

## Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal

J. Panés

Servicio de Gastroenterología. Institut Clínic de Malalties Digestives. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Hospital Clínic. Barcelona.

### INTRODUCCIÓN

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se caracterizan por la aparición de ulceraciones en la mucosa intestinal junto a un prominente infiltrado inflamatorio, que en el caso de la enfermedad de Crohn puede ser transmural. Este infiltrado está compuesto por linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas. El reconocimiento de que los leucocitos circulantes deben primeramente adherirse a las células endoteliales para después migrar hacia el foco inflamatorio y causar daño en la pared intestinal, ha conllevado un intenso esfuerzo para definir los factores que modulan las interacciones leucocito-endotelio. Uno de los principales focos de interés en este contexto ha sido la identificación y caracterización de las moléculas que permiten a los leucocitos adherirse a la pared vascular. El principal objetivo de esta revisión es el análisis de las moléculas que participan en el proceso de adhesión leucocito-endotelio y la consideración de los elementos moleculares y celulares implicados en esta interacción susceptibles de ser manipulados con una finalidad terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal.

### MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Tanto las moléculas de adhesión de la superficie endotelial como del leucocito participan en el establecimiento de una secuencia ordenada de interacciones que se establecen cuando el leucocito alcanza una vénula poscapilar, donde tiene lugar el proceso de adhesión leucocitaria. Inicialmente, se establece una interacción débil entre el leucocito y el endotelio que se manifiesta como un movimiento de rodamiento (*rolling*) del leucocito a lo largo de

la pared venular. Una proporción de los leucocitos que establecen interacciones de rodamiento se adhieren firmemente a la pared venular, donde tiene lugar el proceso de migración si existe un estímulo quimiotáctico adecuado (fig. 1). Cada uno de los tres estadios del reclutamiento leucocitario, rodamiento, adhesión firme y emigración transendotelial, conlleva la participación de familias diferentes de moléculas de adhesión que incluyen las selectinas y sus ligandos, las integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (tabla I).

### Selectinas

Las selectinas, designadas como L, P y E-selectina representan una familia de receptores expresados en los leucocitos (L), plaquetas y células endoteliales (P) o sólo en el endotelio (E)<sup>1</sup>. En contraste con las integrinas y con los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, la función de las selectinas se restringe únicamente al territorio vascular.

La L-selectina se expresa en los neutrófilos circulantes, monocitos y eosinófilos, y en la mayoría de linfocitos B y linfocitos T vírgenes. La L-selectina ha sido implicada en el proceso de adhesión de los neutrófilos con células endoteliales activadas, pero no con células endoteliales quiescentes, lo que indica que el ligando para L-selectina no se halla presente de forma constitutiva en las células endoteliales<sup>2</sup>. Las interacciones leucocito-endotelio dependientes de la L-selectina no requieren la activación de los leucocitos, ya que esta molécula se expresa constitutivamente. De hecho, la activación de los leucocitos por mediadores inflamatorios o citoquinas resulta en una disminución en la expresión de L-selectina en la membrana plasmática por desprendimiento (*shedding*) de esta molécula<sup>3</sup>.

La P-selectina se expresa en la superficie de las células endoteliales activadas y en plaquetas. Se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en los gránulos alfa de las plaquetas. La molécula es movilizada en pocos minutos hacia la superficie celular en res-

Correspondencia: Dr. J. Panés.  
Servicio de Gastroenterología.  
Institut Clínic de Malalties Digestives.  
Hospital Clínic.  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

(*Gastroenterol Hepatol* 1999; 22: 514-524)

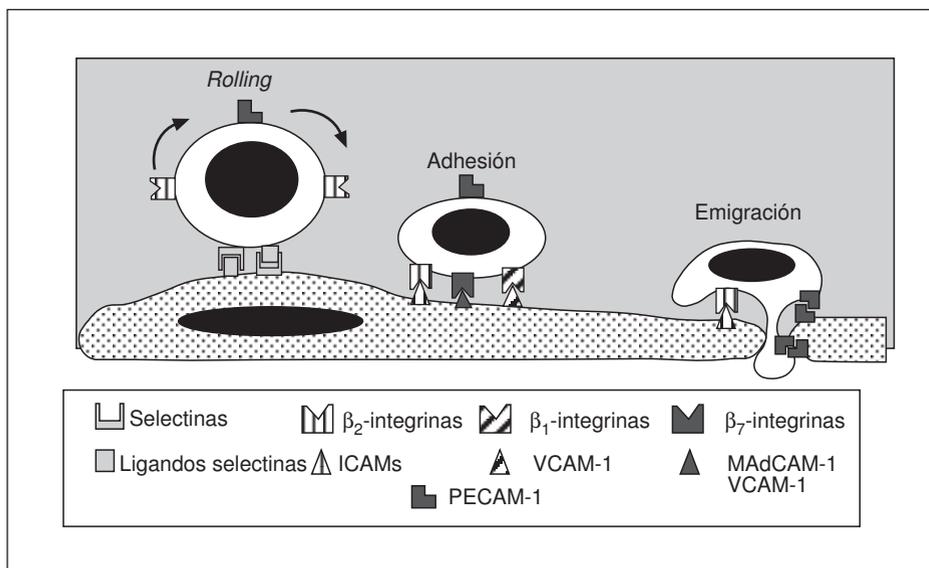


Fig 1. Representación esquemática de la secuencia de interacciones leucocito-entotelio en el proceso de adhesión. Se ilustran también las moléculas de adhesión que participan en cada fase de estas interacciones (rodamiento, adhesión, emigración).

TABLA I. Moléculas de adhesión implicadas en la interacción leucocito-entotelio

Molécula	Función	Localización	Expresión		Ligando
			Constitutiva	Inducible	
<i>Familia selectinas</i>					
L-Selectina	<i>Rolling</i>	Leucocitos	Sí	No, ↓ tras activación	P, E-selectina, Glycam, CD14, MAdCAM-1
P-Selectina	<i>Rolling</i>	Endotelio Plaquetas	Sí	Sí	L-selectina, PSGL-1, PSL
E-Selectina	<i>Rolling</i>	Endotelio	No	Sí	L-selectina, CLA, ESL, SSEA
<i>Familia integrinas</i>					
CD11a/CD18 (LFA-1)	Adhesión/ emigración	Leucocitos	Sí	No	ICAM-1, ICAM-2
CD11b/CD18 (Mac-1)	Adhesión/ emigración	Granulocitos Monocitos	Sí	Sí	ICAM-1, iC3b, Fb
CD11c/CD18	(?)	Granulocitos Monocitos	Sí	Sí	Fd, iC3b
CD49d/CD29 (VLA-4)	Adhesión	Linfocitos Monocitos Eosinófilos Basófilos	Sí	No	VCAM-1 Moléculas de la matriz extracelular
CD49d/ $\beta_7$	Adhesión	Linfocitos	Sí	No	MAdCAM-1 VCAM-1
<i>Superfamilia inmunoglobulinas</i>					
ICAM-1 (CD54)	Adhesión/ emigración	Endotelio Monocitos	Sí	Sí	LFA-1, Mac-1
ICAM-2 (CD 102)	Adhesión/ emigración	Endotelio	Sí	No	LFA-1
VCAM-1 (CD 106)	Adhesión	Endotelio Monocitos Linfocitos	No	Sí	VLA-1
MAdCAM-1	Adhesión emigración	Endotelio intestinal	Sí	Sí	L-selectina, CD49/ $\beta_7$
PECAM-1 (CD3 1)	Adhesión/ emigración	Endotelio Leucocitos Plaquetas	Sí	No	PECAM-1 (homofílica)

CLA: antígeno linfocítico cutáneo; ESL: ligando E-selectina; LFA: antígeno asociado a función linfocítica; PSL: ligando P-selectina; SSEA: antígeno embrionario sialil estadio específico.

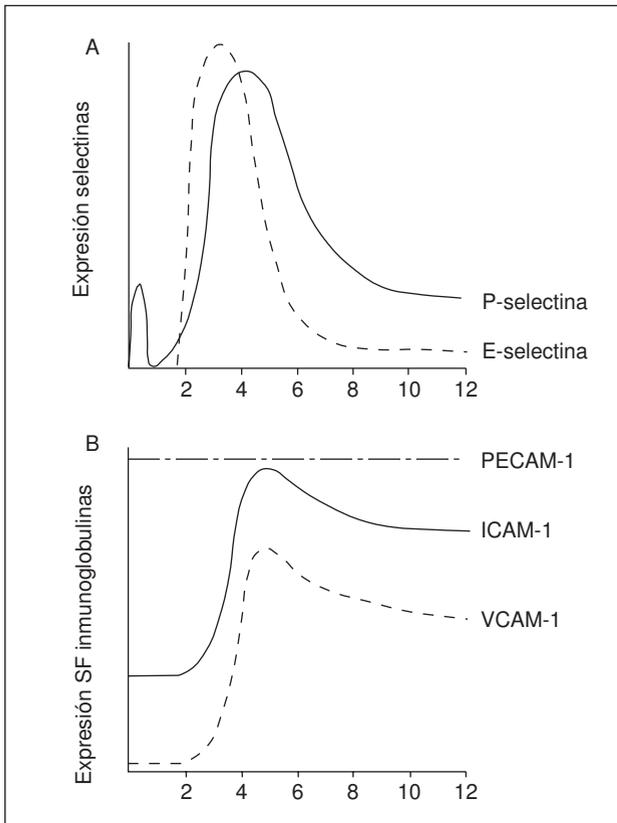


Fig. 2. Cinética de expresión de las moléculas de adhesión endoteliales. A) El rápido incremento en la expresión de P-selectina es inducida por la unión de la histamina a los receptores H<sub>1</sub> de las células endoteliales. La elevación más prolongada de la expresión de P-selectina y la expresión de E-selectina está inducida por la exposición a endotoxina. B) Expresión de ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 tras la estimulación con TNF- $\alpha$ . (Tomada de Eppihimer et al<sup>4</sup> y Henninger et al<sup>28</sup>.)

puesta a la activación. Posteriormente, puede ser reciclada hacia el interior de la célula o se desprende y libera al plasma<sup>1</sup>. Las células endoteliales pueden también sintetizar P-selectina tras la estimulación con endotoxina o citoquinas, lo que resulta en un segundo pico de expresión a las 4-5 h de la estimulación<sup>4</sup> (fig. 2).

En contraste con la P-selectina, la expresión de E-selectina se halla completamente bajo control transcripcional. La E-selectina no se expresa constitutivamente en las células endoteliales, su síntesis (y expresión) puede ser inducida por citoquinas como la interleuquina (IL)-1 o el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ <sup>5</sup>. La expresión de E-selectina se detecta a las 2 h tras la estimulación con endotoxina y regresa a valores basales a las 8 h<sup>4</sup> (fig. 2).

### Ligandos de las selectinas

Se trata de una familia de moléculas de adhesión de tipo mucina que ha sido caracterizada recientemente<sup>1,6</sup>. Las

mucinas son proteínas ricas en serina y treonina con un alto grado de O-glicosilación por carbohidratos sulfatados, que son los mediadores de la unión con los ligandos<sup>1</sup>. Estas proteínas altamente glicosiladas contienen los tetrasacáridos sLex, sLea, o sus formas sulfatadas que tienen actividad de ligando para las tres selectinas<sup>7</sup>.

Se han aislado dos ligandos de la L-selectina expresados en las células endoteliales: GlyCAM-1 y CD34<sup>8,9</sup>. Un tercer receptor, la MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) tiene una función dual ya que también se une a las integrinas  $\alpha_4$ <sup>10,11</sup>. Se han descrito dos ligandos de la P-selectina que corresponden a sialoproteínas expresadas en la superficie de los leucocitos: el ligando glicoproteico-1 de la P-selectina (PSGL-1)<sup>12</sup> y un ligando de 120-kDa<sup>13</sup>. Se han aislado también ligandos específicos para la E-selectina<sup>14</sup>.

### Integrinas

Las integrinas son proteínas heterodiméricas formadas por la unión no covalente de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Aunque se conocen 15 tipos de cadenas  $\alpha$  y 8  $\beta$ , los leucocitos expresan 13 integrinas que pertenecen únicamente a las subfamilias  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_7$ . Las integrinas de la subfamilia  $\beta_2$  están formadas por una subunidad  $\beta$  común (CD18) unida a una de tres posibles subunidades  $\alpha$  designadas, CD11a, CD11b y CD11c. Aunque la expresión de las integrinas  $\beta_2$  se halla restringida a los leucocitos, la distribución de las subclases de integrinas  $\beta_2$  difiere entre las distintas poblaciones leucocitarias. Los linfocitos periféricos expresan primariamente CD11a/CD18, mientras que los neutrófilos, monocitos y células *natural killer* expresan los tres tipos de integrinas  $\beta_2$ . La integrina CD11a/CD18 interacciona con ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) y con ICAM-2<sup>15</sup>, mientras que CD11b/CD18 interacciona primordialmente con ICAM-1; el ligando de CD11c/CD18 no ha sido definido<sup>16</sup>.

Una segunda subfamilia de integrinas combina la cadena  $\beta_1$  (CD29) con diversas subunidades  $\alpha$ . La integrina  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) interviene en la adhesión de los linfocitos, monocitos, eosinófilos y células *natural killer*, con células endoteliales activadas<sup>17</sup>. Los ligandos de VLA-4 incluyen VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*)<sup>18</sup>, y componentes de la matriz extravascular como la fibronectina<sup>19</sup>.

La subfamilia de las integrinas  $\beta_7$  poseen una interesante función. El heterodímero  $\alpha_4\beta_7$  se expresa en una subpoblación de linfocitos que colonizan el intestino y el tejido linfoide asociado a éste<sup>20</sup>. Este heterodímero reconoce el ligando endotelial expresado en tejidos del tracto digestivo MAdCAM-1<sup>21</sup>. Además de unirse a MAdCAM-1 la integrina  $\alpha_4\beta_7$  se une también a VCAM-1<sup>22</sup>. Mientras que las interacciones de  $\beta_7$  con MAdCAM-1 son esenciales para la recirculación de linfocitos en el tejido intestinal en condiciones normales, la unión  $\beta_7$ /VCAM-1 parece tener lugar sólo en condiciones de inflamación.

## Superfamilia de las inmunoglobulinas

Este grupo de moléculas de adhesión está constituido por elementos que contienen múltiples dominios tipo inmunoglobulina. Cinco miembros de esta familia intervienen en las interacciones leucocito-endotelio: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MAdCAM-1 y PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*).

ICAM-1 reconoce a CD11a/CD18<sup>23</sup> y CD11b/CD18<sup>24</sup>. ICAM-1 se expresa en condiciones basales en leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. La activación del endotelio con citoquinas o LPS induce un aumento de expresión de ICAM-1<sup>25</sup>, pero la magnitud de este incremento varía en distintos territorios vasculares<sup>26-28</sup>. Los órganos del tracto gastrointestinal presentan un marcado incremento en la expresión de ICAM-1 tras la estimulación con endotoxina o TNF- $\alpha$ , con un pico de expresión a las 5-9 h y un incremento mantenido más allá de las 24 h tras la estimulación (fig. 2)<sup>26,28</sup>. La importancia fisiológica del aumento de expresión de ICAM-1 ha quedado patente en diversos estudios que demuestran que dichos aumentos se asocian a valores máximos de adhesión de leucocitos al endotelio<sup>29</sup>.

ICAM-2 es una forma truncada de la molécula ICAM-1<sup>30</sup> que posee un lugar de unión para CD11a/CD18. Al igual que ICAM-1, ICAM-2 se expresa basalmente en las células endoteliales, pero la expresión de ICAM-2 no se modifica tras la estimulación del endotelio<sup>31</sup>. La afinidad de ICAM-2 para CD11a/CD18 es algo menor que la de ICAM-1<sup>32</sup>.

VCAM-1 es un importante modulador de la circulación de linfocitos y monocitos. VCAM-1 es un ligando para las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) y  $\alpha_4\beta_7$ <sup>18,22</sup>. VCAM-1 no se expresa en las células endoteliales en condiciones basales, pero su expresión resulta estimulada por citoquinas o endotoxina<sup>28</sup>, con una cinética parecida a la de ICAM-1 (fig. 2).

La adhesina mucosa MAdCAM-1 se expresa principalmente en venas endoteliales altas de las placas de Peyer, y en vénulas del intestino delgado y del colon<sup>33</sup>. MAdCAM-1 actúa como ligando para L-selectina y para la integrina  $\alpha_4\beta_7$ , las cuales se hallan implicadas en el reclutamiento fisiológico de linfocitos hacia las placas de Peyer y hacia el tejido intestinal en el proceso de inflamación<sup>10,22</sup>.

PECAM-1 es un mediador de la adhesión de leucocitos y plaquetas a las células endoteliales e interviene también en el subsiguiente paso de migración de los leucocitos hacia el espacio intersticial<sup>34</sup>. Esta molécula de adhesión se expresa constitutivamente en plaquetas, leucocitos y células endoteliales, y el nivel de expresión no cambia de forma apreciable tras la estimulación con citoquinas<sup>35</sup>.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La expresión inducible de genes es un importante mecanismo de regulación de la respuesta celular que requiere

la participación de proteínas activadoras cuya unión al ADN y actividad transcripcional son inducidas por estímulos específicos. De los múltiples factores de transcripción que se han descrito, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y la proteína de activación 1 (AP-1) desempeñan un papel especialmente relevante en la regulación de los genes implicados en la respuesta inflamatoria. Ambos factores corresponden a familias de polipéptidos con similar capacidad para unirse al ADN pero con distinto potencial transactivador.

El NF- $\kappa$ B es un factor inducible de las células eucariotas, compuesto por dos subunidades correspondientes a miembros de la familia Rel/NF- $\kappa$ B. En condiciones basales, los dímeros de NF- $\kappa$ B se hallan secuestrados en el citoplasma por la unión con proteínas inhibitoras de la clase I $\kappa$ B. Estas proteínas inhibitoras impiden el transporte de NF- $\kappa$ B hacia el núcleo y su unión al ADN. Los estímulos que activan NF- $\kappa$ B (p. ej., endotoxina, TNF- $\alpha$ ) inducen una fosforilación de I $\kappa$ B y la conjugación de esta proteína con ubiquitina, que es subsiguientemente degradada por el proteasoma. Todo esto conduce a la liberación de NF- $\kappa$ B y su entrada en el núcleo donde activa la expresión génica<sup>36</sup>. Se ha observado que los fármacos inhibidores del proteasoma bloquean la degradación de I $\kappa$ B y la consecuente activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a la estimulación con TNF- $\alpha$ .

AP-1 es otro factor de transcripción compuesto por homó y heterodímeros de los productos de los proto-oncogenes *jun* y *fos*<sup>37</sup>. La actividad AP-1 se induce en respuesta a muchos estímulos, incluyendo ésteres forbol (que activan la proteincinasa C), hormonas polipeptídicas, citoquinas y peróxido de hidrógeno<sup>38</sup>.

Se han identificado lugares de unión para NF- $\kappa$ B en la región promotora de los genes de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. En la región promotora de esta última molécula se ha hallado también un lugar de unión para AP-1. Las mutaciones que disminuyen la unión de NF- $\kappa$ B a los elementos tienen como consecuencia un menor aumento de expresión de E-selectina en respuesta a la estimulación con citoquinas, lo que sugiere que NF- $\kappa$ B desempeña un papel primordial en la inducción del gen de la E-selectina<sup>39</sup>. Se han hallado también dos elementos funcionales  $\kappa$ B en la región promotora de MAdCAM-1<sup>40</sup>. Recientemente, se ha demostrado que los inhibidores de la degradación de I $\kappa$ B por el proteasoma disminuyen la acumulación nuclear de NF- $\kappa$ B e inhiben la expresión de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales<sup>41</sup>. Esta inhibición tiene importantes consecuencias funcionales ya que los inhibidores del proteasoma también bloquean la adhesión de leucocitos a células endoteliales en cultivo.

La presencia de activación de NF- $\kappa$ B ha sido un hallazgo uniforme en diversos modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo la colitis inducida por TNBS, la colitis asociada a la deficiencia genética de IL-10<sup>42</sup> y la colitis inducida por peptidoglicano/polisacárido<sup>43</sup>.

Asimismo, se ha demostrado activación de NF- $\kappa$ B en la enfermedad inflamatoria intestinal humana<sup>42,44-46</sup>. La acti-

vación de NF- $\kappa$ B se halla restringida a las áreas con inflamación activa, tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa<sup>44,46</sup>. En la enfermedad inflamatoria intestinal activa se ha demostrado que la activación de NF- $\kappa$ B se produce en células mononucleares de la lámina propia y en las células epiteliales<sup>44,45</sup>.

### EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Estudios basados en inmunohistoquímica han demostrado un aumento de expresión de varias moléculas de adhesión endoteliales en tejido intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal activa. Sin embargo, no existe un acuerdo sobre cuál es este patrón de activación. Algunos estudios han hallado un aumento en la expresión de ICAM-1 y E-selectina<sup>47,48</sup>, mientras que otros han observado únicamente un incremento en la expresión de E-selectina, sin cambios en los valores de ICAM-1 en relación a los controles<sup>49,50</sup>. Estos hallazgos contradictorios pueden ser debidos a las limitaciones de la inmunohistoquímica para cuantificar la expresión de moléculas de adhesión. Otra evidencia que implica el incremento en la expresión de E-selectina en la patogenia de la EII se ha obtenido utilizando la gammagrafía; tras la inyección de un anticuerpo monoclonal anti-E-selectina marcado se observa una acumulación del trazador en las áreas con enfermedad activa<sup>51</sup>. Se ha documentado también un incremento en la expresión de P-selectina en vénulas y capilares de las áreas con inflamación en piezas de resección de pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa<sup>52</sup>.

La evaluación por inmunohistoquímica de la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria ha demostrado que la expresión de VCAM-1 es similar a la de los controles<sup>47,49,50</sup>. Un reciente estudio ha demostrado también que la proporción de endotelio venular de la lámina propia que expresa MAdCAM-1 está aumentado en los focos inflamatorios de los pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, en comparación con el tejido normal<sup>53</sup>. La existencia de una activación del endotelio en las áreas de inflamación intestinal en los pacientes con EII se ve confirmada en un estudio reciente que describe un marcado incremento de la capacidad del endotelio de las áreas de mucosa inflamada para inducir una adhesión de los leucocitos, en comparación con el endotelio de individuos normales<sup>54</sup>. Además, se ha demostrado que los sobrenadantes de los cultivos de mucosa intestinal de pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn inducen un incremento en la expresión de E-selectina e ICAM-1 de células endoteliales humanas en cultivo<sup>55</sup>.

Se ha considerado que los valores circulantes de las formas solubles de moléculas de adhesión reflejan el grado de expresión de proteína en la membrana de la célula endotelial, y por ello se han utilizado determinaciones de moléculas de adhesión solubles para monitorizar la actividad inflamatoria, sobre todo en estudios clínicos. En tres de estos estudios se han hallado concentraciones aumentadas de ICAM-1 soluble (sICAM-1) sVCAM-1 y sP-se-

lectina en pacientes con colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn<sup>56-58</sup>. En otro estudio se halló un incremento de las concentraciones de ICAM-1 sólo en pacientes con colitis ulcerosa, mientras que en la enfermedad de Crohn activa éstas fueron normales, al tiempo que la concentración plasmática de sVCAM-1 estaba significativamente aumentada<sup>59</sup>. Los resultados de las determinaciones de valores de sE-selectina han sido discrepantes, aumentados en unos estudios y normales en otros<sup>58,59</sup>. Recientemente, la utilidad de sICAM-1 como marcador sistémico de la expresión endotelial de ICAM-1 ha sido cuestionada en función de dos observaciones: a) tanto las células endoteliales humanas como murinas poseen ARNm que codifica específicamente sICAM-1<sup>60,61</sup>, y b) la cinética de aparición y desaparición de sICAM-1 en plasma en respuesta a la administración de TNF- $\alpha$  difiere de la cinética de expresión de ICAM-1 en la célula endotelial del pulmón, intestino y otros órganos<sup>62</sup>.

Por lo que se refiere a las moléculas de adhesión leucocitarias, se ha hallado un aumento en la expresión de CD18 e ICAM-1 en monocitos periféricos de pacientes con enfermedad de Crohn, pero no en la colitis ulcerosa<sup>63</sup>. Las células mononucleares circulantes de los pacientes con enfermedad de Crohn forman agregados granulomatosos cuando se cultivan *in vitro*. La formación de estos agregados, que se correlaciona con el grado de actividad clínica, parece depender de la función de CD11b/CD18 e ICAM-1<sup>64,65</sup>. Estudios inmunohistoquímicos de biopsias de mucosa intestinal han demostrado un marcado incremento en la expresión de integrinas  $\beta_2$ <sup>66</sup>, con expresión de CD11a/CD18 en las células mononucleares y CD11b/CD18 en los neutrófilos; se ha hallado también un incremento de ICAM-1 en los linfocitos, existiendo un paralelismo entre esta expresión y la intensidad de la inflamación<sup>48,67</sup>.

El reciente desarrollo de un método preciso para cuantificar la expresión de moléculas de adhesión endoteliales *in vivo*, basado en el uso de anticuerpos marcados<sup>26</sup>, ha permitido caracterizar la expresión de moléculas de adhesión en diversos modelos animales de colitis. De esta forma se ha detectado un marcado incremento de la expresión de VCAM-1 en la colitis inducida por TNBS o por peptidoglicano/polisacárido<sup>43,68</sup> (fig. 3), así como en la colitis que aparece en ratones genéticamente deficientes en IL-10<sup>69</sup>. En estos modelos experimentales la expresión de ICAM-1 no aumenta de forma apreciable, mientras que se detecta un constante incremento de MAdCAM-1, de magnitud similar al de VCAM-1. El aumento de expresión de MAdCAM-1 en células endoteliales se ha constatado también en ratones deficientes en IL-2, cuando los animales desarrollan colitis a partir de los 35 días de vida<sup>70</sup>.

La discrepancia más destacable en la expresión de moléculas de adhesión entre estos modelos animales y los estudios en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal es el incremento de VCAM-1 en los modelos experimentales. Esta diferencia puede tener importancia en la práctica, ya que estos modelos experimentales están siendo ampliamente utilizados en el estudio de la fisiopa-

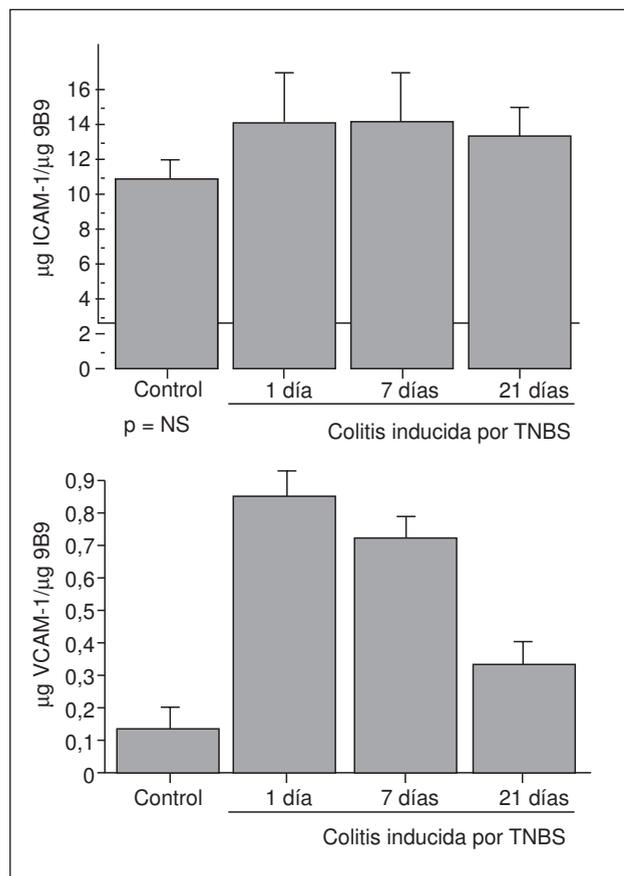


Fig. 3. Expresión de ICAM-1 (panel superior) y VCAM-1 (panel inferior) corregido por superficie endotelial en ratas control y colíticas a diferentes tiempos tras la inducción de colitis por TNBS. La superficie endotelial se determinó por la unión del anticuerpo anti-enzima conversiva de la angiotensina (9B9), la expresión de ICAM-1 por la unión del anticuerpo anti-ICAM-1 1A29, y la de VCAM-1 por la unión del anticuerpo anti-VCAM-1 5F10. Los resultados se expresan como µg ICAM-1/µg 9B9 y µg VCAM-1/µg 9B9. \* $p < 0,01$  frente a control. (Tomada de Sans et al<sup>68</sup>.)

toología y el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas para la enfermedad inflamatoria humana. De todas formas, no se puede excluir la existencia de un incremento en la expresión de VCAM-1 en la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa hasta que dispongamos de técnicas más sensibles para el estudio de la expresión de moléculas de adhesión endoteliales en la enfermedad humana. En este sentido es de destacar que un estudio reciente realizado en células endoteliales microvasculares intestinales ha demostrado que en condiciones basales existe expresión ICAM-1 y no de VCAM-1, pero se produce un marcado incremento en la expresión de ambas moléculas de adhesión tras la estimulación de estas células endoteliales con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o endotoxina<sup>71</sup>, y los valores de todos estos factores se hallan incrementados en la enfermedad inflamatoria intestinal humana.

## MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

### Modulación de la síntesis de moléculas de adhesión

Un elemento importante en el tratamiento de la inflamación basado en la modulación de las interacciones leucocito-endotelio es la regulación de la síntesis de moléculas de adhesión. La modulación farmacológica de este proceso tiene el potencial de ejercer un potente efecto inhibitorio en el proceso de reclutamiento leucocitario. Se han utilizado diversas estrategias para inhibir la biosíntesis de moléculas de adhesión endoteliales; algunas de éstas han recibido una considerable atención últimamente y parecen muy prometedoras.

#### Glucocorticoides y aminosalicilatos

La modulación de la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B es uno de los aspectos básicos de la acción de varios de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo los corticoides y aminosalicilatos. Los glucocorticoides activan el receptor glucocorticoide (GR) en el citoplasma formándose entonces homodímeros GR-GR que se unen a una secuencia específica del ADN denominada elemento de respuesta a los glucocorticoides (GRE). Esta unión tiene como consecuencia la activación de la transcripción de los genes que poseen un elemento GRE en la región promotora. Además de esta regulación positiva de la expresión génica, los glucocorticoides inhiben la expresión de una amplia gama de genes implicados en la respuesta inflamatoria.

Uno de los principales descubrimientos que ha facilitado la comprensión del mecanismo de acción de los corticoides ha sido la demostración de que el GR activado por su unión específica con el glucocorticoide inhibe la transcripción inducida por AP-1 y NF- $\kappa$ B<sup>72</sup>. Así, se ha observado que los glucocorticoides inhiben la acción activadora de NF- $\kappa$ B sobre la expresión de ICAM-1<sup>73</sup>, VCAM-1<sup>74</sup> y E-selectina<sup>75</sup>. Los glucocorticoides también inhiben la expresión de las colagenasas I y IV dependiente de AP-1<sup>76</sup>. Se han propuesto diversos mecanismos por los que los glucocorticoides pueden antagonizar la acción de NF- $\kappa$ B y AP-1. Uno de los más importantes es la interacción directa proteína-proteína que se establece entre el GR y NF- $\kappa$ B, evitando que tanto GR como NF- $\kappa$ B lleguen a interactuar con sus respectivos elementos de unión en el ADN<sup>77</sup> (fig. 4). De forma similar, la unión de GR a *jun* y *fos* produce una inhibición mutua de su unión al ADN<sup>78</sup>. Los glucocorticoides también inducen la transcripción de I $\kappa$ B. El incremento en la síntesis de esta proteína que se une a NF- $\kappa$ B activada impide que ésta llegue a interactuar con los elementos  $\kappa$ B del ADN. La proteína I $\kappa$ B induce también probablemente una disociación de NF- $\kappa$ B y los elementos  $\kappa$ B en los genes, movilizándolo de nuevo hacia el citoplasma<sup>79</sup>. Un reciente estudio demuestra que en la enfermedad inflamatoria intestinal humana

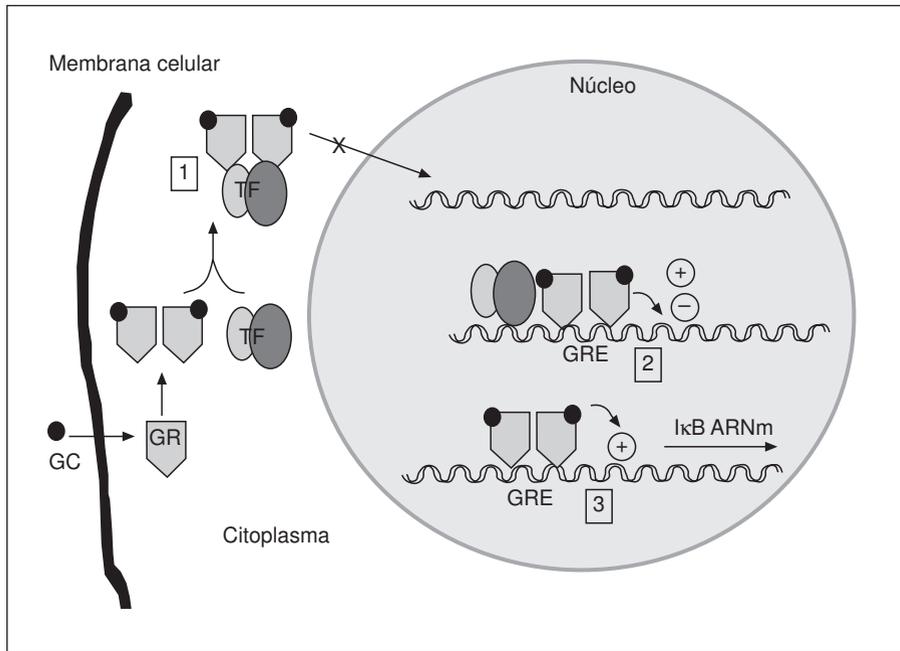


Fig. 4. Modulación de la transactivación génica por los glucocorticoides. 1) El glucocorticoide (GC) se une inicialmente al receptor de glucocorticoide (GR), tras lo cual se establece una interacción directa proteína-proteína entre el GR y el factor de transcripción (TF) en el citoplasma de la célula que impide la unión del TF a sus elementos de respuesta en el ADN. 2) La unión del GR activado a elementos respondedores a los glucocorticoides modula la transactivación inducida por el TF. 3) La unión del GR al promotor del gen *IκB* induce su transactivación; la unión de *IκB* a *NF-κB* impedirá la unión de este factor al ADN o inducirá el desplazamiento de este factor de los elementos *κB* en la región promotora de los genes.

el cese de la actividad inflamatoria en respuesta a los glucocorticoides se asocia a la desaparición de *NF-κB* de los extractos nucleares, y que el fracaso en suprimir la activación de *NF-κB* tiene como resultado una persistencia del fenómeno inflamatorio<sup>46</sup>.

Es de destacar que los salicilatos, uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal activa y en el mantenimiento de la remisión, ejercen un potente efecto inhibitor sobre la activación de *NF-κB*<sup>80</sup>. Se ha demostrado que los salicilatos inhiben la activación de *NF-κB* impidiendo la fosforilación y subsiguiente degradación de *IκB*, lo que resulta en el bloqueo del incremento de los valores de ARNm de *ICAM-1*, *VCAM-1* y *E-selectina* en respuesta a *TNF*, y que producen una inhibición dependiente de la dosis en la expresión de estas moléculas de adhesión en respuesta al *TNF*<sup>81</sup>.

Los inhibidores del proteasoma han sido probados en varios modelos experimentales de inflamación con resultados prometedores. En un modelo de colitis en la rata inducido por peptidoglicano/polisacárido, la inhibición del proteasoma con *MG-341* inhibe el incremento de expresión de *VCAM-1* y de la sintasa del óxido nítrico inducible en el colon, y esto se asocia a una reducción de la inflamación cólica<sup>43</sup>.

La inhibición sistémica de la activación de *NF-κB* por períodos prolongados en humanos puede comportar ciertos riesgos, como la inmunosupresión o un aumento de la citotoxicidad de determinadas citoquinas<sup>82,83</sup>. De todas formas, dado que *NF-κB* y *AP-1* son factores de transcripción inducibles que actúan en respuesta a estímulos ambientales, puede ser posible modular la dosis de los inhibidores de estos factores de transcripción en rangos que alcancen un efecto terapéutico, sin tener efectos tóxicos.

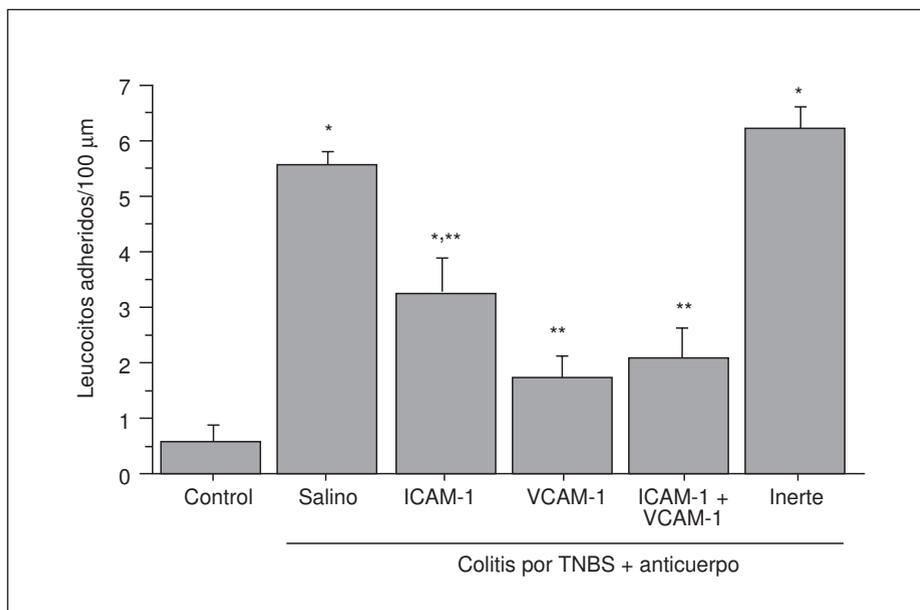
#### Oligonucleótidos antisentido

Los potenciales efectos secundarios y acción inespecífica de los inhibidores de los factores de transcripción utilizados hasta la actualidad ha llevado a la búsqueda de fármacos que actúen de modo distinto en la vía de la síntesis proteica específicamente relacionada con el proceso de inflamación. Una de estas estrategias que ha proporcionado ya resultados significativos es el uso de los oligodeoxinucleóticos (ODNs) antisentido<sup>84</sup>. Los ODNs antisentido son secuencias de ADN de cadena única complementarios de un ARNm. En teoría, los ODNs antisentido, por medio de un apareamiento de bases complementario, se unen de forma específica a un determinado ARNm bloqueando la síntesis de la proteína codificada por éste<sup>85</sup>.

Se han producido moléculas antisentido capaces de bloquear la síntesis de subunidades específicas de *NF-κB*. Los ODNs antisentido para *p65/p50* reducen la expresión de *E-selectina*, *ICAM-1* y *VCAM-1* en células endoteliales humanas en cultivo<sup>86</sup>. Se ha observado que la administración de un ODN antisentido para *p65* a ratones con colitis disminuye los signos clínicos e histológicos de colitis en una forma incluso más eficaz que los corticoides<sup>42</sup>.

El ODN antisentido para el *ICAM-1* humano *ISIS 2302* inhibe de forma selectiva la expresión de *ICAM-1* inducido por citoquinas en diversos tipos celulares *in vivo* e *in vitro*<sup>87,88</sup>. Además, un reciente estudio piloto en pacientes con enfermedad de Crohn demostró que la administración de este fármaco reduce la expresión de *ICAM-1* en la mucosa intestinal y disminuye de forma significativa la dosis de corticoide requerida para el control de la enfermedad, en comparación con placebo<sup>88</sup>. Un análogo murino (*ISIS 3082*) se ha revelado eficaz en el tratamiento de diversos modelos de inflamación, incluyendo la colitis inducida por dextrano<sup>89</sup>; el tratamiento con *ISIS 3082* reduce los

Fig. 5. Efectos de la inmunoneutralización de ICAM-1 y VCAM-1 sobre la adhesión leucocitaria en ratas con colitis inducida por TNBS. La inmunoneutralización de ICAM-1 atenúa significativamente la adhesión leucocitaria, mientras que el anticuerpo anti-VCAM-1 bloquea por completo la adhesión de leucocitos a las vénulas del colon en ratas colíticas. El tratamiento con un anticuerpo inerte no tiene ningún efecto. \* $p < 0,05$  frente a control; \*\* $p < 0,05$  frente a colitis + vehículo. (Tomada de Sans et al<sup>68</sup>.)



signos clínicos de colitis en forma dependiente de la dosis y elimina la inmunodetección de ICAM-1 que habitualmente se observa en ratones con colitis.

### Bloqueo funcional de las moléculas de adhesión

La metodología experimental que ha sido más empleada en la modulación de las interacciones leucocito-endotelio es el bloqueo de la función de las moléculas de adhesión. Esta estrategia ha resultado efectiva en el control de la inflamación en modelos experimentales agudos y crónicos, pero ha sido poco explorada clínicamente. En la mayoría de estudios el bloqueo funcional de las moléculas de adhesión se realiza mediante inmunoneutralización con anticuerpos monoclonales dirigidos contra glucoproteínas específicas.

Se ha observado que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 en ratas con colitis inducida por ácido acético atenúa de forma significativa los signos de inflamación macro y microscópicos, así como la formación de radicales libres<sup>90</sup>. Se ha obtenido una protección similar con anticuerpos monoclonales anti-CD18<sup>91</sup> o anti-CD11b<sup>92</sup> en un modelo de colitis por TNBS en el conejo, y con un factor inhibidor de los neutrófilos recombinante, un antagonista de CD11b/CD18, en la colitis inducida por inmunocomplejos en el conejo<sup>93</sup>. Dos estudios han demostrado un potente efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina  $\alpha_4$  en la colitis que aparece de forma espontánea en el *cotton-top tamarin*<sup>94,95</sup>. Asimismo, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra MAdCAM-1 o su ligando  $\alpha_4\beta_7$  bloquean el reclutamiento de linfocitos y reducen la gravedad de la inflamación cólica en ratones con inmunodeficiencia grave combinada (SCID) reconstituidos con cé-

lulas CD4+ T ricas en la subpoblación CD45RB<sup>high</sup><sup>96</sup>. En un modelo de colitis inducido por TNBS en la rata en el que se ha evaluado las interacciones leucocito-endotelio en vénulas de colon mediante microscopía intravital, se ha observado que la adhesión de leucocitos resulta atenuada por la inmunoneutralización de ICAM-1, y completamente inhibida por la inmunoneutralización de VCAM-1 (fig. 5). Además, en este modelo la administración crónica de anticuerpo anti-VCAM-1 reduce significativamente los signos clínicos e histológicos de colitis<sup>68</sup>. No existen hasta la actualidad estudios clínicos publicados en los que se empleen anticuerpos dirigidos contra las moléculas de adhesión para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal humana. La aplicación de esta estrategia terapéutica a otras enfermedades inmunes como la artritis reumatoide<sup>97</sup> y el trasplante de médula ósea<sup>98</sup> o renal<sup>99</sup>, ha tenido una eficacia variable. Una limitación en la interpretación de los resultados negativos en estudios que emplean anticuerpos es la falta de seguridad de que la dosis empleada sea realmente bloqueante. Los valores que se recomiendan se basan en la mínima concentración de anticuerpo requerida para lograr una máxima inhibición de la adhesión leucocitaria *in vitro*. La experiencia de algunos estudios clínicos abiertos indica que las dosis bloqueantes son más difíciles de alcanzar *in vivo* de lo que se predice a partir de estudios de adhesión *in vitro*. Otra limitación potencial del uso prolongado de anticuerpos monoclonales, al menos en modelos crónicos de inflamación, es la inmunogenicidad.

### COROLARIO

La intervención sobre los mecanismos iniciales del proceso inflamatorio, como es la adhesión de los leucocitos al endotelio venular y la migración hacia el tejido, represen-

ta una nueva y atractiva aproximación terapéutica para la enfermedad inflamatoria intestinal. Aunque se conocen muchos detalles de las moléculas implicadas en el proceso de adhesión entre estos dos tipos celulares en modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal, tenemos mucha menos información del papel que cada una de estas moléculas desempeña en la fisiopatología de la inflamación en el ser humano. Son diversas las etapas del proceso de reclutamiento de leucocitos hacia un tejido que son susceptibles de ser moduladas farmacológicamente, pero las limitaciones derivadas de una alteración del proceso fisiológico de recirculación leucocitaria en el intestino o de la inmunosupresión son significativas. Estas limitaciones podrían ser superadas si la investigación logra identificar mecanismos del proceso de adhesión leucocito-endotelio que se activen de forma exclusiva en la enfermedad inflamatoria, ya sea por activación de receptores, síntesis o función de las moléculas de adhesión. El desarrollo de fármacos eficaces y seguros que modulen estos componentes moleculares de la respuesta inflamatoria puede conllevar el desarrollo de nuevas formas de tratamiento con mayor potencial curativo y menores efectos secundarios que las actualmente utilizadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9: 866-873.
2. Jutila MA, Rorr L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: Comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989; 143: 3.318-3.324.
3. Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2.244-2.248.
4. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996; 79: 560-569.
5. Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. *Am J Pathol* 1993; 143: 725-737.
6. Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov S. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating properties. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 359-363.
7. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992; 117: 895-902.
8. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C et al. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992; 69: 927-938.
9. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993; 262: 436-438.
10. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 1993; 366: 695-698.
11. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74: 185-195.
12. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993; 75: 1.179-1.186.
13. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 445-456.
14. Ohmori K, Takada A, Yoneda T, Buma Y, Hirashima K, Tsyuoka K et al. Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. *Blood* 1993; 81: 101-111.
15. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). *Cell* 1987; 51: 813-819.
16. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2.068-2.101.
17. Bell RG, Issekutz T. Expression of a protective intestinal immune response can be inhibited at three distinct sites by treatment with anti-alpha 4 integrin. *J Immunol* 1993; 151: 4.790-4.802.
18. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler M et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990; 60: 577-584.
19. Sánchez-Aparicio P, Domínguez-Jiménez C, García-Pardo A. Activation of the alpha 4 beta 1 integrin through the beta 1 subunit induces recognition of the RGDS sequence in fibronectin. *J Cell Biol* 1994; 126: 271-279.
20. Hu MC, Crowe DT, Weissman IL, Holzmann B. Cloning and expression of mouse integrin beta p(beta 7): a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8.254-8.258.
21. Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M, Kurose I, Shigematsu T, Kimura H et al.  $\alpha_4$  integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in Peyer's patches of rats. *Int Immunol* 1996; 8: 287-295.
22. Strauch UG, Lifka A, Gossler U, Kilshaw PJ, Clements J, Holzmann B. Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *Int Immunol* 1994; 6: 263-275.
23. Diamond MS, García A-J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 1993; 120: 1.031-1.043.
24. Van de Stolpe A, Van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74: 13-33.
25. Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA et al. Cellular distribution of human leukocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 1994; 47: 143-147.
26. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995; 269: H 1.955-H 1.964.
27. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Muzykantov VR, Carden DL, Miyasaka M et al. Portal hypertension enhances endotoxin-induced intercellular adhesion molecule 1 up-regulation in the rat. *Gastroenterology* 1996; 110: 866-874.
28. Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997; 158: 1.825-1.832.
29. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 368-374.
30. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; 339: 61-64.
31. De Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* 1991; 174: 253-267.
32. De Fougerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med* 1994; 179: 619-629.
33. Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in leukocyte homing. *Nature* 1988; 331: 41-46.
34. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N et al. An anti-platelet-endothelial cell adhe-

- sion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 1996; 184: 229-239.
35. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991; 114: 1.059-1.068.
  36. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; 19: 80-88.
  37. Karin M, Smeal T. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 418-422.
  38. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1.072: 129-157.
  39. Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 1996; 156: 2.956-2.963.
  40. Takeuchi M, Baichwal VR. Induction of the gene encoding mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 by tumor necrosis factor alpha is mediated by NF-kappa B proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3.561-3.565.
  41. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelialleukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995; 2: 493-506.
  42. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit NF-kB abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine* 1996; 2: 998-1.004.
  43. Conner EM, Brand S, Davis JM, Laroux FS, Palombella VJ, Fuseler JW et al. Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1.615-1.622.
  44. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484.
  45. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357-369.
  46. Ardite E, Panés J, Miranda M, Salas A, Elizalde JJ, Sans M et al. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 431-433.
  47. Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 840-847.
  48. Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, Fukushima K, Matsumoto T, Kitano A et al. In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab Invest* 1993; 69: 77-85.
  49. Oshitani N, Campbell A, Bloom S, Kitano A, Kobayashi K, Jewell DP. Adhesion molecule expression on vascular endothelium and nitroblue tetrazolium reducing activity in human colonic mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 915-920.
  50. Cellier C, Patey N, Fromont Hankard G, Cervoni JP, Leborgne M, Chaussade S et al. In situ endothelial cell adhesion molecule expression in ulcerative colitis. E-selectin in situ expression correlates with clinical, endoscopic and histological activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1.197-1.203.
  51. Bhatti M, Chapman P, Peters M, Haskard D, Hodgson HJF. Visualising E-selectin in the detection and evaluation of inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 43: 40-47.
  52. Schurmann GM, Bishop AE, Facer P, Vecchio M, Lee JC, Rampton DS et al. Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 36: 411-418.
  53. Briskin M, Winsor Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997; 151: 97-110.
  54. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112: 1.895-1.907.
  55. Pooley N, Ghosh L, Sharon P. Up-regulation of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 differs between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 219-225.
  56. Nielsen OH, Langholz E, Hendel J, Brynskov J. Circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in active inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 1.918-1.923.
  57. Patel RT, Pall AA, Adu D, Keighley MR. Circulating soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 1.037-1.041.
  58. Goke M, Hoffmann JC, Evers J, Kruger H, Manns MP. Elevated serum concentrations of soluble selectin and immunoglobulin type adhesion molecules in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1997; 32: 480-486.
  59. Jones SC, Banks RE, Haidar A, Gearing AJ, Hemingway IK, Ibbotson SH et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 36: 724-730.
  60. Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M et al. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* 1995; 3: 283-292.
  61. King PD, Sandberg ET, Selvakumar A, Fang P, Beaudet AL, Dupont B. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol* 1995; 154: 6.080-6.093.
  62. Komatsu S, Flores S, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN. Differential up-regulation of circulating soluble and endothelial cell intercellular adhesion molecule-1 in mice. *Am J Pathol* 1997; 151: 205-214.
  63. Liu ZX, Hiwatahi N, Noguchi M, Toyota T. Increased expression of costimulatory molecules on peripheral blood monocytes in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1.241-1.246.
  64. Mishra L, Mishra BB, Harris M, Bayless TM, Muchmore AV. In vitro cell aggregation and cell adhesion molecules in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 772-779.
  65. Liu ZX, Noguchi M, Hiwatahi N, Toyota T. Monocyte aggregation and multinucleated giant-cell formation in vitro in Crohn's disease. The effect of cell adhesion molecules. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 706-710.
  66. Bernstein CN, Sargent M, Gallatin WM. Beta2 integrin/ICAM expression in Crohn's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86: 147-160.
  67. Malizia G, Calabrese A, Cottone M, Raimondo M, Trejdosiewicz LK, Smart CJ et al. Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100: 150-159.
  68. Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JJ, Arce Y, Elena M et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 874-883.
  69. Panés J, Grisham MB, Granger DN, Piqué JM. Activación de moléculas de adhesión en la colitis en ratones deficientes en IL-10 [resumen]. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 507.
  70. McDonald SA, Palmen MJ, Van Rees EP, MacDonald TT. Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis. *Immunology* 1997; 91: 73-80.
  71. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1996; 156: 2.558-2.565.
  72. Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 1996; 18: 371-378.
  73. Taylor A, Das AM, Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Subacute treatment of rats with dexamethasone reduces ICAM-1 levels on circulating monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 675-678.
  74. Tessier PA, Cattaruzzi P, McColl SR. Inhibition of lymphocyte adhesion to cytokine-activated synovial fibroblasts by glucocorticoids involves the attenuation of vascular cell adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 gene expression. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 226-234.
  75. Brostjan C, Anrather J, Csizmadia V, Natarajan G, Winkler H.

- Glucocorticoids inhibit E-selectin expression by targeting NF-kappaB and not ATF/c-Jun. *J Immunol* 1997; 158: 3.836-3.844.
76. Handel ML. Transcription factors AP-1 and NF-kappa B: where steroids meet the gold standard of anti-rheumatic drugs. *Inflamm Res* 1997; 46: 282-286.
  77. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 752-756.
  78. Sakurai H, Shigemori N, Hisada Y, Ishizuka T, Kawashima K, Sugita T. Suppression of NF-kappa B and AP-1 activation by glucocorticoids in experimental glomerulonephritis in rats: molecular mechanisms of anti-nephritic action. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1.362: 252-262.
  79. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-953.
  80. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956-959.
  81. Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996; 156: 3.961-3.969.
  82. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kB in preventing TNFalpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784.
  83. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784-787.
  84. Agrawal S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotechnol* 1996; 14: 376-387.
  85. Sharma HW, Narayanan R. The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *Bioessays* 1995; 17: 1.055-1.063.
  86. Lee CH, Chen HH, Hoke G, Jong JS, White L, Kang YH. Antisense gene suppression against human ICAM-1, ELAM-1, and VCAM-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Shock* 1995; 4: 1-10.
  87. Bennett CF, Condon TP, Grimm S, Chan H, Chiang MY. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* 1994; 152: 3.530-3.540.
  88. Yacyszyn BR, Bowen-Yacyszyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, Shanahan WR. A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 14: 1.133-1.142.
  89. Bennett CF, Kornbrust D, Henry S, Stecker K, Howard R, Cooper S et al. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 988-1.000.
  90. Wong PY, Yue G, Yin K, Miyasaka M, Lane CL, Manning AM et al. Antibodies to ICAM-1 ameliorate inflammation in acetic acid induced inflammatory bowel disease. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995; 23: 337-339.
  91. Wallace JL, Higa A, McKnight GW, MacIntyre DE. Prevention and reversal of experimental colitis by a monoclonal antibody which inhibits leukocyte adherence. *Inflammation* 1992; 16: 343-354.
  92. Palmen MJ, Dijkstra CD, Van der Ende MB, Pena AS, Van Rees EP. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 351-356.
  93. Meenan J, Hommes DW, Mevissen M, Dijkhuizen S, Soule H, Moyle M et al. Attenuation of the inflammatory response in an animal colitis model by neutrophil inhibitory factor, a novel beta 2-integrin antagonist. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 786-791.
  94. Podolsky DK, Lobb R, King N, Benjamin CD, Pepinsky B, Sehgal P et al. Attenuation of colitis in the cotton-top tamarin by anti- $\alpha 4$  integrin monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1993; 92: 372-380.
  95. Hesterberg PE, Winsor Hines D, Briskin MJ, Soler Ferran D, Merrill C, Mackay CR et al. Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin  $\alpha 4\beta 7$ . *Gastroenterology* 1996; 111: 1.373-1.380.
  96. Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, Shi X, Butcher E, Ringler DJ. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RB<sup>high</sup> CD4+ T cells. *J Immunol* 1997; 158: 2.099-2.106.
  97. Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, Norris SH, Rothlein R, Scharschmidt LA et al. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 992-999.
  98. Van Dijken PJ, Ghayur T, Mauch P, Down J, Burakoff SJ, Ferrara JL. Evidence that anti-LFA-1 in vivo improves engraftment and survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1990; 49: 882-886.
  99. Le Mauff B, Hourmant M, Rougier JP, Hirn M, Dantal J, Baatard R et al. Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation. *Transplantation* 1991; 52: 291-296.