's disease progresses from its early stages to becoming a recurrent, chronic disease remains unanswered. A recent study reported a shift in the cytokine

producing profile of T cell clones isolated from inflamed mucosal sites at early or late time points,<sup>19</sup> revealing a change in cytokine contribution as the disease progressed.

To determine better the roles played by Th1 and Th17 cytokines, we first examined cytokine production in the mucosa and peripheral blood of individuals suffering from Crohn's disease. Patients with active disease showed a clear Th17 transcriptional signature in the inflamed mucosa. Moreover, we observed an increase in Th1 and Th17 cytokine-producing cells in the peripheral blood of this patient group. Remarkably, this Th1/Th17 phenotype is exclusively present in the peripheral blood of late, but not early, active disease. In contrast, increased IL-17 production was similarly present in the inflamed areas of early Crohn's disease patients. Taken together, our results demonstrate that IL-17 plays a role in the appearance of early and late mucosal lesions during active Crohn's disease. Moreover, our findings suggest the participation of peripheral IL-17-producing cells during later stages of the disease. We propose that this cell subset could represent a potential mechanism for disease recurrence.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Healthy controls and patients with Crohn's disease in remission or with active disease were included in this study. The diagnosis of Crohn's disease was based on unequivocal endoscopic evidence of discontinuous inflammation in the small and/or large bowel, and a combination of histological abnormalities as described in the European Crohn's and Colitis Organisation Guidelines.<sup>20</sup> Active disease was defined by two criteria: (1) the presence of clinical signs and symptoms of disease activity; and (2) endoscopic lesions showing active disease or increased C reactive protein (CRP) (>0.8 mg/dL) in the absence of infectious complications. Remission was defined as the complete absence of symptoms and normal CRP (<0.8 mg/dL). Patients were categorized as early disease when peripheral blood was obtained within 32 weeks after onset of the first symptoms that led to diagnosis. Late Crohn's was defined as those patients having the disease for at least 1 year since the initial diagnosis. Patient clinical and demographic characteristics are summarized in Table 1. Healthy volunteers ( $n = 12$ ) without any

**Table 1.** Characteristics of Crohn's disease patients included in this study. Data are expressed as median and range

	Control	Inactive disease	Active disease	
			Early	Late
<i>N</i>	12	13	9	12
Age (years)	33.9 (24–64)	38.9 (28–55)	27.8 (17–38)	39.4 (25–73)
Gender (M/F)	6/6	4/9	5/4	5/7
Duration of disease	n.a.	9 years (1–27)	10 weeks (1–32)	7 years (2–11)
Medication*	n.a.	3/8/2/0	7/0/2/0	6/4/2/0
CRP (mg/dL)	n.a.	<0.8	2.36 (0.7–5.7)	5.05 (0.5–13.5)
Location of disease†	n.a.	3/7/3	4/5/0	2/6/4

\* No medication or 5-asa/immunosuppressors/steroids/antibiotics.

† Ileal/ileocolonic/colonic.

**Table 2.** Characteristics of patients included in the mucosal studies. Colonoscopic biopsies were obtained. Total RNA and/or LPMNCs were isolated

	Control	Crohn's disease
<i>N</i>	10	23
Age (years)	68.7 (45–85)	38.7 (22–73)
Gender (M/F)	5/5	12/11
Duration of CD	n.a.	7.8 years
Location of disease*	n.a.	2/16/5
Location of inflamed biopsy†	n.a.	2/21

\* Ileal/ileocolonic/colonic.

† Ileum/ colon.

known underlying acute or chronic pathological condition served as control donors for the various experiments. A total of 34 Crohn's patients (13 inactive late disease, 9 early active disease and 12 late active disease) were included in the study (Table 1). Intestinal biopsies were obtained from 33 individuals who underwent a colonoscopy (see Table 2 for patient characteristics) and were then used for RNA and/or lamina propria mononuclear cell isolation.

This study was approved by the Ethics Committee at the Hospital Clínic de Barcelona, and samples were drawn after obtaining a written consent from donors.

### Whole blood cell cultures

Peripheral blood was harvested in heparinized tubes and diluted (1:4) in complete medium (CM): RPMI

supplemented with 10 µg/mL gentamicin (BioWhittaker, Lonza, Barcelona, Spain), 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin and 250 ng/mL amphotericin B (BioWhittaker, Lonza). Diluted blood (600 µL) was incubated in 24-well plates for 18 h. Blood sample was centrifuged and supernatants were frozen at –80 °C for later analysis.

### Intracellular staining of cytokine production

Peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) were separated by Ficoll-Hypaque (Sigma, Madrid, Spain) density-gradient centrifugation. In initial experiments, PBMNCs were re-suspended in CM at  $1 \times 10^6$  cells/mL and activated with PMA/ionomycin (Sigma; 25 ng/mL and 1 µg/mL respectively) for 4 h in the presence of 10 µg/mL Brefeldin A (Sigma). Cells were washed, fixed, permeabilized and stained using Fix & Perm reagents (Caltag, Invitrogen, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's protocol. In later experiments, CD4<sup>+</sup> T cells were purified from PBMNCs using magnetic beads coupled with anti-human CD4 antibodies (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). CD4<sup>+</sup> T cells (>98% purity as detected by flow cytometry) were cultured for 6 days in RPMI medium containing 10% foetal calf serum (BioSera; Ringmer, UK) and 100 U/mL IL-2 (eBioscience, San Diego, CA, USA), and were then activated with PMA/ionomycin for the final 4 h in the presence of Brefeldin A. Cells were fixed and permeabilized as described above. For staining of intracellular cytokines, the following mAbs were used: FITC-anti-IFN-γ mAb; FITC, PE or Alexa Fluor 647-conjugated anti-IL-17A; Alexa Fluor

647-anti-TNF- $\alpha$ ; Alexa Fluor 647-anti-IL-21; FITC-anti-IL-6 (all from eBioscience) and PE-anti-IL-22, from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). After washing, cells were fixed with 0.1% paraformaldehyde and analysed using a FACSCantoII cytometer and FACS Diva software (BD, Madrid, Spain).

### Isolation of lamina propria mononuclear cells

Lamina propria mononuclear cells (LPMNC) were isolated using a modification of a previously described technique.<sup>21</sup> In brief, inflamed and non-inflamed biopsies were incubated for 30 min at room temperature with 1 or 5 mM dithiothreitol (Sigma) respectively. Following incubation, biopsies were washed three times for 30 min with 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (Promega, Madison, WI, USA). Biopsies were then cultured overnight at 37 °C in RPMI containing 10% FCS and 250 U/mL penicillin, 250 U/mL streptomycin and 625 ng/mL amphotericin B (Bio-Whittaker, Lonza). During culture, LPMNCs migrated out of the biopsy and were easily separated from the remaining tissue. Isolated LPMNCs were counted and activated with PMA/ionomycin in the presence of Brefeldin A for 4 h. Intracellular cytokine staining was performed as described above for peripheral CD4<sup>+</sup> cells.

### Activation of CD4<sup>+</sup> T cells and cytokine secretion

To study cytokine secretion, peripheral CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with or without pre-coated anti-CD3 (1  $\mu$ g/mL) and soluble anti-CD28 antibodies (1  $\mu$ g/mL) (BD) in the presence or absence of rhIL-12 (1 ng/mL) (eBioscience) or rhIL-23 (50 ng/mL) (R&D Systems) for 6 days at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. After stimulation, supernatants were collected and stored at -80 °C to determine cytokine concentration.

### ELISA for IL-17, IFN- $\gamma$ and IL-22

Cytokine concentrations in whole blood or CD4<sup>+</sup> cell culture supernatants were measured by ELISA. IL-17 was assayed using antibody pairs (eBioscience) with a detection limit of 15 pg/mL. For IFN- $\gamma$ , we used an ELISA kit (Mabtech, Nacka Strand, Sweden) with a detection limit of 31 pg/mL. IL-22 was assayed using a Duoset ELISA development kit (R&D Systems) with a detection limit of 31 pg/mL.

### RNA and real-time PCR

Total RNA was isolated from mucosal biopsies using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was transcribed to cDNA using a High-Capacity cDNA Archive RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and was used to perform quantitative real-time PCR in triplicate wells using a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-6 and GUS $\beta$  TaqMan primers and probes (Applied Biosystems). PCRs were performed using an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System sequence detection system. DeltaCts ( $\Delta$ Ct = Ct target gene - Ct housekeeping gene) were calculated for each gene and sample using GUS $\beta$  as a housekeeping gene. Fold-increase expression of target genes in Crohn's disease patients was determined relative to control patients ( $n = 5$ ) as  $2^{\exp(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ , where  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$  patient -  $\Delta\text{Ct}$  (average for controls).

### Statistical analysis

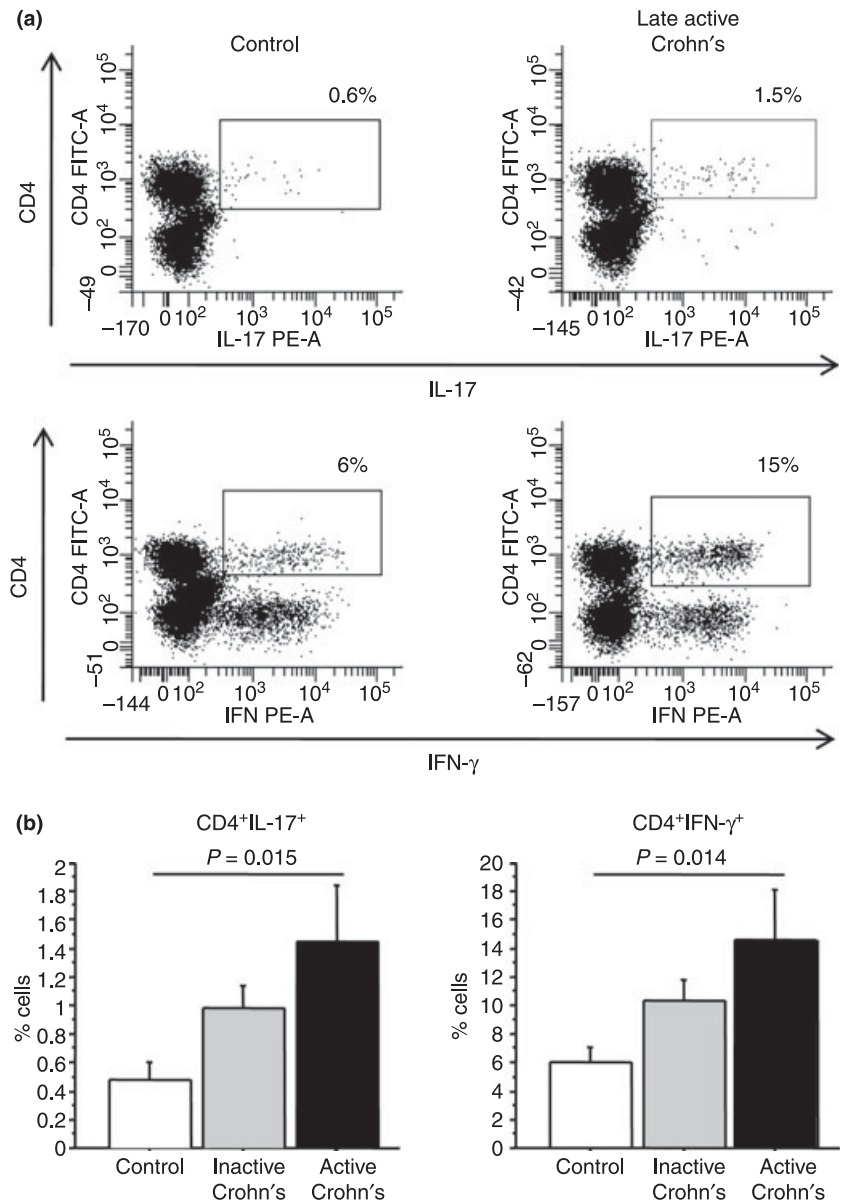
Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed using either a Mann-Whitney test or an ANOVA test with a post-hoc Bonferroni correction for multiple comparisons; in all cases, a value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### IL-17 production is increased in the blood and intestinal mucosa of active Crohn's disease

Serum IL-17 concentration has been shown to be elevated in IBD patients with clinical activity, suggesting that this cytokine plays a systemic role during active disease.<sup>15</sup> In our patient subset, IL-17 production was also significantly increased in un-stimulated whole blood cell cultures from active Crohn's disease patients ( $1720.1 \pm 779.7$  pg/mL,  $n = 7$ ) compared with either healthy individuals ( $115.4 \pm 94.6$  pg/mL,  $n = 10$ ;  $P = 0.0026$ ) or with Crohn's disease patients in remission ( $115.53 \pm 92.6$  pg/mL,  $n = 9$ ;  $P = 0.0031$ ; mean  $\pm$  SEM, Bonferroni test).

In freshly isolated un-fractionated PBMNC, CD4<sup>+</sup> cells were primarily responsible for IL-17 production, whereas IFN- $\gamma$  was generated by CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> populations (Figure 1a). In healthy controls, Th1 (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) cells represented about 6% (2.4–9.1%) of CD4<sup>+</sup> cells,



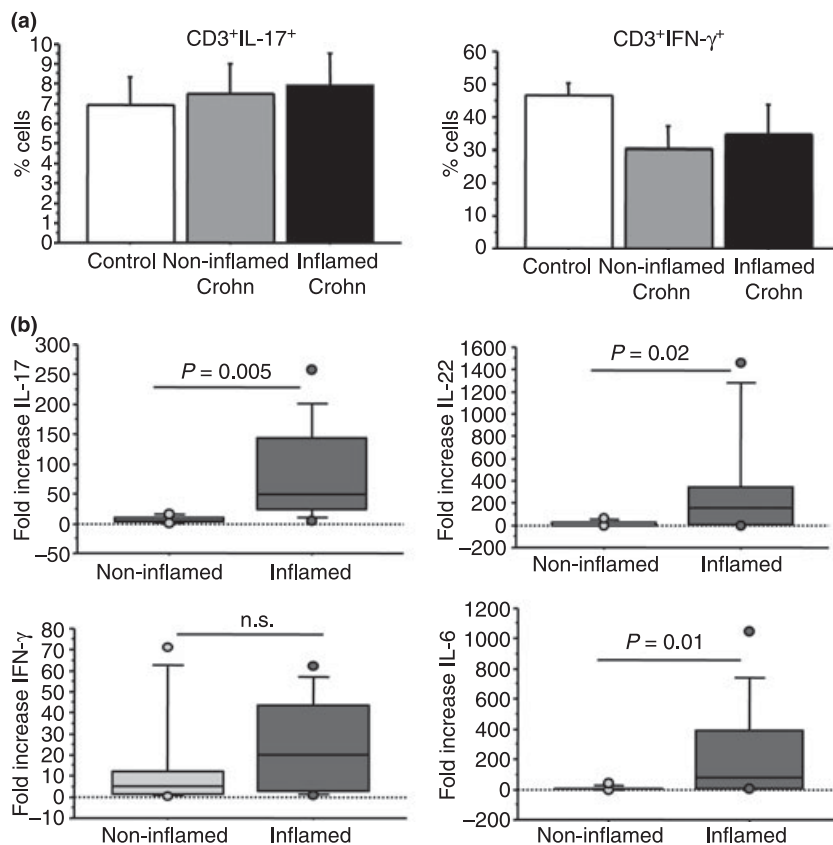
**Figure 1.** Th1 and Th17 cells are increased in the peripheral blood of active Crohn's disease. Total mononuclear cells from peripheral blood were isolated using a Ficoll gradient and stimulated with PMA/ionomycin for 4 h in the presence of Brefeldin A. Intracellular staining of IFN- $\gamma$  and IL-17 was performed in permeabilized and fixed cells. (a) Dot plots from one representative healthy individual and one late active Crohn's disease patient show the percentage of CD4<sup>+</sup> cells that stained for IL-17 and IFN- $\gamma$ . (b) The percentage of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> in total mononuclear cells isolated from the peripheral blood of healthy controls ( $n = 6$ ), inactive ( $n = 10$ ) and late active ( $n = 6$ ) Crohn's disease patients is shown.

whereas an average of 0.5% (0.2–0.9%) of CD4<sup>+</sup> cells were Th17 (IL-17<sup>+</sup>) (Figure 1b). The percentage of both IL-17<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> in whole PBMNC was significantly increased in clinically active Crohn's disease patients. Patients in remission (inactive Crohn's disease) showed slightly higher percentages of cytokine producing cells compared with healthy controls, although these differences did not reach statistical significance (Figure 1b).

In contrast to the relatively low numbers of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> in the periphery, we and others<sup>17, 22</sup> have observed a higher proportion of IL-17<sup>+</sup> cells in the intestinal mucosa (Figure 2a). This percentage, however, was not

significantly different among groups despite the presence of inflammation (Figure 2a). Similarly, the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in biopsies from healthy control mucosa was comparable to that of inflamed or non-inflamed biopsies from active Crohn's disease patients.

Despite the presence of cytokine-producing T cells in healthy intestinal mucosa, we observed marked differences in the transcription of key cytokine genes when compared with actively inflamed mucosal sites. Using quantitative real time-PCR, we calculated the fold variation of gene transcripts relative to a pool of healthy control mucosal samples. Fold changes of IL-17, IL-22, and IL-6 transcripts were significantly



**Figure 2.** Cytokine production in Crohn's disease inflamed mucosa. (a) The percentage of CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells, determined by flow cytometry, is shown for controls ( $n = 8$ ) and Crohn's disease lamina propria mononuclear cells from inflamed and non-inflamed areas ( $n = 8$ ). (b) Increased IL-17, IL-22 and IL-6 transcription in inflamed mucosal biopsies. Fold change in IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-22 and IL-6 transcription levels was determined by Taqman real-time PCR using GUS $\beta$  as an endogenous control. The fold change in inflamed and non-inflamed Crohn's disease mucosa relative to control samples is shown.

higher in inflamed Crohn's disease biopsies compared with non-inflamed ones. In the same group of patients, however, we detected no significant changes in IFN- $\gamma$  mRNA.

Overall, our results show an increase in IL-17 secretion in whole blood cell cultures as well as a higher percentage of CD4<sup>+</sup> IL-17-producing cells in active Crohn's disease patients. In the intestinal mucosa of these patients, we observed significantly elevated fold changes in IL-17 mRNA despite comparable percentages of IL-17<sup>+</sup> cells.

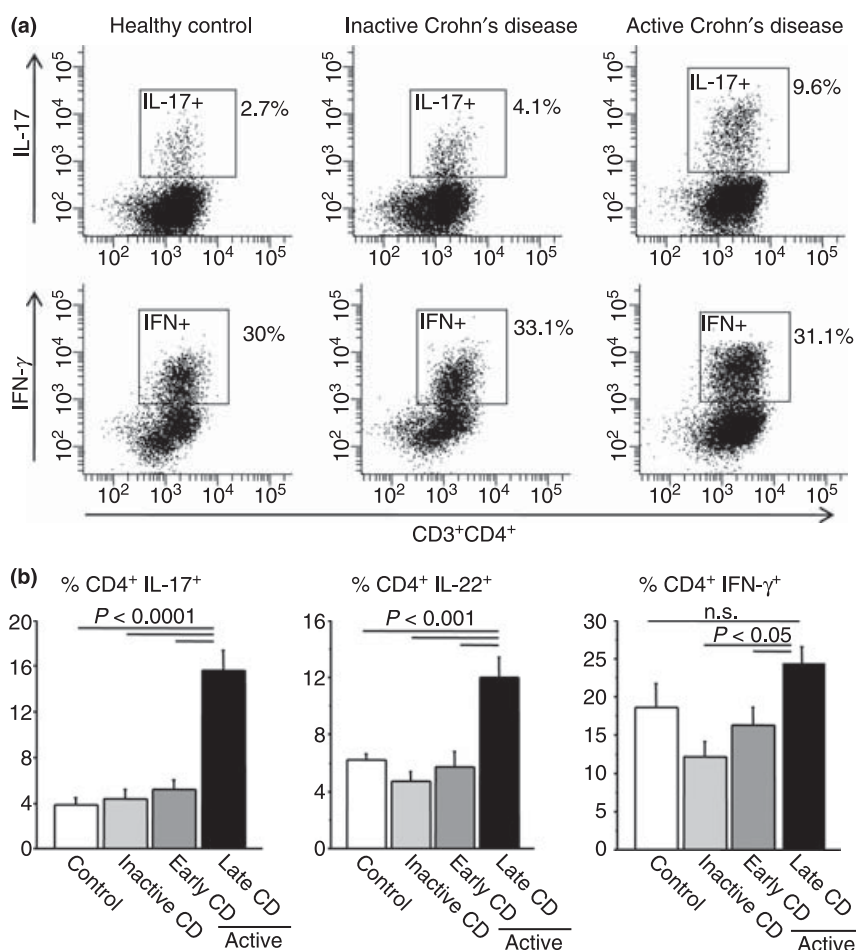
#### Increased cytokine production by peripheral CD4<sup>+</sup> cells

Given the increased percentage of CD4<sup>+</sup> IL-17-producing cells in active Crohn's disease patients, we isolated and cultured peripheral CD4<sup>+</sup> cells from healthy individuals, as well as from inactive and active Crohn's disease patients. After 6 days in culture, we measured both the percentage of cytokine positive CD4<sup>+</sup> cells and the cytokine concentration of culture supernatants. We observed about a 10-fold increase in the number of Th17 cells in all groups, suggesting that

these cytokine-producing cells can expand during culture (representative plots are shown in Figure 3a). An increase in Th1 cells was also observed during culture although of a lower magnitude (2–3 fold). As was seen in freshly isolated PBMNC, the percentages of both IL-17<sup>+</sup> cells and IL-22<sup>+</sup> were significantly higher in active Crohn's disease patients compared with healthy controls. Moreover, differences in the relative numbers of IL-17<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells reached also statistical significance when comparing active and inactive Crohn's disease patients (Figure 3b).

#### Early Crohn's disease patients exhibit low peripheral Th17 responses despite the presence of clinical activity

Our results thus far show an increased percentage of Th17 and Th1 cells in PBMNC, as well as an expansion in Th17 and Th1 cells in the CD4<sup>+</sup> cultures of active Crohn's disease patients. To understand further the biological importance of this T cell population in the periphery, we sought to determine whether these cytokine-producing cells were necessary for disease development. To this end, we included an additional



**Figure 3.** Th1 and Th17 cells are significantly increased in cultured CD4<sup>+</sup> cells from late active Crohn's disease. CD4<sup>+</sup> cells from the peripheral blood were cultured and intracellular cytokine production was measured using fluorescently labelled mAbs. (a) Dot plots represent CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells stained for IL-17 or IFN- $\gamma$  production in one representative individual of each specified group. (b) Bars represent the percentages of IL-17<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in healthy controls ( $n = 12$ ), inactive ( $n = 13$ ), active early ( $n = 9$ ), and active late ( $n = 12$ ) Crohn's disease patients.

group of patients with early Crohn's disease; i.e. patients with reported symptoms for less than 32 weeks (see Table 1 for patient characteristics). Strikingly, despite the presence of clinically active disease, the concentration of IL-17 in whole blood cells cultures of early active patients was significantly lower ( $74.99 \pm 61.88$  pg/mL,  $n = 6$ ) than that previously detected for late active patients ( $1720.1 \pm 779.7$  pg/mL,  $n = 7$ ;  $P = 0.0055$ ; Bonferroni test). In addition, the percentage of IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in unfractionated PBMNC was not significantly different between early active patients and healthy individuals (values for healthy controls are shown in Figure 1b; controls:  $0.48 \pm 0.12\%$ ,  $n = 6$  vs. early active Crohn's disease:  $1.02 \pm 0.34\%$ ,  $n = 6$ ;  $P = \text{N.S.}$ ; Bonferroni test). Consistent with these results, when we cultured isolated CD4<sup>+</sup> cells from early disease patients, the percentages of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>, and IL-22<sup>+</sup> cells were significantly lower than in late Crohn's disease (Figure 3b). None of the early patients was receiving immune suppressors at the time of the study, whereas 4 of the 12 patients

in the late disease group were under this treatment (Table 1). Nonetheless, the differences in cytokine production between early and late active Crohn's disease cannot be attributed solely to the medication administered. Remarkably, an even higher percentage of patients in the inactive late Crohn's disease group were receiving immunosuppressant treatment (8 out of 13) and, similar to early Crohn's disease patients, exhibited low Th17 responses.

As seen in Table 1 none of the early patients showed exclusive colonic disease, whereas between 20% and 35% of late patients (both active and inactive) did. Nonetheless, exclusion of all colonic cases from the analysis did not change any of the differences observed and therefore we concluded that disease location did not influence in our set of patients the phenotype here described.

Given these differences, we looked at gene expression profiles by real-time PCR in the involved and non-involved intestinal mucosa of the three available patients with early active disease. Significant

differences in mRNA-fold changes compared with healthy controls, between biopsies from non-involved and involved areas were detected for the IL-17 gene ( $3.6 \pm 1.08$  non-involved vs.  $18.44 \pm 5.8$  involved;  $P < 0.05$  Bonferroni test). Therefore, we have concluded that although IL-17 is upregulated in early intestinal lesions, the presence of exacerbated Th17/Th1 responses in peripheral blood is in fact a sign of late relapsing disease.

### Peripheral Th17 cells produce IL-22, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$

We then analysed the ability of Th1 and Th17 cells in early and late active Crohn's disease patients to produce additional key inflammatory cytokines simultaneously. We performed multiple-colour flow cytometry analysis and determined the percentage of double-positive cells (IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, and IL-17<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, as well as IL-21 and IL-6 producers). As previously described, 30–50% of IL-17<sup>+</sup> cells simultaneously produced IL-22,<sup>23</sup> whereas about 10% of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> were also IL-22<sup>+</sup> (data not shown). Moreover, a significant proportion (>80%) of IL-17 producers were also positive for TNF- $\alpha$ , while the percentage of IL-17<sup>+</sup> that co-produced IFN- $\gamma$  was lower by comparison (40%) (Figure 4a). This finding remained consistent among groups of individuals exhibiting no significant differences in the ability of IL-17<sup>+</sup> cells to produce other cytokines simultaneously; in fact, this was true either in controls or in Crohn's disease patients.

Nevertheless, consistent with an increase in the percentage of total IL-17<sup>+</sup> cells, late active Crohn's disease was also associated with a higher percentage of IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, and IL-17<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> double-producers compared with healthy controls, patients in remission or early active Crohn's disease (Figure 4b).

The percentage of IL-21-producing cells was low (1–1.5%). IL-21 has also been associated with IL-17 cells in murine,<sup>24</sup> but not in human cells.<sup>25</sup> In agreement with this observation, IL-21<sup>+</sup> cells did not significantly co-stain for IL-17 in our set of patients and only a small percentage of these cells proved to be IFN- $\gamma$  producers as well (Figure 4c). Staining for IL-6 (which is readily detectable in human T cells isolated from other tissues using the same staining protocol; Veny M and Salas A, unpublished results) proved barely detectable (<0.5%) in peripheral CD4<sup>+</sup> cells from all groups studied (Figure 4c).

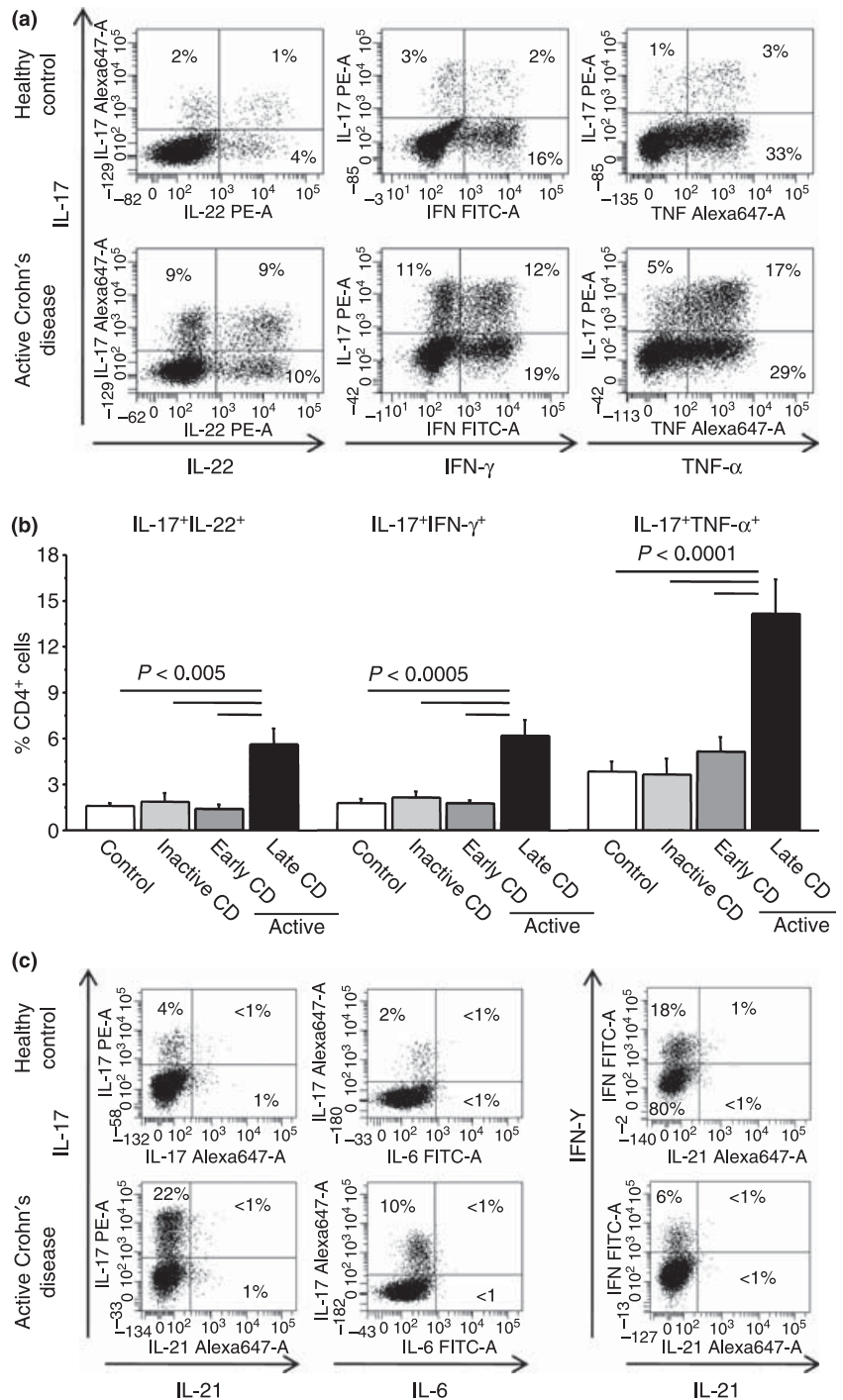
### Th17 cytokine production is increased in late, but not early, active Crohn's disease under either un-stimulated or stimulated conditions

Next, we sought to determine whether higher numbers of Th1 and Th17 cells translated into higher cytokine concentrations in the culture supernatants of CD4<sup>+</sup> cells under different stimulatory conditions. In the absence of polyclonal activation (un-stimulated conditions), and in agreement with the higher presence of IL-17<sup>+</sup> cells described here (Figure 3), we observed a significantly increased concentration of IL-17 in the culture supernatants of late active Crohn's disease patients compared with healthy controls, patients in remission (late inactive disease) or early active Crohn's disease (Figure 5a). Consistent with this finding, IL-22 followed a similar trend and was significantly higher in late active Crohn's disease than in healthy or inactive disease patients. In contrast, under the same culture conditions, IFN- $\gamma$  production remained comparable among groups and did not correlate with clinical activity or disease duration (Figure 5a, lower left panel).

In all groups, anti-CD3/anti-CD28 stimulation induced a significant increase in IL-17, IFN- $\gamma$  and IL-22 production in cell cultures of total CD4<sup>+</sup> cells compared with un-stimulated cells (paired *t*-test,  $P < 0.05$ ; mean cytokine production  $\pm$  S.E.M., as shown in Figure 5b). After activation, CD4<sup>+</sup> cells from late, but not early, active Crohn's disease patients still produced significantly higher amounts of IL-17 and IL-22 compared with healthy controls and patients in remission (Figure 5b). Production of IFN- $\gamma$  in response to anti-CD3/anti-CD28 stimulation, however, remained comparable in all groups studied.

Interleukin-12 can direct Th1 differentiation and induce IFN- $\gamma$  production. IL-23 has been proposed not only to drive human CD4<sup>+</sup> naïve cell differentiation towards a Th17 phenotype but also to stimulate the IL-17 production of already differentiated Th17 cells.<sup>26, 27</sup> To verify whether responses to IL-12 and IL-23 were altered in Crohn's disease patients, we stimulated isolated CD4<sup>+</sup> cells with aCD3/aCD28 antibodies in the presence of either one of these cytokines. As expected, IL-12 induced a marked IFN- $\gamma$  response in CD4<sup>+</sup> cells. This response was comparable in all groups studied independently of disease status (Figure 5c). Whereas the IL-17 response to IL-23 was more discrete, the increase in IL-17 production was also significant for all groups (paired *t*-test  $P < 0.05$ , Figure 5b,c), and the differences between late active





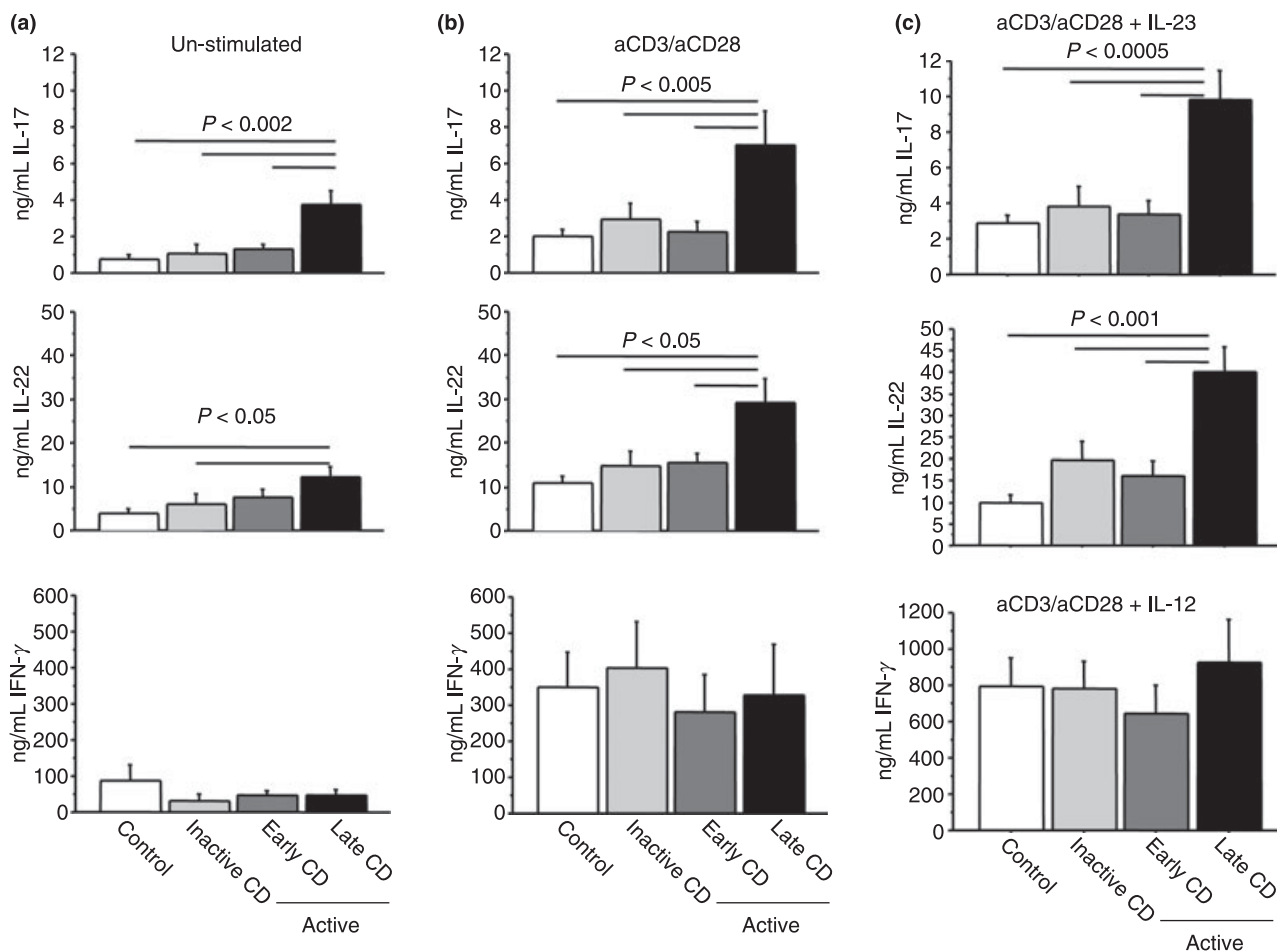
**Figure 4.** Th17 (IL-17<sup>+</sup>) cells can produce IL-22, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . CD4<sup>+</sup> cells from the peripheral blood were cultured and intracellular cytokine production was detected using fluorescently labelled mAbs. Dot plots represent CD4<sup>+</sup> cells co-stained for IL-17 and (a) IL-22, IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ . Results from one representative healthy control and one late active Crohn's disease patient are shown. (b) Bars represent the percentage of double-positive IL-17<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-17<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells in healthy controls ( $n = 7, 9$  and  $7$  respectively), inactive ( $n = 5, 8$  and  $6$  respectively), early active ( $n = 7, 9$  and  $6$  respectively) and late active ( $n = 11, 12$  and  $7$  respectively) Crohn's disease patients. (c) Dot plots represent the co-staining for IL-17 and two other cytokines, IL-21 and IL-6, that are barely detectable in these cells. Right panels show a better co-staining of IL-21 with Th1 cells than with Th17 cells.

Crohn's disease and all other groups remained constant under this stimulatory condition.

**DISCUSSION**

The contribution of cytokine-producing T cells to human intestinal pathology, both during the inducing and relapsing stages of Crohn's disease, is still

unknown. Cytokine-secreting lymphocytes, such as IFN- $\gamma$  and IL-17-producing CD4<sup>+</sup> cells, can be isolated from adult healthy human mucosa.<sup>19, 22</sup> However, during intestinal inflammation, an increase in the number of these cytokine-producing T cells, as well as their cytokine production in response to activation, has been described in Crohn's disease patients. In contrast to what we describe here, previous studies have



**Figure 5.** Th17 production in late active Crohn's disease is increased under basal and stimulated conditions. CD4<sup>+</sup> cells from peripheral blood were cultured for 6 days in the presence of isotype control IgG (un-stimulated conditions) or a-CD3/a-CD28 mAbs. Cytokine production in culture supernatant was measured by ELISA. (a and b) Mean production of IL-17, IL-22, and IFN- $\gamma$  is shown for each group of patients under the specified culture conditions, healthy controls ( $n = 12$ ), inactive ( $n = 13$ ), early active ( $n = 9$ ) and late active Crohn's disease ( $n = 12$ ). (c) IL-23 increases IL-17 production by stimulated CD4<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup> cells activated with a-CD3/a-CD28 mAbs were cultured with or without IL-12 or IL-23. Cytokine production in culture supernatant was measured by ELISA. Mean production of IL-17, in response to IL-23 or IFN- $\gamma$ , after IL-12 stimulation is shown for each group of patients. IL-23 induced a significant increase in IL-17 production whereas IL-12 caused CD4<sup>+</sup> cells to produce large amounts of IFN- $\gamma$ , in all study groups. IL-17 and IL-22, but not IFN- $\gamma$ , production was significantly higher in late active Crohn's disease under all conditions studied.

reported exacerbated IFN- $\gamma$  production by lamina propria T cells from active Crohn's disease patients compared with healthy controls.<sup>3, 5, 6</sup> However, these studies measured IFN- $\gamma$  production by T cells after stimulation with combinations of either anti-CD2 or anti-CD3, with anti-CD28 mAbs, or in the presence of PMA and anti-CD3 for 36 h, reporting increased IFN- $\gamma$  production by cells isolated from inflamed areas of Crohn's disease patients. Similar to our own findings, they nonetheless failed to detect any differences in IFN- $\gamma$  production among groups when cells were

cultured in the absence of activation. In a more recent study, surgical biopsies were assessed for IL-17 and IFN- $\gamma$  transcripts. Contrary to our results, they describe significant differences in IFN- $\gamma$ , but not IL-17, mRNA levels between active Crohn's disease patients and non-inflammatory controls.<sup>17</sup> It is important to point out that in contrast to the aforementioned study our biopsies were all harvested from patients undergoing colonoscopy to assess the extension and severity of their disease. All the samples included came from involved and non-involved areas of patients with clear

macroscopic inflammation. In contrast, most surgical specimens are obtained from patients undergoing resection for stricturing disease. The pro-inflammatory environment is most likely different in each case and that could also account for the observed differences. Overall, we have concluded that in our set of patients, biopsies from a macroscopically inflamed intestine present significantly increased IL-17, IL-22 and IL-6, but not IFN- $\gamma$  mRNA levels compared with non-involved areas of the same patient, strongly supporting the hypothesis that these cytokines play a predominant role in local intestinal responses.

In contrast to the cytokine transcription levels noted in inflamed mucosa, when we isolated LPMNC from freshly obtained endoscopic biopsies from these groups of patients, no significant differences in the percentage of IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells were detected. A previous study has shown higher IL17<sup>+</sup>, but not IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, cells in the intestinal lamina propria of Crohn's disease patients,<sup>22</sup> whereas another recent study reported no changes in Th17 cells when comparing the intestinal mucosa of active patients and healthy controls,<sup>17</sup> and a third still shows an increase in both IL17<sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells in the inflamed mucosa of both ulcerative colitis and Crohn's disease patients.<sup>18</sup> It therefore remains unclear whether the increase in IL-17 transcription in the intestinal mucosa of active Crohn's disease patients can be attributed to increased total numbers of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells, exacerbated production of IL-17 by these cells or even whether other cell types, such as CD68<sup>+</sup> macrophages, as previously suggested,<sup>15</sup> contribute to the overall IL-17 production observed in Crohn's disease inflamed mucosa.

In addition to showing a clear increase in mucosal IL-17 gene transcription in inflamed sites, we provided evidence of higher numbers of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> cells in the peripheral blood of active Crohn's disease patients. We demonstrated that Th17 responses are indeed exacerbated in peripheral blood during active established Crohn's disease. These results confirm and extend previous available information; however, the relevance of our studies resides, in our opinion, in the observation that exacerbated Th17 responses in peripheral blood are an exclusive feature of late active Crohn's disease and are not detected in a strictly selected group of patients with early Crohn's disease. In this group, we demonstrate that despite higher transcription levels of the IL-17 gene in inflamed areas of the mucosa, low IL-17 concentration in whole blood

cultures correlated with low CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells in total PBMNC and in cultured CD4<sup>+</sup> cells. Although still speculative, we propose a model to explain the discrepancy in early patients between local and systemic responses. In early stages of the disease, an increase in T cell activation takes place in mucosal sites (such as the intestinal lamina propria), but no increase in peripheral T cell responses is seen, as one would expect from a local immune response. However, we propose that as a result of this exacerbated response to intestinal antigens, memory T cells develop and after repeated flares, this population progressively expands and remains both in mucosal and peripheral sites. This would explain the presence of these cells only in late disease relapse.

Still unanswered is the biological significance of these potentially pro-inflammatory effector cells in the peripheral blood. Studies in murine models have demonstrated a colitogenic role for pre-formed memory T cells.<sup>28</sup> Importantly, colitogenic T cells (or cells capable of inducing colitis-like disease when transferred to lymphopenic hosts) have been identified not only in effector sites, such as in the intestinal lamina propria of colitic mice but also in the memory antigen-experienced compartment of peripheral blood.<sup>29, 30</sup> These results support the notion that once the disease is established, T cells both in mucosal and in peripheral pools may constitute a mechanism that could sustain the disease life-long.

In summary, we demonstrate that the transcriptional signature of the inflamed mucosa of late recurrent Crohn's disease patients shows a significant increase in IL-17, IL-22 and IL-6, but not in IFN- $\gamma$ . We also demonstrate a systemic Th17/Th1 response in the peripheral blood of late active Crohn's disease. Interestingly, patients with early signs of the disease showed normal systemic Th17/Th1 responses, in spite of increased IL-17 transcription in the involved inflamed mucosa. On the basis of our results, we have hypothesized that circulating effector and memory T cells may participate in disease persistence and we speculate that a possible explanation of the chronic and recurrent nature of the disease is the presence of a T cell memory subset.

## ACKNOWLEDGEMENTS

*Declaration of personal interests:* J. P. has served as a speaker and an advisory member of Abbott Laboratories, Novartis, Schering-Plough Laboratories and

UCB. Declaration of funding interests: This work was funded by grants SAF2005/03755 and BFU2008-02683/BFI to A.S. and SAF2006/03074 to J.P. from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. M.V. is the recipient of a FPI fellowship (SAF2005/03755) from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain.

M. E. is an employee of CIBER-Ehd, Spain. We thank Drs. Maria Esteve (Hospital Mutua de Terrassa, Barcelona), Montserrat Andreu (Hospital del Mar, Barcelona), Miquel Sans, Ingrid Ordas, and Montserrat Aceituno (Hospital Clínic de Barcelona) for patient recruitment and for editorial assistance.

## REFERENCES

- 1 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; **117**: 514–21.
- 2 Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; **3**: 390–407.
- 3 Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997; **150**: 823–32.
- 4 Monteleone G, Biancone L, Marasco R, *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1169–78.
- 5 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; **157**: 1261–70.
- 6 Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, *et al.* A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997; **159**: 6276–82.
- 7 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, *et al.* Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2069–79.
- 8 Oppmann B, Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; **13**: 715–25.
- 9 Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; **201**: 233–40.
- 10 Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; **278**: 1910–4.
- 11 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**: 1310–6.
- 12 Hue S, Ahern P, Buonocore S, *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; **203**: 2473–83.
- 13 Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, *et al.* IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 2006; **203**: 2485–94.
- 14 Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, *et al.* Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; **25**: 309–18.
- 15 Fujino S, Andoh A, Bamba S, *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; **52**: 65–70.
- 16 Schmidt C, Giese T, Ludwig B, *et al.* Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 16–23.
- 17 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, *et al.* IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; **57**: 1682–9.
- 18 Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, *et al.* Differential regulation of interleukin-17 and interferon-gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; **58**: 1629–36.
- 19 Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, *et al.* Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; **56**: 1696–705.
- 20 Travis SP, Stange EF, Lemann M, *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; **55**(Suppl 1): i16–35.
- 21 Mahida YR, Galvin AM, Gray T, *et al.* Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**: 377–86.
- 22 Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; **204**: 1849–61.
- 23 Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**: 2271–9.
- 24 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.
- 25 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, *et al.* Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; **128**: 687–94.
- 26 Volpe E, Servant N, Zollinger R, *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; **9**: 650–7.
- 27 Hoeve MA, Savage ND, de Boer T, *et al.* Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 661–70.
- 28 Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Totsuka T, Watanabe M, Hibi T. Persistent retention of colitogenic CD4(+) memory T cells causes inflammatory bowel diseases to become intractable. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **15**: 926–34.
- 29 Tomita T, Kanai T, Fujii T, *et al.* Continuous generation of colitogenic CD4(+) T cells in persistent colitis. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 1264–74.
- 30 Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 2003; **171**: 971–8.