

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**LA ADMINISTRACIÓN DE CARDITROFINA-1 MEJORA
LA COLITIS ULCEROSA INDUCIDA POR DEXTRANO
SULFATO DE SODIO**

Memoria que presenta **Dña. Vanessa Prieto Vicente** para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

**SALAMANCA
2015**

La doctora, Dña. María Jesús Monte Río, Catedrática de Fisiología y Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por Dña. Vanessa Prieto Vicente, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, con el título "***La administración de Cardiotrofina-1 mejora la Colitis Ulcerosa inducida por Dextrano Sulfato de Sodio***", ha sido realizado en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los doctores D. José Miguel López Novoa y D. Antonio Rodríguez Pérez, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmo el presente certificado en, Salamanca a once de mayo de dos mil quince.

Fdo. Prof. Dña. María Jesús Monte Río

Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología

El Prof. Dr. D. Antonio Rodríguez Pérez. Jefe del Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de Salamanca.

El Prof. Dr. D. José Miguel López Novoa. Catedrático de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado ***“La administración de Cardiotrofina-1 mejora la Colitis Ulcerosa inducida por Dextrano Sulfato de Sodio”*** realizado por Dña. Vanessa Prieto Vicente, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en, Salamanca a once de mayo de dos mil quince.

Fdo.: Prof. Antonio Rodríguez Pérez
Director de la Tesis

Fdo.: Prof. José Miguel López Novoa
Director de la Tesis

Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Fisiología y Farmacología y de Cirugía de la Facultad de Medicina. Ha sido financiado por un proyecto intramural del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Referencia IB14_01 y por una ayuda de la Asociación Salamantina para el estudio de las Enfermedades Hepáticas

Gracias a todos!!!

Son tantas las personas que me han ayudado en este proyecto que resulta difícil dejar constancia de todos ellas, sin embargo quiero destacar algunas y agradecerles con sinceridad su participación.

En primer lugar quiero dar las gracias a los directores de mi tesis. Al doctor Antonio Rodríguez Pérez que despertó mi interés y amor por la enfermedad inflamatoria intestinal, por su apoyo y sobre todo por ser mi mayor ejemplo en la atención a pacientes y en su dedicación absoluta a ellos. Al profesor D. José Miguel López Novoa por su infinita paciencia y abrirme las puertas al difícil mundo de la investigación, por sus consejos y disponibilidad.

Por supuesto a Nacho, Daniel, Yaremi y muy especialmente a Victor, del laboratorio de Cirugía, conocerlos ha sido lo mejor de este proyecto.

A mis amigos de Digestivo: Alejandra, Conchi, Alberto, Beatriz, Antoñito, Yuliana, Pepe, Ana Mora, Rosa, Cristina, Dani y un largo ect. Gracias por vuestro apoyo, vuestras palabras de aliento y por ser los mejores compañeros. Y sobre todo a mi "compañera de fatigas", la doctora Ana Sánchez Garrido que ha estado a mi lado durante todo este camino. Gracias por tu confianza, tu sencillez, tu compromiso, gracias por lo fácil que ha sido trabajar contigo.

Al profesor D.Miguel Arévalo, sin cuya ayuda inestimable no hubiéramos podido realizar gran parte de este trabajo.

A los profesores D. Enrique García y D. Javier Martín, por vuestra ayuda.

A mi amigo Mon, por su entera disposición.

A mi familia por su comprensión, especialmente a mis padres. Muchas gracias por darme la fuerza para llegar hasta aquí.

Y finalmente y sin embargo el más importante de todos, a mi marido, mi agradecimiento eterno. Por disfrutarte como compañero y amigo, por no fallar nunca y estar siempre ahí.

El médico tiene como misión procura el bienestar y la salud del hombre. Su alta responsabilidad exige una amplia formación, no solamente sobre las ciencias en las que se basa la medicina, sino sobre los métodos científicos. Por ello y considerando que el médico debe tener la permanente autoexigencia para incorporar a la práctica diaria los avances científicos y tecnológicos que aportan cada día nuevas y, a veces, revolucionarias soluciones a los problemas de salud, termino reiterando mi agradecimiento a cuantos profesores, compañeros y amigos me han apoyado y guiado a la hora de escribir esta tesis

A los dos amores de mi vida, Maikel y Gonzalo, y al que está por llegar

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
APC	Antigen presenter cell (células presentadoras de antígeno)
ASCA	Anticuerpos anti Saccaromyces cerevisae
ATG16L1	Proteína 16-1 relacionada con autofagia
CAMs	Células de adhesión molecular
CMV	Citomegalovirus
COX2	Ciclooxigenasa 2
CT-1	Cardiotrofina-1
CTL	Linfocitos T citotóxicos
CU	Colitis ulcerosa
DSS	Dextrano sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent assay
gp130	Glioproteína 130
GWAS	Genome Wide association Studies
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INFg	Inteferon gamma
INOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
JAK	Janus Kinasas
KO	Knock-out
LPS	Lipopolisacáridos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MIP	Proteína inflamatoria del macrófago
MPO	Mieloperoxidasa
NFKB	Factor de transcripción nuclear B
NIK	Proteína cinasa inductora de NF-KB
NKT	linfocito T natural killer
NLRs	Receptores tipo NOD
NO	Óxido nítrico
pANCA	Anticuerpo anticitoplasma de neutrófilos perinucleares atípicos
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de polimerasa)
RLO	Radicales libres de oxígeno
SEA	Servicio de Experimentación Animal
Ser	Serinas
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
SOCS	Supresor de la señalización por citocinas
STAT	Proteínas activadores de la transcripción y transductoras de señal

TAC	tomografía axial computerizada
TGF-B	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T helper
Thr	Treoninas
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Transmembrana
TNBS	Ácido trinitrobenceno sulfónico
TNFa	Factor de necrosis tumoral a
UV	Ultravioleta
VSG	Velocidad de sedimentación globular
WB	Western Blot
WT	Fenotipo salvaje (wild type)

Índice

ÍNDICE

1. Introducción	21
1.1. La colitis ulcerosa. Resumen del estado actual	23
1.1.1. Epidemiología	
1.1.2. Etiopatogenia	
✓ Factores genéticos implicados	
✓ Microbiota y enteropatógenos	
✓ Trastornos inmunológicos	
1.1.3. Diagnóstico	
1.1.4. Tratamiento	
1.2. Modelos experimentales de colitis ulcerosa	65
1.3. Cardiotrofina 1, citoquina antiinflamatoria y antiapoptótica	72
2. Hipótesis y objetivos	89
3. Materiales y métodos	93
3.1 . Animales de experimentación	95
3.2 . Materiales	95
3.3 .Métodos	98
3.3.1 Inducción de la colitis	
3.3.2 Grupos experimentales	
3.3.3 Monitorización de los signos clínicos de la colitis	
3.3.4 Sacrificio de los ratones y recogida de muestras	
3.3.5 Estudio histológico:	
✓ Tinción con hematoxilina–eosina	
✓ Inmunohistoquímica	

3.3.6	Estudio microbiológico	
3.3.7	Técnicas empleadas para el estudio de las variables moleculares	
	✓ Elisa	
	✓ RT-PCR	
	✓ Western blot	
3.4	Estudios estadísticos	117
4.	Resultados	121
4.1	Resultados clínicos	123
4.2	Resultados histológicos y de inmunohistoquímica	127
4.3	Estudio microbiológico	136
4.4	Estudio citoquinas	137
4.4.1	TNF- α	
4.4.2	INF-g	
4.4.3	IL-17	
4.4.4	IL-10	
4.4.5	IL-6	
4.5	Estudio marcadores inflamación	144
4.5.1	Activación NFkB	
4.5.2	iNOS	
4.5.3	Activación STAT3	
4.6	Estudio expresión Cardiotrofina-1	147
5.	Discusión	151
6.	Conclusiones	167
7.	Bibliografía	171

Introducción

1.1. LA COLITIS ULCEROSA; RESUMEN DEL ESTADO ACTUAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una inflamación crónica del tracto gastrointestinal, que cursa con periodos de brote o actividad, en los que aparecen los síntomas, frente a periodos de remisión, y cuya evolución puede causar lesiones progresivas.

La EII incluye dos entidades mayores, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). La denominación colitis ulcerosa comprende un síndrome caracterizado por la inflamación y ulceración de la mucosa intestinal, generalmente confinada en el intestino grueso, que puede presentar distintos grados de gravedad. La extensión de la enfermedad y el grado de inflamación definirán la sintomatología del paciente y su repercusión biológica que en general será poco relevante cuando afecte aisladamente al recto pero grave cuando la enfermedad involucre extensas áreas de la mucosa del colon. Sin embargo, la afectación rectal, aunque sea aislada, es la causa de síntomas muy incapacitantes a los que se debe prestar atención. Afortunadamente, el pronóstico *ad vitam* de este síndrome es bueno, pero el efecto en la calidad de vida es, con cierta frecuencia, negativo, si no se realiza un diagnóstico precoz y tratamiento adecuado.

Se cree que la enfermedad se desarrolla en sujetos genéticamente susceptibles, por una desregulación de la homeostasis entre la microflora comensal y/o otros elementos ambientales y la capacidad de respuesta inmune del paciente, la cual presenta un desbalance hacia la perpetuación del proceso inflamatorio. Clásicamente, la EII se ha considerado una enfermedad donde la inmunidad adquirida mediada por linfocitos T era fundamental y es hacia donde se han dirigido los esfuerzos terapéuticos. En el momento actual, se ha evidenciado que la inmunidad innata está alterada inicialmente en los pacientes y parece ser la responsable de que la inmunidad adquirida perpetúe el proceso inflamatorio, al estar respondiendo a las directrices que se generan en la interfase flora-ambiente/inmunidad.

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA CU

La epidemiología nos ha demostrado que, en las últimas décadas, se ha producido un aumento de la incidencia de CU y la EC, tanto en nuestro medio como en los países emergentes.

El pico de edad para la aparición de la EC se sitúa entre los 20-30 años y para la CU hay dos picos, entre los 30-40 y entre los 60-70 años. La EII pediátrica representa un 7%-20% de todos los casos (1,2). Se ha observado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad entre los niños que migran a poblaciones más desarrolladas antes de los 15 años (3,4), y la apendicectomía antes de los 20 años parece disminuir el riesgo de CU.

La CU aparece con una frecuencia ligeramente mayor entre los hombres y la EC entre las mujeres, particularmente en áreas de incidencia alta (5,6). Esta distribución es al contrario entre la población pediátrica, cambiando la balanza entre los 14 y los 17 años (7).

Los estudios de Europa Occidental y América del Norte de los últimos 20 años han observado un notable aumento en la incidencia de la enfermedad, que ha pasado de ser una entidad infrecuente a afectar del 0,5% al 1,0% de la población, con una incidencia en países occidentales de más de 200 casos por 100.000 habitantes (12.7 y 24.3 por 100.000 personas/año para la EC y CU, respectivamente) (8).

Existe un gradiente Norte-Sur, pero se viene observando un aumento de la incidencia en países en los cuales era baja, así como en población migratoria de países en vías de desarrollo a sociedades más avanzadas (9). Además, la incidencia en la EC parece estar aumentando de una forma más acelerada que en la CU (10)

En el caso concreto de España, existen publicaciones que también parecen indicar un incremento de la incidencia y prevalencia de colitis ulcerosa en las últimas décadas. La prevalencia actual ronda los 250000 pacientes. A pesar de la

exhaustiva investigación para determinar los factores de riesgo que expliquen el aumento de la incidencia no se ha logrado demostrar que se asocian a la industrialización, al aumento del nivel sociocultural o a los cambios en el hábito de vida.

Este aumento de incidencia, los nuevos tratamientos y la dependencia de atención hospitalaria hacen que esta enfermedad suponga una importante carga económica para los sistemas sanitarios.

1.1.2 ETIOPATOGENIA CU

✓ FACTORES GENÉTICOS IMPLICADOS

Casi todas las enfermedades son el resultado de la interacción entre el entorno y el paciente, pero la contribución de la genética es relativamente modesta en casi todas las patologías complejas. No obstante, conocer la base genética de la patología ayuda a entenderla, y de ese conocimiento puede surgir una nueva terapia. Merece, pues, la pena investigarlo.

¿Cómo se estima el peso de la susceptibilidad genética?

Una manera de hacerlo es estudiar la concordancia de la patología en gemelos univitelinos, que debe ser alta si la base genética contribuye mucho a inducirla. En el caso de la EII la aportación de factores genéticos es especialmente modesta, como se desprende de la escasa concordancia en gemelos homocigotos (10-15% en colitis, 30-35% en Crohn (11).

¿Cómo se aborda el estudio de la inmunogenética de la EII?

Hay dos estrategias, la última relativamente reciente. La primera es estudiar rutas o factores que razonablemente se puedan relacionar o se hayan relacionado con lo que se sabe de la EII, por ejemplo la integridad de la mucosa

intestinal. Es decir, es en base a hipótesis abordables que deben definir genes conocidos. La segunda es la estrategia anónima, que analiza el genoma sin prejuicio alguno, buscando genes que se asocien lo suficiente para que puedan detectarse por esa técnica.

En el caso de la EII estas dos estrategias se han aplicado en dos circunstancias:

En familias y han dado lugar a la descripción de EII monogénicas, siempre de edad de comienzo muy temprano, lo que nos confirma que la CU y la EC son enfermedades menos dependientes del genoma (12).

En cohortes de pacientes mediante GWAS (Genome Wide Association Studies).

Analicemos ambas estrategias y sus resultados.

- Estudios familiares:

Utilizando familias con más de un miembro afecto es posible hacer estudios de ligamiento bajo la hipótesis de herencia dominante o recesiva, para después, una vez acotada la región responsable, secuenciar los genes candidato que se encuentren allí. Esta tediosa estrategia tiene sus limitaciones, y ahora se está poco a poco pasando a secuenciar el genoma completo.

- **EII monogénicas por defectos en la ruta IL-10 / IL-10R.** El estudio de familias con colitis congénita desveló la existencia de defectos en la síntesis de IL-10 o en la expresión de su receptor, ambos implicados en la inhibición de la inflamación intestinal (13). Existen dos posibles momentos en los que la producción y reconocimiento de la IL-10 puede prevenir la EII: primero, en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos o patógenos intestinales, segundo en la resolución de las respuestas excesivas a infecciones (14). El hecho de que se cure con trasplante de progenitores hematopoyéticos indica que estas enfermedades monogénicas son exclusivamente leucocitarias.

- Estudios poblacionales (GWAS):

Estos solamente sirven para alelos cuya frecuencia sea mayor del 1%, ya que su resolución en caso contrario es escasa. Se basan en la hipótesis de que la causa genética de la enfermedad debe haberse iniciado en algún lugar del genoma en el enfermo fundador, y cerca de ese lugar existen polimorfismos que permiten detectar dicho alelo patogénico a pesar del paso de los años, que tiende a separar genes lejanos, pero mucho menos genes cercanos. La densidad de los SNP en el genoma es enorme (1 cada 100 pares de bases, unos 50 millones en total). Existen chips comerciales que agrupan SNP por la función de los genes que mapean, como Immochip, lo que permite reducir el trabajo de búsqueda bajo la hipótesis de que debe la patología tener base inmunológica.

- **GWAS de Crohn.** Pero cuando se analiza la EII, en concreto la enfermedad de Crohn, que es la que más base genética tiene, el resultado es muy confuso (71 genes), lo que sugiere que no hay un único mecanismo implicado y que quizá se trate de varias enfermedades con similar expresión clínica. Una de ellas podría ser la asociada a defectos en NOD2 (un detector citosólico de patógenos codificado en el cromosoma 16), que efectivamente aparece entre las asociaciones detectadas. Ese hallazgo llevó a la secuenciación de NOD2 en EII. (15). Casi un 30% de los pacientes con Crohn tienen alguna de las tres variantes de NOD2 que se agrupan en el dominio LRR de detección de patógenos, aunque hay otras muchas en otras regiones que aparecen en casi un 20% más. En contraste, apenas aparecen en CU.
- **Mecanismo patogénico de NOD2.** NOD2 forma parte de los biosensores encargados de detectar patógenos en los diversos compartimentos celulares para inducir finalmente inflamación. Los TLR (*toll-like receptors*) sondan el exterior de la célula y el interior de las vesículas celulares, incluidos los fagosomas, mientras que los NOD sondan el citoplasma. Todos, sin embargo, desembocan en la activación de factores nucleares como NF- κ B, que inducen

citoquinas inflamatorias como el TNF- α que ayudan a resolver la causa infecciosa que las produjo. Es fácil imaginar que este sistema puede dar lugar a una excesiva inflamación asociada a la detección del microbioma en la EII. La prueba de la implicación genética se consiguió en el año 2001, cuando se descubrió que el gen NOD2/CARD15 es el gen de susceptibilidad más importante detectado para los caucásicos (no para la raza asiática, en la que el gen NOD2 parece irrelevante). Entre el 20 y el 40% de los pacientes presenta variantes de este gen (44% de los gemelos monocigotos) (16).

- **La base genética de Crohn y CU es diferente.** Los datos de concordancia de gemelos univitelinos (12% en CU, 32% en Crohn) se refuerzan con varios datos complementarios: a) la diferente heredabilidad que se deduce de los GWAS (16% y 23%, respectivamente), b) los diferentes genes detectados en cada caso (por ejemplo IL-7R y NOD2, respectivamente) c) los diferentes efectos del ambiente (el tabaco protege de la CU mientras que agrava el Crohn)
- **Pero la genética no lo es todo.** Los genes detectados por GWAS no son, como sabemos, más que una parte menor del problema. En la siguiente figura (Figura 1), se resumen los factores ambientales y microbianos que, en interacción con los inmunitarios y genéticos, participan en la patogenia de la EII (17).

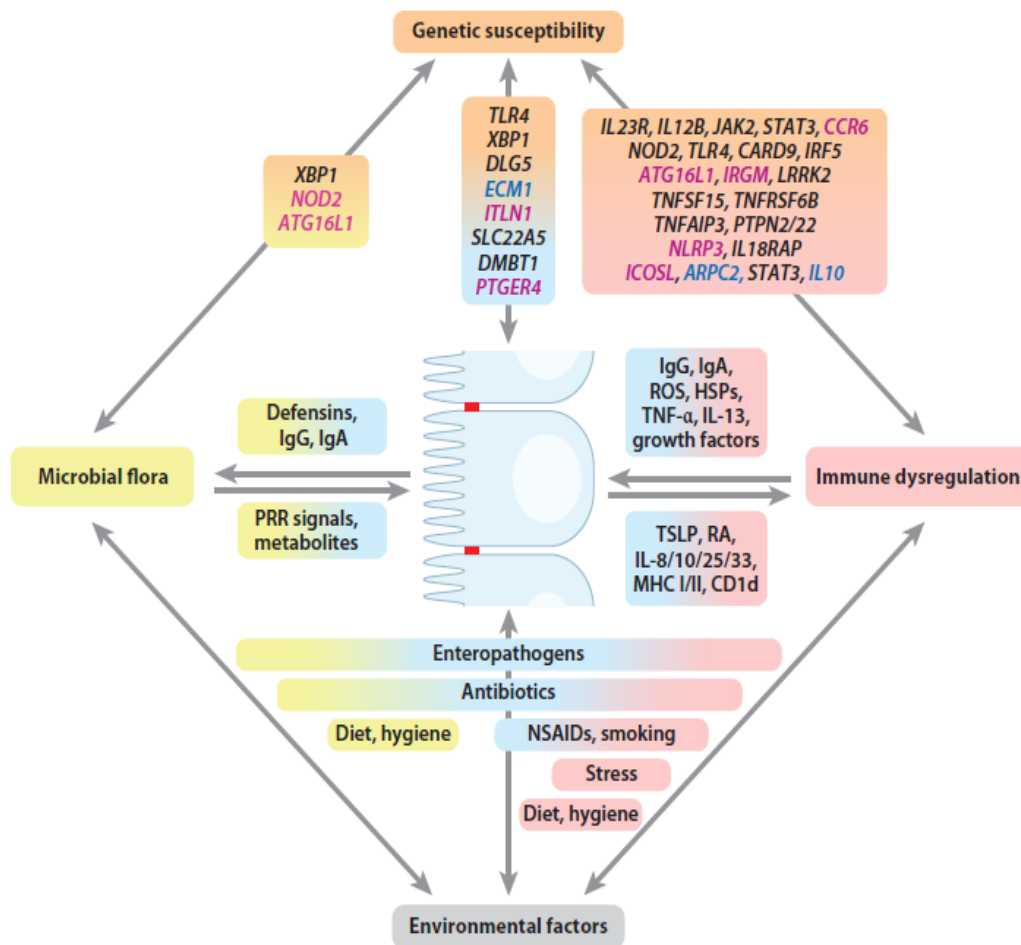


Figura 1: Patogenia EII. Obtenida de Kaser et al. Annu Rev Inmuno. 2010

Estos hallazgos apoyan el concepto de la complejidad poligénica y la compleja heterogeneidad y variabilidad genética de estos síndromes. Es más que probable que se requiera más de una mutación para que se pueda manifestar la enfermedad y que alguno de los genes implicados tengan una influencia sutil cuantitativamente, pero relevante, ya que pueden ser la causa de las variaciones, no solo fenotípicas, sino clínicas o evolutiva.

En un individuo no "genéticamente predispuesto" a desarrollar CU o EC, la respuesta inflamatoria frente a un patógeno u otro antígeno no reconocido como habitual, consigue detectarlo y eliminarlo, y los mecanismos de reparación de la

mucosa restituyen el sistema *ad integrum*. Sin embargo, el individuo "genéticamente predispuesto" a sufrir CU o EC es incapaz de detener la respuesta inflamatoria frente a elemento (s) "ambiental"(es). Estos incluyen elementos antigénicos extrínsecos (alimentarios, bacterianos, fármacos, tabaco, polución, etc.), intrínsecos (ROS, moléculas consecuencias de lesiones tisulares, etc), o incluso la propia microbiota por no ser reconocida como tal o por haber sufrido desbalance en su composición y/o distribución porcentual, haciéndola irreconocible por el sistema inmune innato y no estar memorizada por el sistema inmune adquirido.

Sin embargo las alteraciones genéticas definidas no están presentes en todos los individuos afectados de estos síndromes (como mucho en un 40% de ellos) y no tienen una distribución étnica ni geográfica homogénea. Ello sugiere que, o no conocemos todas las alteraciones genéticas necesarias que induzcan a padecer la enfermedad, o que los polimorfismos genéticos por ellos mismos no son los únicos causantes de estas entidades, sino que deben existir otros elementos o situaciones que encienden la "chispa" que inicia el fuego de la respuesta inflamatoria similar a lo que ocurre con los patógenos invasivos.

Las alteraciones genéticas, como máximo, predisponen al individuo a desarrollar cualquiera de estos síndromes, pero no lo desencadenan, aunque el componente genético o ambiental puede tener un impacto mayor o menor en distintos individuo, lo que podría explicar la variabilidad clínica, fenotípica y evolutiva de los pacientes que sufren los síndromes de CU y EC y que representan mecanismos patogénicos distintos que confluyen en unas lesiones comunes más o menos graves y extensas.

El síndrome CU es un paradigma de esta situación. En él se han descrito, por ahora, menos polimorfismos genéticos que en el síndrome EC. En cambio, sí se ha reconocido un papel importante del factor ambiental, ya que la microbiota tiene en el colon su hábitat principal.

✓ MICROBIOTA Y ENTEROPATÓGENOS

La microbiota intestinal se compone de los microorganismos que habitan en el intestino. Se adquiere al nacer y en el adulto es bastante estable en el tiempo aunque se producen fluctuaciones en respuesta a factores ambientales.

Se calcula que una persona sana lleva en su cuerpo 1 kilogramo de bacterias la mayoría de las cuales residen en el intestino. El número absoluto de bacterias saprofitas (o comensales) sería de $10^{14}/\text{mm}^3$. Se cree que existen más de 500 especies, la mayoría poco conocidas, que colonizan el intestino. El tracto gastrointestinal, pero especialmente el colon, contiene más bacterias que células el cuerpo humano. Estas bacterias no habitan solo en la luz intestinal, si no que se hallan también adheridas a la mucosa, separadas de su epitelio mediante una capa de moco, que en parte dificulta o regula que las bacterias traspasen la barrera epitelial de la mucosa intestinal. Por tanto, son muy importantes para la digestión de los alimentos y para evitar que microorganismos patógenos nos invadan. Además de bacterias también existen hongos, virus y protozoos que forman parte de nuestra flora comensal (18).

Existen múltiples evidencias a favor de la implicación de la microbiota en la EII. Diferentes modelos experimentales animales demuestran que las colitis inducidas o espontáneas se inician y perpetúan en presencia de bacterias residentes entéricas, mientras que en condiciones de esterilidad (*germ-free*) se previene o se atenúa, de forma muy significativa, el desarrollo de las mismas. Clínicamente, esta idea se apoya por la evidencia de que los síntomas de la EII mejoran o no se producen cuando hay derivación del torrente fecal. Existen tres observaciones clínicas que apoyan la implicación de la flora bacteriana en la EII:

1. La EII ocurre, sobre todo, en el íleon terminal y en el colon, donde la concentración de flora bacteriana alcanza sus máximos.

2. Tanto los probióticos como los antibióticos han mostrado capacidad moduladora de la inflamación intestinal, sugiriendo que la modificación del contenido microbiano puede modificar el curso de la inflamación.
3. Algunos datos sugieren que los pacientes con EIIc presentan una respuesta inmune exacerbada a los antígenos bacterianos, junto con una pérdida de tolerancia que participa del proceso patogénico.

En el colon, las bacterias van a llevar a cabo, fundamentalmente tres acciones:

- **Metabólicas.** Mediante la interacción con los restos alimentarios no digeridos o absorbidos en los tramos más altos del aparato digestivo. La acción metabólica que producen las bacterias es la síntesis de elementos biológicos, especialmente los derivados de su acción sobre los carbohidratos, denominados ácidos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). De ellos, el propionato tiene efectos sistémicos, pero el butirato es un elemento esencial para el mantenimiento de la estructura del epitelio, su metabolismo energético, la producción de moco, la función absorbente del colon (ahorro de sodio y agua) y el sistema inmune, al regular algunos de los sistemas de señales intracelulares que ponen en marcha la respuesta inflamatoria. En la CU se ha descrito un déficit de producción y de oxidación del butirato, con el consiguiente déficit en la síntesis de acetil CoA. Como consecuencia, habrá un déficit energético en el colonocito, disminuirá la absorción agua-sodio, la síntesis de moco y disminución de su papel atenuador de la activación del factor de transcripción NFκB, por lo que favorecerá el inicio de la respuesta inflamatoria.
- **Competitiva frente a los gérmenes patógenos.** La microbiota adherida a la mucosa del colon ocupa los receptores bacterianos y compite por ellos frente a los patógenos invasivos.

- La microbiota adherida a la mucosa del colon mantiene una relación de buena vecindad con el sistema inmune. Entre ambos regulan la respuesta inmune de dos formas:
 - Atenuando la respuesta inflamatoria, al ser reconocida por el sistema inmune como no patógeno.
 - Transmitiendo esta información a la primera línea de defensa innata (células de Paneth y la producción de sustancias antimicrobianas como defensinas y lisozimas), como al sistema inmune adaptativo, el cual memoriza esta información y no responde agresivamente frente a la inmensa cantidad de antígenos a los que se enfrenta.

Estos aspectos son fundamentales para entender el hecho de que no es necesario que sea un germen patógeno el que inicie la reacción en cadena que cronifica el proceso inflamatorio, sino que incluso la propia microbiota, probablemente desbalanceada, puede ser la responsable. Es decir, es posible que la microbiota, en estos casos, haya perdido el patrón bacteriano distributivo propio de cada individuo, por lo que ciertos gérmenes que, aunque propios, se encuentran en exceso o defecto por causas no del todo conocidas (gastroenteritis, antibióticos, dieta, tabaco, contaminación, etc...).

Este concepto se denomina disbiosis, y en la EII se ha desarrollado recientemente, ya que ha sido improductiva la búsqueda de patógenos en la EII para hallar un único elemento patógeno desencadenante de la enfermedad. Sin embargo, parece que los pacientes con EII presentan perfiles menos complejos de bacterias comensales, a la vez que un mayor número de bacterias asociadas a la mucosa (19).

Estudios cuantitativos de la cantidad de bacterias asociadas a la mucosa intestinal han demostrado que en la EII hay más bacterias, tanto aerobias como anaerobias, asociadas al intestino. Además, se observan diferencias en la distribución, siendo en el íleon terminal donde se encuentran mayor cantidad de

bacterias, tanto en la EC como en la CU, y siendo el ciego donde se encuentran menos bacterias en ambas entidades (respecto a los otros tramos intestinales, aunque el ciego en la CU y en la EC sigue teniendo más bacterias que los controles). Finalmente, a nivel de recto, el mayor contenido de bacterias se presenta en la EC y no en la CU, lo cual apoya, de nuevo, el concepto de disbiosis en la enfermedad activa.

Hasta la fecha, no se ha podido aislar un solo patógeno como causante de la EII. Además, la evidencia existente de patógenos asociados a la actividad de la EII sigue sin resolver si son los causantes o son oportunistas que anidan en una pared intestinal inflamada y más permeable que en condiciones de normalidad. Varios estudios han implicado a la bacteria *Escherichiacoli* en la patogenia de la EII. Se ha evidenciado que la *Escherichiacol* asociada a mucosa y la *Escherichiacoli* intramucosa, así como las hemaglutininas que producen, son mucho más prevalentes en la EC (98% de las bacterias intramucosas eran *Escherichiacoli*), que en la CU (45%) y que en la población sin EII (2%) (19).

Esta *Escherichiacoli* invasiva parece estimular la producción de IL-8 y TNF- α , así como aumentar la permeabilidad intestinal de las uniones estrechas (*tightjunctions*), de modo que, según algunos autores, podría ser parte patogénica.

Todavía tenemos un conocimiento limitado y fragmentario de nuestra flora intestinal. Gracias a los avances técnicos, como los sistemas de secuenciación de nueva generación, se está empezando a comprender que existen alteraciones cuantitativas y cualitativas en la microbiota de pacientes con EII (Figura 2). Sin embargo, no se sabe si estas alteraciones son causa o consecuencia de la enfermedad. En algunos modelos animales se ha podido establecer una clara relación entre la presencia de determinadas bacterias comensales y la aparición de la enfermedad.

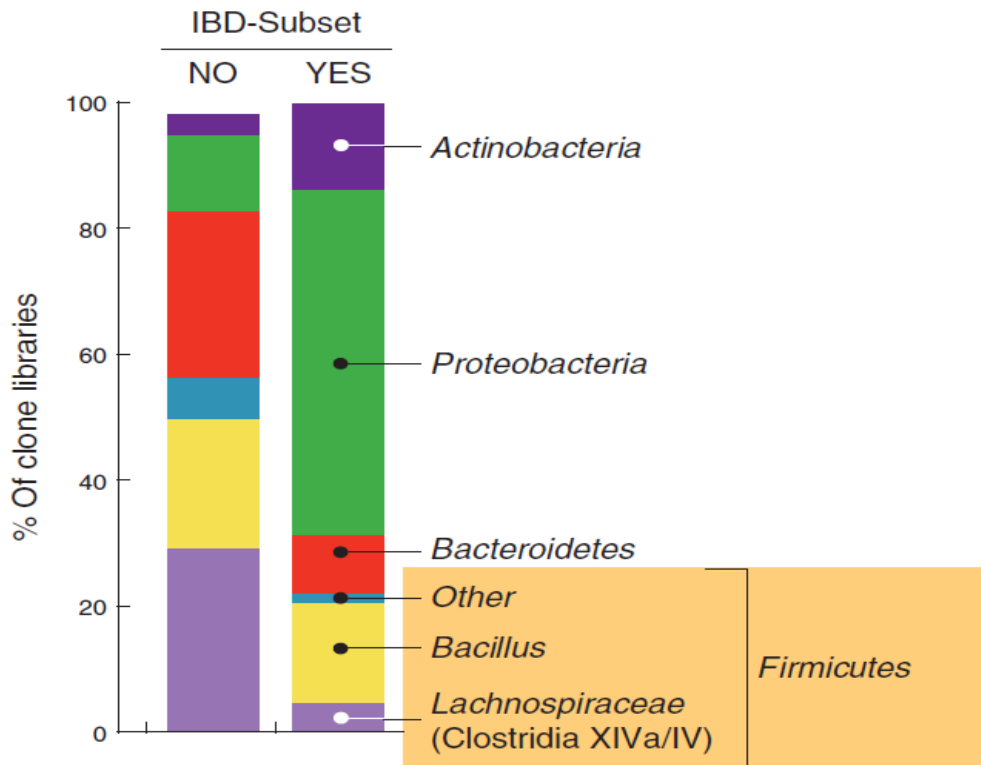


Figura 2. Disbiosis en la EII. Obtenida de *Frank et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007*.

En definitiva, el aumento que la incidencia de la EII está teniendo en las últimas décadas sugiere que, al menos, uno, sino más de los elementos patogénicos probables (genético, bacteriano-ambiental o inmune), está cambiando. Un aumento en los polimorfismos genéticos, una microflora alterada o una alteración en la interacción entre la microflora y el huésped pueden contener la clave patogénica. El aumento de incidencia de la EII se ha atribuido durante mucho tiempo a la “teoría de la higiene”, más conocida actualmente como la “hipótesis de la microflora”. Ambas hipótesis manejan la idea de que un ambiente excesivamente higiénico, probablemente influenciado también por el excesivo uso de antibióticos en las sociedades desarrolladas, ha disminuido la exposición de nuestro intestino a los antígenos bacterianos, de modo que nuestro sistema inmune sobrereactúa cuando se le expone a la flora comensal o a una disbiosis bacteriana.

✓ TRASTORNOS INMUNOLÓGICOS EN LA EIIC

En el proceso patogénico general de los síndromes que componen la que denominamos enfermedad inflamatoria intestinal, la alteración en el sistema inmune innato es fundamental. La mucosa del colon se ve inundada e invadida por la propia microbiota y las señales producidas inician el proceso efector del sistema inmune adaptativo con producción de proteínas inflamatorias (interleucinas), mediadores lipídicos proinflamatorios, migración de células inflamatorias con infiltración de la mucosa y producción de las lesiones conocidas. Este sistema se retroalimenta y entra en un bucle que no cesa y aumenta de intensidad, al no funcionar correctamente los procesos de autofagia y apoptosis.

- Tolerancia y control de la inflamación:

La lamina propia intestinal contiene una compleja población de células inmunes que equilibran la tolerancia inmunológica a la microbiota luminal con la necesidad de defenderse contra los patógenos, la entrada excesiva de la microbiota intestinal o ambos. El sello distintivo de actividad en la EII es una pronunciada infiltración de células de inmunidad innata (neutrófilos, células dendríticas y las células Natural Killer) en la lámina propia. El aumento y la activación de estas células en la mucosa intestinal eleva los niveles locales de TNF- α , IL 1 β , Interferon gamma y citoquinas de la vía IL23/Th 17.

En la colitis experimental, algunos linfocitos intestinales responden a antígenos microbianos, pero la medida concreta en que los antígenos microbianos impulsan a las linfocitos intestinales en la EII es desconocida.

Dos factores implicados en la patogenia de la EII son la apoptosis de células T y la función defectuosa de barrera del epitelio intestinal.

- Apoptosis de células T.

Existen diferencias en la respuesta de las células T entre pacientes con EC y CU, habiéndose detectado apoptosis defectuosa en células T de las mucosas en la

EC, pero no en la CU. En ambas enfermedades existe un incremento de las citoquinas producidas por macrófagos: IL6, IL 1 y TNF α .

- Función defectuosa de la barrera del epitelio intestinal

El epitelio intestinal constituye la interfase entre la microbiota intestinal y el tejido linfoide asociado con el sistema inmune gastrointestinal y juega un papel crítico en la respuesta inmune de la mucosa. Las células epiteliales intestinales mantienen funciones de barrera física contra la excesiva entrada de bacterias y otros antígenos desde el lumen intestinal a la circulación y también funciones inmunorreguladoras a través de la interacción con bacterias comensales y patógenas. Para ello utilizan proteínas receptoras de patrones moleculares presentes en los microorganismos como los TLRs o los NOD-Like Receptors (NLRs). La interacción de estos receptores con la flora comensal es crucial en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio. Estas células son también capaces de integrar señales que detecten microorganismos patógenos y transmitir esa información a través de la liberación de citoquinas al sistema inmunitario.

En la EII, el espacio paracelular presenta un aumento de la permeabilidad y la regulación de la permeabilidad por las uniones estrechas es defectuosa.

Otras defensas adicionales contra la invasión bacteriana son las células epiteliales especializadas e incluyen a las células caliciformes y las células de Paneth. Las células caliciformes regulan la producción de moco y los factores que contribuyen a la reparación epitelial. Las células de Paneth secretan péptidos antimicrobianos como las defensinas. La regeneración y reparación epitelial sirven para controlar y resolver en última instancia, la respuesta inflamatoria a la lesión. Sin embargo, en la EII, la respuesta inflamatoria da lugar a una lesión epitelial continua que provoca erosiones, úlceras y disminución de las defensinas. El resultado es una mayor exposición a la microbiota intestinal y la ampliación de la respuesta inflamatoria.

- Factores que desencadenan la cascada inflamatoria.

El sistema inmune parece ser el mediador principal en la patogenia de la EII, aunque su funcionamiento parece ser condicionado por el bagaje genético del individuo y su interacción con factores ambientales. Clásicamente se ha considerado que la EII estaba mediada por una respuesta alterada de la inmunidad adquirida (linfocitos T y B), fundamentalmente por una desregulación de los linfocitos T, de modo que prevalecía una respuesta inmune de linfocitos Thelper (Th1) (más típica de autoinmunidad), en la EC y una respuesta tipo Th2 (más típica de procesos alérgicos), en la CU.

Recientemente, gracias a investigaciones detalladas, se ha producido un cambio conceptual en la patogenia de la EII, habiéndose observado alteraciones relevantes en la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos, células *natural killer*) y en células epiteliales (células de Paneth y células dendríticas) que, probablemente sean primarias y condicionen la respuesta de la inmunidad adquirida.

También se han caracterizado subpoblaciones de células T reguladoras y células T efectoras Th17 con actividad proinflamatoria.

La autofagia es un proceso de la inmunidad innata por el cual son eliminados los componentes de las células. Se ha descubierto recientemente que un polimorfismo específico del gen ATG16L1, regula el proceso de autofagia, y que mutaciones en este gen incrementa el riesgo de desarrollar EII y en concreto EC.

- Respuesta inmune innata

El brazo innato del sistema inmune proporciona una respuesta inicial y rápida a los microbios. Las células de los receptores del sistema innato reconocen patrones generales microbianos (receptores de reconocimiento de patrones), en contraste con el reconocimiento de antígenos específicos por parte de los receptores del sistema adaptativo. El epitelio intestinal expresa diversos receptores del sistema innato que median en la defensa contra la microbiota

luminal y con las células presentadoras de antígeno para inducir los mecanismos de tolerancia que mantienen la homeostasis inmune en el intestino.

El sistema inmune innato posee distintas estructuras funcionales interrelacionadas, de manera que es capaz de reconocer incluso sutiles cambios en la composición de la microbiota u otros antígenos (alimentarios, etc), por lo que es esencial en los mecanismos de tolerancia y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en el intestino.

Forman parte del sistema inmune innato:

- Estructuras moleculares:

- Los receptores de membrana (en todas las células), *denominados toll-like receptors* (TLR) que son la primera línea de reconocimiento de la estructura molecular de antígenos.
- Los receptores intracelulares (NOD y MyAD8 entre otros), que recibirán la información de los anteriores y la transmitirán al sistema PPAR γ .
- El sistema PPAR γ , que activará los factores que transcribirán la información a los genes del núcleo celular.

- Estructuras celulares:

- Células M (captan las bacterias de la luz intestinal y las traslocan a la lámina propia donde pueden ser detectadas por las células del sistema inmunitario), linfocitos intraepiteliales y linfocitos T *natural killer* (NKT).
- Células dendríticas. Emiten proyecciones de su citoplasma que pasan entre las células epiteliales y llegan a la luz del intestino para capturar bacterias que serán presentadas a los linfocitos del sistema MALT.
- Monocitos- macrófagos.
- Granulocitos.

- Células de Paneth y las sustancias bactericidas y bacteriostáticas producidas (defensinas y lisozima).

Las células presentadoras de antígenos activadas, en particular las células dendríticas, presentan a continuación antígenos pépticos a los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios del intestino, tales como las placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos y folículos linfoides aislados. Esta interacción inicia una respuesta inmune adaptativa, tras el desarrollo de los linfocitos de memoria. Una de las características de la inmunidad adaptativa es una respuesta rápida y robusta a la siguiente estimulación por el antígeno, es decir, la memoria inmunológica.

Parecen especialmente relevantes los hallazgos de déficit de defensinas en la mucosa del intestino delgado y colon en los pacientes con EC. Existen dos tipos de defensinas, las α -defensinas y las β -defensinas que actuarían en el colon mediante vías dependientes de NF κ B.

El factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B)

El NF- κ B, es una familia de factores de transcripción con importantes funciones en diversos procesos fisiológicos y patológicos, y en la respuesta celular a la hipoxia, estrés e isquemia. Además el papel de NF- κ B en la inflamación se ha demostrado con estudios genéticos e inhibidores químicos, y ha sido punto focal de atención en el intento de comprender cómo las señales extracelulares inducen la expresión específica de grupos de genes (20).

El NF- κ B forma parte de la familia Rel de factores transcripcionales, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros (21). Estas proteínas son: p50 (NF- κ B1 y su precursor p105), p52 (NF- κ B2 y su precursor p100), p65 (también llamado RelA), c-Rel y RelB; que están caracterizados por la presencia de un dominio homólogo N-terminal, denominado Rel (RHD), responsable tanto de la homo como heterodimerización, así como de la unión a la secuencia específica del DNA. RelA,

c-Rel, y RelB también contienen un dominio C-terminal de activación de la transcripción (TAD), sin embargo las subunidades p52 y p50 no tienen el dominio TAD y la transcripción la llevan a cabo por la unión con otros factores que regulan la transcripción (20). La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional, en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65. Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear BCL-3.(22). Los precursores p105 y p100, procesados por el proteosoma, dan lugar a las formas activas p50 y p52 respectivamente (Figura 3).

En la literatura está bien establecido que el NF- κ B es activado por una amplia variedad de estímulos, que incluyen agentes biológicos como lipopolisacáridos, citocinas inflamatorias, ésteres de forbol y estímulos citotóxicos como agentes de quimioterapia, luz ultravioleta y radiaciones ionizantes entre otros (23).

Dado que existen tantos activadores de NF- κ B, es de esperar que este factor de transcripción controle diversos genes y se encuentre involucrado en varios procesos biológicos y enfermedades, incluyendo desarrollo embriológico, respuesta inmune, respuestas inflamatorias, proliferación, cáncer, arteriosclerosis entre otras.

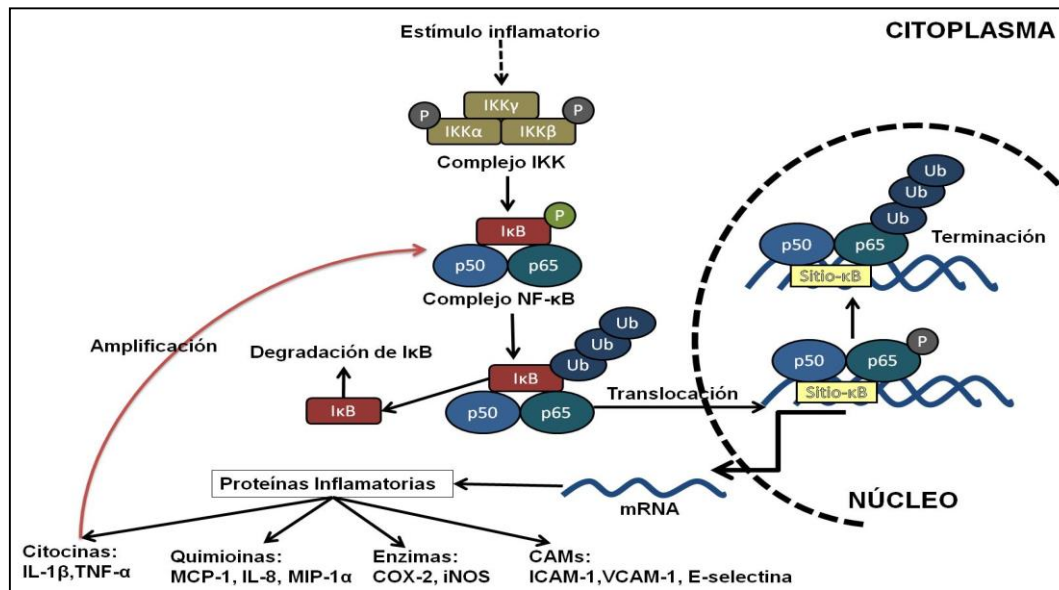


Figura 3- En condiciones normales, NF-κB (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma, formando un complejo inactivo con la subunidad inhibitoria IκB. Después de su activación, IκB es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinizada. El fosfato verde significa fosforilación que tiene como resultado una regulación negativa de la proteína fosforilada, mientras que el fosfato gris indica activación

Vías de señalización

Vía clásica o canónica

La vía de señalización más importante y mejor estudiada, utilizada por la mayoría de estímulos es la clásica, la cual se lleva a cabo principalmente por los heterodímeros RelA/p50 y c-Rel/p50. Esta vía se centra en la activación del complejo trimérico de la IκB cinasa (IKK), complejo formado como ya hemos dicho de dos subunidades catalíticas (IKK-β, IKK-α) y una subunidad reguladora NEMO (24).

Una vez que el complejo IKK es activado, se fosforila la IκB-α en la Ser32 y en la Ser36, llevando a su poliubiquitinación y su posterior degradación por el proteosoma 26S, permitiendo así, la liberación de NF-κB (representada principalmente por los heterodímeros p65/p50) que se trasloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción mediante la unión a secuencias de DNA conocidas como sitios κB, para llevar a cabo la transcripción de genes específicos,

entre ellos, genes de aproximadamente 27 citoquinas y quimiocinas, moléculas de adhesión, receptores de citoquinas, moléculas de histocompatibilidad y otras, incluyendo el de $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ como hemos dicho anteriormente, el cual facilita la terminación de la respuesta transcripcional por la unión a los dímeros de NF- κ B en el citoplasma (20).

Los genes regulados por NF- κ B son los responsables de la codificación de proteínas inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, la proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa (MIP-1 α) y de la proteína quimiotáctica (MCPs), de las moléculas de adhesión celular de superficie, tales como E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, de las enzimas inducibles incluyendo COX2 y la iNOS, y de las moléculas de supervivencia, como la molécula inhibidora de la apoptosis celular 1 y 2 (IAPs) y BCL-XL.

Una serie de estímulos se ha demostrado que activan NF- κ B a través de la vía clásica, incluyendo citoquinas proinflamatorias, productos bacterianos, factores de crecimiento y la hipoxia (23). NF- κ B también es activado por la luz ultravioleta, por el estrés oxidativo, daño endotelial y por otros mecanismos

Vía alternativa o no canónica

Junto a esta activación clásica de NF- κ B, hay una vía de activación de NF- κ B independiente de IKK- γ (NEMO) importante para el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, la homeostasis y la inmunidad adaptativa. Es inducida por; el factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF), linfotóxina β (LT β), CD40, T-virus linfotrópico humano y virus de Epstein-Barr (EBV), y en ella participa la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK fosforila al homodímero IKK α desencadenando su interacción con la proteína p100 que está unida a RelB. La fosforilación de p100 es seguida de su procesamiento en el proteosoma a p52 y por la translocación del complejo RelB/ p52 al núcleo (20).

NF- κ B y la resolución de la inflamación

La hipoxia activa el sistema de NF- κ B en el riñón de rata y provoca la producción de factores inflamatorios (25). En un estudio *in vivo* (26) se ha demostrado que durante la isquemia renal se produjo la activación de NF- κ B y alcanzó su punto máximo después de 15 minutos de la reperfusión, lo que tuvo como consecuencia la liberación de los mediadores de la inflamación.

Aunque el NF- κ B actúa principalmente como iniciador de la inflamación, hay estudios que sugieren que también puede actuar en la modulación de ésta (27). La inhibición de NF- κ B después del inicio de la agresión inflamatoria, y durante la fase de resolución, podría en ciertas condiciones prolongar la inflamación más que inhibirla, retrasando en este caso la reparación del tejido (27).

Se ha demostrado que la activación de NF- κ B en los leucocitos reclutados durante el inicio de la inflamación se asocia con la expresión de genes pro-inflamatorios, mientras que la activación durante la resolución de la inflamación se asocia con la expresión de genes anti-inflamatorios y la inducción de apoptosis. La inhibición de NF- κ B en la resolución de la inflamación prolonga la respuesta inflamatoria y previene la apoptosis. Esto sugiere que NF- κ B tiene un papel anti-inflamatorio *in vivo* participando en la regulación de la resolución inflamatoria (27).

- Respuesta inmune adquirida

Los linfocitos T se subdividen en dos tipos: a) Linfocitos T ayudantes, también conocidos como linfocitos T helper (Th) o linfocitos CD4+ y Linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) o linfocitos CD8+. Clásicamente, la EII se ha considerado una enfermedad relacionada con un aumento de linfocitos CD 4+ que son reclutados intraepitelialmente en el intestino. El campo de la inmunología ha evolucionado ampliamente en la última década, habiéndose descubierto, recientemente, diversos subtipos de linfocitos T con producción de citoquinas específicas y funciones reguladores implicadas en patologías autoinmunes. Entre

los distintos subgrupos descritos, cabe destacar los linfocitos Th17 y las células T reguladoras (Treg) por su implicación en la patogenia de la EII y por la interacción reguladora que se produce entre ellas.

Los linfocitos T CD4⁺ se activan al entrar en contacto con antígeno a través de las células *antigen presenter cell* (APC). Los linfocitos CD4⁺ *naive* pueden diferenciarse en Th1, Th2 o Th17, en función de las citoquinas que se secreten (Figura 4).

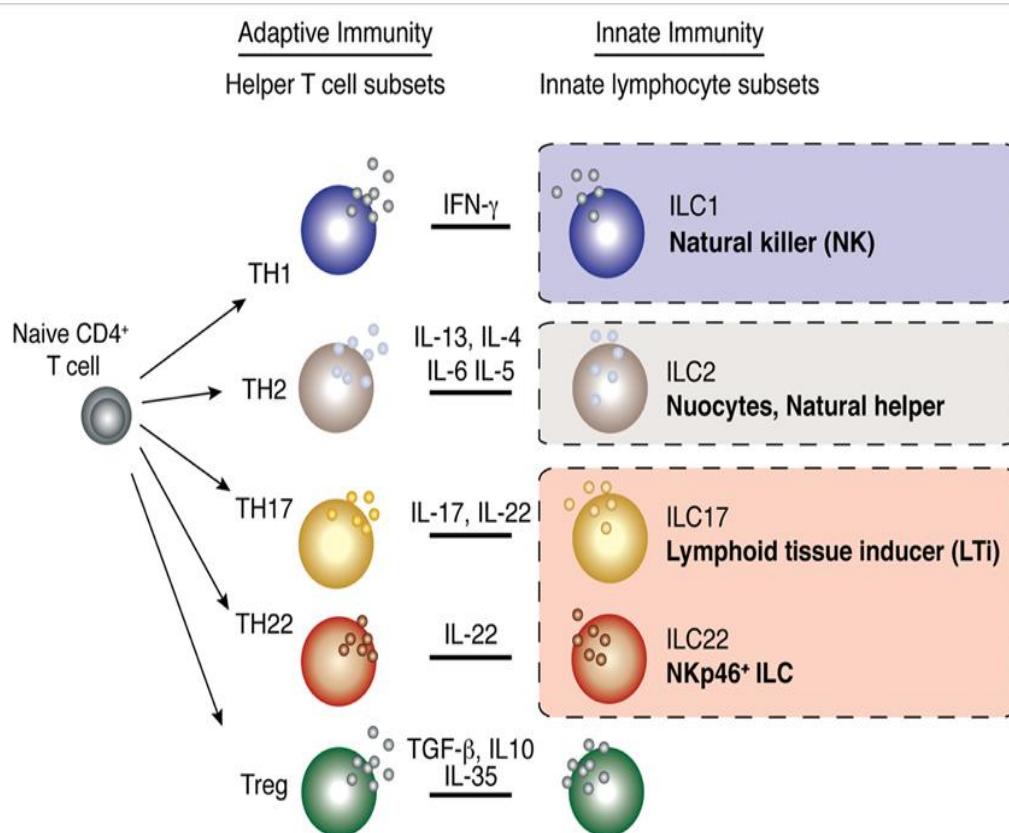


Figura 4: Paralelismo entre células linfoides innatas y linfocitos Th. Obtenida de Rankin et al. *Front. Immunol.* 2013

La mucosa inflamada de la EII tiene una infiltración masiva de células Th17 que se ubican en la mucosa en el caso de la colitis ulcerosa. Datos muy recientes parecen indicar que la producción de IL-17 está elevada, fundamentalmente, en la CU, mientras que en la EC se incrementa, fundamentalmente, el INF- γ .

Además, la citoquina TNF- α se ha erigido como elemento fundamental que rige el trastorno inmune y, de hecho, el desarrollo terapéutico de las últimas décadas se ha centrado en contrarrestar esta alteración de la inmunidad adquirida, consiguiendo una inmunosupresión y/o bloqueo del TNF- α

Las células Treg representan otro tipo de células Th que desarrollan una labor inmunosupresora. Las células Treg secretan citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el TGF- β . En situaciones de eubiosis en las que predomina la flora comensal, la respuesta inmunitaria es tolerogénica y predomina la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β). En situaciones de disbiosis la respuesta inmunitaria debe reconocer y responder a los patógenos produciéndose la inflamación (Figura 5). Así, el bloqueo de la IL-10, en modelos experimentales animales, conlleva el desarrollo de inflamación intestinal. Por tanto, se requiere un fino balance entre las Th17 y las Treg, para así evitar una inflamación excesiva.

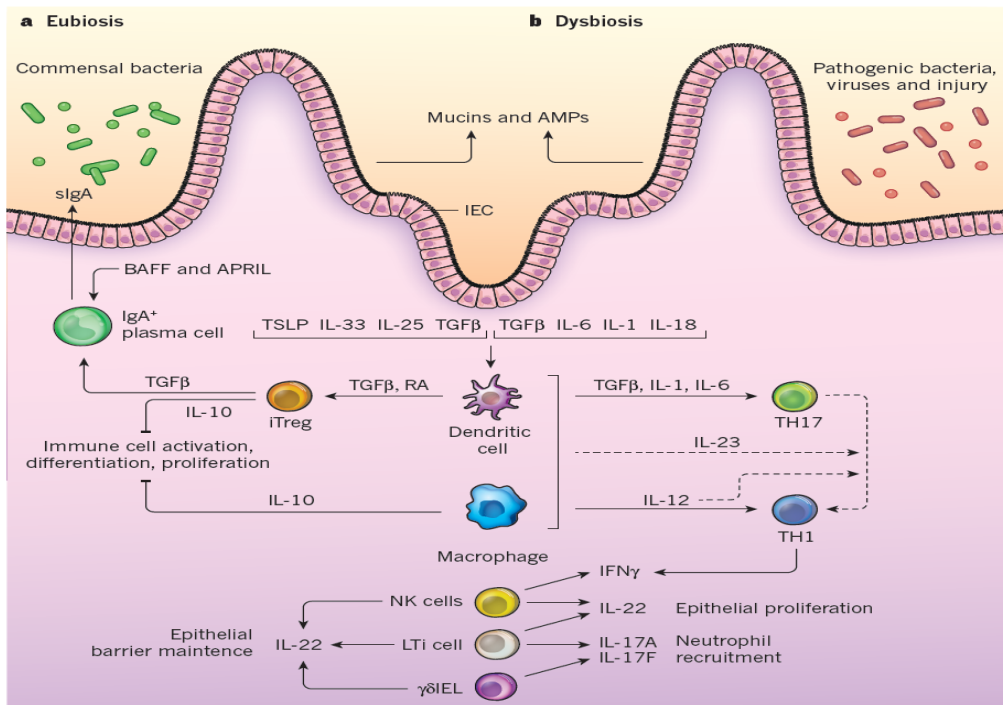


Figura 5: Respuesta inmunitaria a microorganismos patógenos en el intestino

La caracterización de la función e interrelación entre las células th17 y las Treg ayudará a entender el complejo balance entre la tolerancia y la autoinmunidad. Las Th17 dada su localización y plasticidad, parecen tener una posición privilegiada para entender la inmunopatogénesis de la EII y, por tanto, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, algunas de las cuales ya se están desarrollando. Como cambiar el balance inmunitario de la autoinmunidad hacia la tolerancia será la piedra angular de las nuevas estrategias terapéuticas de los próximos años.

Esta última figura (Figura 6) resume lo que sería el desarrollo de la EII en términos generales. Alteraciones en diversos factores genéticos que tienen que ver con diferentes procesos celulares como la secreción de péptidos antibióticos, autofagia, la producción de citoquinas, o fallos en la función de barrera del epitelio intestinal pueden aumentar la susceptibilidad a desarrollar EII. Estas alteraciones genéticas necesitan factores ambientales (colonización por diversos microorganismos, dieta, estrés, tabaco, uso de antibióticos o fármacos, etc) para desencadenar una respuesta inflamatoria aguda. En los pacientes susceptibles otro factor que puede contribuir al desarrollo de la EII sería la incapacidad de controlar de forma adecuada la inflamación aguda debido a alteraciones del sistema inmunitario, como fallos en los linfocitos T-reguladores, en el funcionamiento de linfocitos T efectores o en las células del sistema inmunitario innato como macrófagos o linfocitos innatos. Estos fallos conducirían al establecimiento de la inflamación crónica que en última instancia llevaría al desarrollo de fibrosis, fístulas, abscesos y a la aparición de cáncer o manifestaciones extraintestinales.

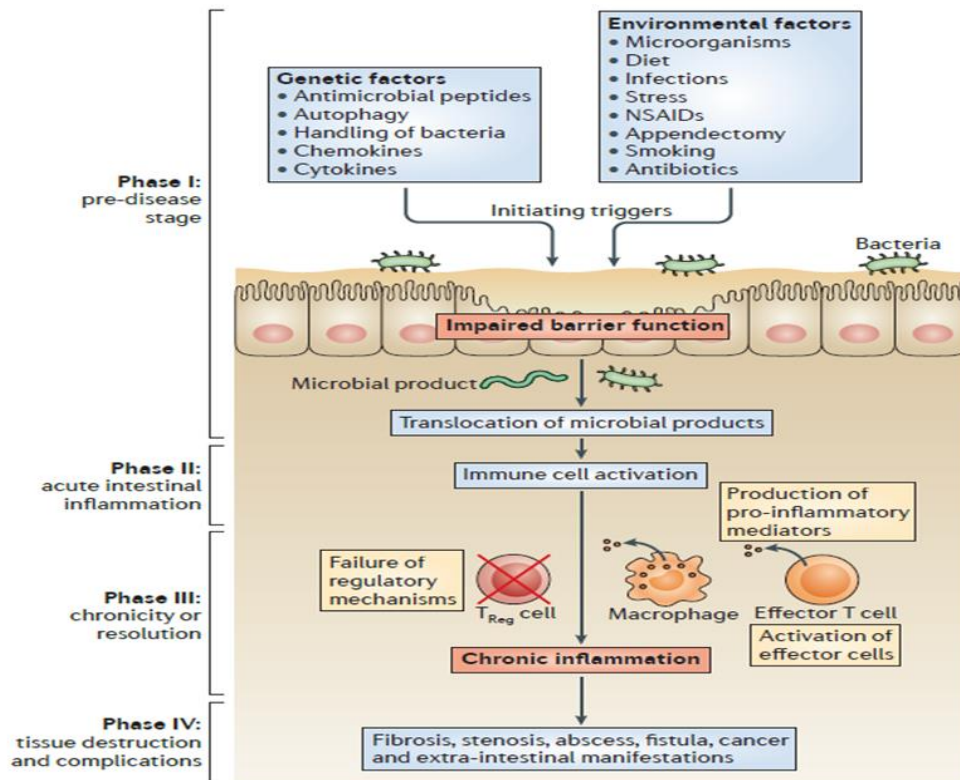


Figura 6: Desarrollo de la EII

1.1.3 DIAGNÓSTICO CU

✓ ASPECTOS CLÍNICOS

La EII es un trastorno inflamatorio crónico del intestino que engloba dos entidades clínicas: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En un 10-15% de pacientes, la EII no puede etiquetarse de ninguna de las dos entidades, por incongruencia entre aspectos clínicos, endoscópicos o histológicos, de forma que a este grupo de pacientes se les asigna el término de colitis inclasificable.

Ambas entidades se caracterizan por la cronicidad y la heterogeneidad en su forma de presentación, curso clínico, pronóstico y desarrollo de complicaciones. Durante la evolución de la enfermedad, se alternan períodos de actividad (brotes o

recidivas), con intensidad y gravedad variable, y otros períodos de inactividad o remisión.

La CU se caracteriza por afectar exclusivamente al colon aunque a veces se afecta el ileon terminal, denominándose ileitis por reflujo. La inflamación es continua y superficial por lo que el daño está fundamentalmente localizado en la capa mucosa del colon, con la aparición de criptitis y abscesos de las criptas.

El diagnóstico se establece en función de una combinación de criterios clínicos, endoscópicos, histológicos y radiológicos. Es obligado hacer diagnóstico diferencial con otras formas de colitis aguda o crónica, como son: colitis microscópica, infecciosas, pseudomembranosa, por fármacos, por agentes físicos, isquémica, eosinofílica, causas metabólicas y hormonales, neoformaciones, enfermedades sistémicas, diverticulosis y colitis funcionales (28),(29).

El diagnóstico se basa en una minuciosa historia clínica, comenzando por la existencia de antecedentes familiares de EII, pues se ha demostrado la mayor frecuencia de aparición de la enfermedad en familiares de primer grado (se ha sugerido un riesgo en torno a un 5% de padecerla a lo largo de su vida).

La presencia o el antecedente de manifestaciones extraintestinales típicas de la EII aportan un dato más de sospecha diagnóstica. Fundamentalmente, afectación articular (artropatía periférica o axial, con frecuencia espondilitis o sacroileitis), ocular (uveítis, epiescleritis), cutáneomucosa (pioderma gangrenoso, eritema nodoso, aftas orales recurrentes) o hepática (colangitis esclerosante primaria, pericolangitis) entre otras. También se debe tener en cuenta la posible asociación de la EII con otras enfermedades de origen inmune (enfermedad celíaca, vasculitis, etc.).

En los años 80 se establecieron los criterios de Leonard-Jones para el diagnóstico de la CU y la EC. Se requiere la presencia de, al menos, 2 criterios para el diagnóstico, siendo el histopatológico el definitivo (30).

Tabla 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LENNARD-JONES

CRITERIOS CLÍNICO	<ul style="list-style-type: none"> • RECTORRAGIA • DIARREA CRÓNICA • DOLOR ABDOMINAL • MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES
CRITERIOS RADIOLÓGICOS	<ul style="list-style-type: none"> • CAMBIOS MUCOSOS: Mucosa granular, úlceras espiculares o en botón de camisa, pseudopólipos • CAMBIOS DEL CALIBRE: Estrechamiento de la luz, acortamiento del colon , pérdida de haustración
CRITERIOS ENDOSCÓPICOS	<ul style="list-style-type: none"> • Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable • Exudado o ulceraciones • Hemorragia al roce o espontánea • Pseudopólipos o pólipos • Lesiones continuas y afectación constante del recto
CRITERIOS ANATOMO-PATOLÓGICOS	<ul style="list-style-type: none"> • MAYORES: inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de células caliciformes. • MENORES: infiltrado inflamatorio crónico difuso, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide

El síntoma más frecuente es la rectorragia. En general, más copiosa cuanto mayor es la gravedad. Si esta es muy importante puede provocar hipovolemia y bajo gasto. Suele asociarse tenesmo rectal. El segundo síntoma más frecuente es la

diarrea diurna y/o nocturna. Se manifiesta como aumento del número de deposiciones o como disminución de la consistencia. Normalmente aparece como deposiciones frecuentes y de poca cuantía, típico de la diarrea por lesión del colon. El dolor abdominal suele ser cólico de localización variable que suele mejorar tras la deposición. Es frecuente la emisión anal de pujos de moco y sangre reiterados que suele traducir la afectación rectal severa. En colitis más extensas pueden asociarse síntomas sistémicos como pérdida de peso, febrícula o fiebre, malestar general e hiporexia. Un 15% de los pacientes pueden debutar como casos graves con hemorragia digestiva baja, perforación colónica o megacolon tóxico.

La exploración física puede encontrarse dentro de la normalidad o podemos evidenciar un abdomen patológico, con alteración de los ruidos hidroaéreos, distensión, timpanismo y/o dolor, restos mucosanguinolentos o estenosis en el tacto rectal o alteraciones en la inspección perianal. Si hay afectación sistémica puede evidenciarse febrícula o fiebre, palidez cutáneo-mucosa que traduzca anemia, signos de manifestaciones extraintestinales típicas y, en casos de gravedad, taquicardia, alteraciones de la tensión arterial o deficiente estado nutricional, entre otros. Es recomendable realizar una evaluación nutricional básica mediante peso, talla y determinación de índice de masa corporal (IMC).

El curso o patrón de la enfermedad consta frecuentemente de periodos de recaída clínica que alternan con otros de remisión (5% presentarán un curso continuo sin remisión), atendiendo a ese patrón, tras los tres primeros años de diagnóstico, clasificamos las recaídas en frecuentes (≥ 2 anuales) o infrecuentes (≤ 1 anual) (31).

✓ PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

- **Pruebas de laboratorio:** Será útil la información del hemograma, bioquímica básica y hepática, metabolismo del hierro y reactantes de fase aguda (marcadores de actividad biológica). Puede existir ferropenia o anemia, leucocitosis, trombocitosis, hipoproteinemia, elevación de reactantes de fase aguda como velocidad de sedimentación (VSG) y/o proteína C reactiva (PCR). En algunos casos hay alteración de la bioquímica hepática, lo que obliga a descartar la asociación de colangitis esclerosante primaria, entre otras entidades. La PCR tiene una vida media corta y refleja cambios en la actividad inflamatoria de forma muy precoz. Se están perfilando otros biomarcadores como complementarios al diagnóstico, aunque aún no se puede recomendar su uso sistemático en el estudio inicial (32).
- **Marcadores fecales:** En los últimos años se ha propuesto la determinación de marcadores de inflamación intestinal, como la calprotectina (proteína procedente de los neutrófilos que traduciría la migración de estos a través de la pared intestinal inflamada hasta la mucosa). La calprotectina permanece estable en heces 7 días y sus niveles se correlacionan bien con la actividad inflamatoria endoscópica e histológica. Ofrece una alta sensibilidad diagnóstica, aunque es poco específica. Se ha propuesto para la distinción frente a patología funcional (valor predictivo positivo para la EII, frente al síndrome de intestino irritable, del 85-90%) y para la previsión de las recaídas en EII. Aún no se han determinado con exactitud unos niveles diagnósticos uniformes. Otros marcadores estudiados son la lactoferrina, elastasa, lisozima, lactoferrina y, recientemente, el S100A12 (33).
- **Serología:** Se ha descrito la presencia de autoanticuerpos y anticuerpos antimicrobianos asociados a la EII. La positividad aislada de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos perinucleares atípicos (pANCA) es más específica en la CU (88,5%), aunque con una baja tasa de sensibilidad (50-60%). La

combinación de pANCA positivos y anticuerpos anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) negativos puede ayudar en algunos casos a diferenciar la CU de la EC. (Sensibilidad: 51,3%, Especificidad: 94,3%) (34).

- **Microbiología:** Es obligatoria la recogida de muestras de heces para despistaje de patología infecciosa, mediante coprocultivo e investigación de parásitos y toxina de *Clostridium difficile* (recomendable varias muestras). La realización de *Mantoux con Booster* se hace desde el inicio no sólo para despistaje de tuberculosis, sino también para evitar complicaciones de posibles tratamientos inmunosupresores. En colitis graves y/o refractarias al tratamiento debe descartarse infección por citomegalovirus (CMV) y *Clostridium difficile*. La reactivación de CMV no es infrecuente en pacientes inmunocomprometidos por la propia enfermedad o por el uso de fármacos inmunosupresores. No se ha establecido aún el método de diagnóstico definitivo. El estudio de biopsias colorrectales que muestren múltiples cuerpos de inclusión intranucleares es el más empleado.
- **Endoscopia:** La ileocolonoscopia con toma de biopsias es la técnica básica de diagnóstico en ausencia de gravedad. Mostrará una afectación de la mucosa de carácter continuo en distintos segmentos colónicos. La clasificación de Montreal distingue, según la extensión de la afectación macroscópica de la mucosa, entre proctitis o afectación limitada al recto (E1), colitis izquierda o distal al ángulo esplénico (E2) y colitis extensa, que se extiende proximalmente al ángulo esplénico (E3). La inflamación puede sufrir una extensión o una regresión a lo largo del tiempo. Se han descrito variantes atípicas de afectación por CU: la indemnidad rectal, la afectación parcheada cecal o periapendicular y la denominada “ileitis por reflujo” (aunque no está claro que sea esa su patogenia). La actividad inflamatoria puede ser leve (mucosa de superficie granujienta con edema, eritema, pérdida de brillo, ausencia de visualización de vascularización submucosa), moderada (microulceraciones, friabilidad al roce, exudado fibrinoso) o grave (úlceras mayores de 5 mm, confluentes, profundas,

sangrado espontáneo). Existen diferentes índices de puntuación endoscópica para su valoración, aunque ninguno de ellos ha sido validado, que se utilizan más en ensayos clínicos que en práctica diaria. En colitis crónicas, en periodos de inactividad inflamatoria o quiescencia, la mucosa se muestra atrofiada, con secuelas cicatriciales, la luz puede presentar tubulización, disminución de la haustración, acortamiento de la longitud del colon o estenosis, y es frecuente la presencia de pseudopólipos inflamatorios y puentes de mucosa respetada. En colitis grave se planteará realizar rectosigmoidoscopia con mínima insuflación y sin preparación intestinal, para evitar complicaciones y demoras en el diagnóstico.

- **Histopatología:** Cabe destacar la importancia de una adecuada y suficiente toma de biopsias de colon por tramos y del recto, incluyendo, si es accesible, mucosa del íleon terminal (al menos 5 localizaciones). Es característica la afectación difusa de la mucosa colorrectal. No se ha determinado el número de alteraciones necesarias para el diagnóstico de CU, aunque se establece con: la existencia de plasmacitosis basal, aumento celular intenso, difuso y transmucoso de la lámina propia y ensanchamiento de la mucosa o alteraciones de la arquitectura criptal. En las dos primeras semanas tras el inicio de los síntomas, pueden no presentarse los hallazgos típicos de CU. La biopsia en la enfermedad quiescente o ya tratada puede ser normal o persistir alguna de las alteraciones descritas.
- **Radiología:** En el enfoque inicial puede resultar de utilidad la realización de una *radiografía simple de abdomen* que podría detectar signos indirectos como tubulización, acortamiento de la luz colónica o pérdida de haustración. Resulta imprescindible en la valoración inicial de un brote grave por sospecha de perforación o dilatación colónica (≥ 6 cm) o de asas de intestino delgado. Las técnicas con mayor resolución de imagen, como la resonancia magnética abdominal o la tomografía axial computerizada (TAC), pueden aportarnos información que sugiera EII y sus complicaciones. Sin embargo, en ausencia de

gravedad, en el debut de la enfermedad, las técnicas endoscópicas suelen precederlas en el estudio inicial. El enema opaco se utiliza para el diagnóstico con menos frecuencia, aunque puede aportar información importante como es la presencia de estenosis, pólipos, masas endoluminales o fístulas.

- **Medicina nuclear:** La gammagrafía con leucocitos autólogos marcados puede mostrar una captación patológica en zonas intestinales con actividad inflamatoria aguda y ser orientativa en cuanto a la extensión de la enfermedad, pero carece de especificidad para EII (35).

✓ CLASIFICACIÓN DE LA COLITIS ULCEROSA

Las características clínicas de la CU y su curso evolutivo y pronóstico, dependen de la extensión de las lesiones y de la actividad o gravedad de las mismas.

En la clasificación de Montreal y en la guía de la *European Crohn's and Colitis Organisation* (ECCO) se definen los criterios establecidos por consenso para la tipificación de la enfermedad (36),(37).

La clasificación de Montreal se basa en un informe que se publicó en el año 2005 del grupo de trabajo de Montreal que trató de integrar los aspectos clínicos, moleculares y serológico de la EII en una clasificación que mejorase las anteriores de Viena y Roma (38).

Según la clasificación de Montreal, la CU se clasifica de la siguiente manera, según la extensión (denominada E):

- E1: Proctitis ulcerosa con extensión limitada a recto. Su límite más proximal sería distal a la unión rectosigmoidea.
- E2: Colitis izquierda o distal. Se extendería al recto y colon distal al ángulo esplénico.

- E3: CU extensa o pancolitis. La colitis se extendería a tramos más proximales al ángulo esplénico.

En el caso de la gravedad (denominada S de severity):

- S0: Colitis en remisión. No hay síntomas de la enfermedad.
- S1: Colitis leve. 4 o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de VSG.
- S2: Colitis moderada. Criterios intermedios entre leve y grave. Sin signos o con signos mínimos de afectación sistémica.
- S3: Colitis grave. 6 o más deposiciones al día con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia, aumento de VSG y signos de afectación sistémica grave.

La extensión de la enfermedad tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. También se relaciona con un mayor riesgo de cáncer de colon.

✓ ÍNDICES DE ACTIVIDAD

Valorar la actividad de la CU tiene importancia a corto plazo, para realizar el tratamiento más adecuado del paciente que tiene un brote. Sin embargo, también se ha comprobado que la actividad de la enfermedad durante los tres primeros años del diagnóstico condicionará el curso evolutivo los siguientes cinco años. La actividad y gravedad de la CU también ha tratado de medirse con índices descritos para valorar, de forma objetiva, la respuesta a diferentes tratamientos.

- Índices de actividad clínica
 - Índice de Truelove-Witts: Es el índice de actividad clínica más utilizado en el que se incluyen cuatro variables clínicas y dos de laboratorio.

TABLA 2. INDICE DE TRUELOVE-WITS MODIFICADO

PUNTUACION	3 PUNTOS	2 PUNTOS	1 PUNTO
Nº DEPOSICIONES	> 6	4-6	< 4
SANGRE	+ /+++	+	-
HEMOGLOBINA	< 10	10-14	> 14
ALBÚMINA (g/l)	< 30	30-32	> 33
FIEBRE (°C)	> 38	37-38	< 37
TAQUICARDIA	> 100	80-100	< 80
VSG	> 30	15-30	< 15
LEUCOCITOS	> 13.000	10.000-13.000	< 10.000

Distingue entre enfermedad en remisión y con actividad, diferenciándose entre actividad leve o grave, pudiéndose considerar moderada una situación intermedia. No es un índice válido en las proctitis, ni da un valor cuantitativo a la actividad, pero se recomienda su uso a la hora de plantearse el ingreso de los pacientes. En él se basan las clasificaciones de actividad de la CU de Montreal, de *European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO)* y del *American College of Gastroenterology (ACG)*

- Leve: Si hay < 4 deposiciones al día con o sin sangre, sin signos de toxicidad sistémica, es decir, temperatura < 37,5 °C, frecuencia cardíaca < 90 lpm, VSG < 30 mm/h y Hb > 10,5 g/dl.

- Moderada: Si el paciente tiene > 4 deposiciones al día con escasos signos de toxicidad sistémica.

- Grave: Si tiene > 6 deposiciones al día con sangre y signos de toxicidad como fiebre (temperatura > 37,5° C), taquicardia (frecuencia cardíaca > 90 lpm), elevación de la VSG (> 30 mm/h) o anemia (Hb <10,5 g/dl).

- *Fulminante*: Si el paciente tiene > 10 deposiciones al día, sangrado persistente, signos de toxicidad, distensión e hipersensibilidad abdominal, necesidad de transfusiones y dilatación colónica. Este último apartado se diferencia solo en la clasificación del ACG. En realidad, la colitis fulminante sería una descripción retrospectiva de pacientes con colitis grave que requirieron colectomía.

- Índice de Actividad (AI, *Activity Index*) o de Seo: También se basa en síntomas y datos de laboratorio: número de deposiciones, sangre en las heces, albúmina, hemoglobina y VSG, es de cálculo más complejo.
 - Índice Rachmilewitz o *Clinical Activity Index* (CAI): Incluye número semanal de deposiciones, cantidad de sangre en las heces, fiebre y/o dolor abdominal, VSG, hemoglobina y la valoración del médico, obteniéndose una puntuación cuantitativa entre 0 y 29 puntos.
 - Índices de Lichtiger y de Ho: Son útiles en pacientes graves, y valoran la respuesta a la ciclosporina. Entre sus variables incluyen el dolor abdominal y el peritonismo, y la dilatación colónica.
- Índices endoscópicos puros

Entre los que se encuentran el índice de Baron, el índice de Baron modificado, evaluación sigmoidoscópica de Powell-Tuck y el índice endoscópico de Rachmilewitz.

- Índices mixto
 - Índice de la clínica Mayo o UCDAI (*Ulcerative Colitis Disease Activity Index*): elaborado por la conjunción de datos clínicos, endoscópicos y la valoración global del médico que incluye el número de deposiciones, la cantidad de sangre en las heces, la actividad endoscópica y la valoración global del médico. El subíndice endoscópico es el más utilizado en la práctica clínica. El índice de Mayo predice la corticorrefractariedad de un brote grave de CU en caso de no haber

mejoría a los 3 y 5 días de inicio del tratamiento. Este índice se utiliza en numerosos trabajos en los que se valora la respuesta a tratamientos, pero empleando puntuaciones distintas y más o menos estrictas para definir la respuesta clínica, la remisión clínica o endoscópica.

- Índices histológicos

La correlación de los índices histológicos con los clínicos y endoscópicos es discreta, de hecho, la ausencia de lesiones mucosa en la endoscopia (curación mucosa), no refleja una ausencia histológica de inflamación. Los dos más empleados son el índice de Ryely y el índice de Geboes.

1.1.4 TRATAMIENTO

No existe en la actualidad un tratamiento curativo para la CU. El objetivo del tratamiento farmacológico es inducir y mantener la remisión clínica en un escenario libre de esteroides, proporcionar un alivio sintomático, controlar la actividad de la enfermedad, mantener un estado de nutrición apropiado y conseguir una calidad de vida para el paciente lo más cercana posible a la de una persona sana y, finalmente, evitar cirugías innecesarias. Los fármacos más utilizados incluyen el ácido 5-amino salicílico (5-ASA), antibióticos, corticoides, las terapias inmunomoduladoras y las terapias biológicas, de manera que el abordaje quirúrgico se reserva para casos mal controlados

En las últimas décadas se han producido avances significativos en cuanto al arsenal terapéutico con el que contamos en la CU, fundamentalmente con el uso de inmunosupresores y fármacos biológicos, entre ellos los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de necrosis tumoral (TNF). La elección de una terapia u otra va a depender, en gran medida, de factores como el grado de actividad inflamatoria, la extensión y gravedad del brote, las complicaciones extraintestinales, la aparición de efectos adversos y la relación coste-efectividad.

La extensión influirá en la vía de administración de los fármacos; en este sentido, la CU distal (englobando en ella la afectación rectal o hasta el ángulo esplénico) permite el tratamiento tópico y/o sistémico.

A pesar de que clásicamente el propósito del tratamiento de mantenimiento ha sido la remisión clínica, las evidencias recientes apuntan a que el verdadero objetivo del tratamiento sería conseguir la desaparición de las lesiones mucosas. La llamada “cicatrización mucosa” es ahora uno de los objetivos primarios de los estudios terapéuticos y comienza a ser ya un objetivo en la práctica clínica, debido a que se ha asociado al mantenimiento de la remisión clínica y a la reducción de tasas de hospitalización y de resección quirúrgica, tanto en CU como en EC, así como a la disminución en el consumo de recursos sanitarios.

✓ SALICILATOS

Los aminosalicilatos son el tratamiento de primera línea en la inducción y el mantenimiento de la colitis ulcerosa cuya utilidad en enfermedad inflamatoria se conoce desde hace 70 años.

El 5-ASA por sí solo administrado por vía oral es inactivo, ya que se afecta por el pH ácido del estómago y no llega al intestino, que es el sitio de acción. Es por ello que se han desarrollado diferentes compuestos de 5-ASA.

El mecanismo de acción de esta clase de fármacos todavía permanece incierto. Es probable que el 5-ASA tenga efecto sobre distintos sistemas: la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, inhibición de la movilización de leucocitos a la mucosa intestinal y acción antioxidante actuando tanto como secuestradores de radicales libres como inhibidores de su producción; todo esto favorecería en gran medida la reparación tisular.

Podemos distinguir dos tipos de moléculas: por un lado los profármacos, que consisten en distintos dímeros entre el ácido 5-ASA y diferentes portadores

inertes que impiden la absorción en tramos proximales del tubo digestivo; y por otro lado, las formulaciones de liberación controlada, en las que el 5-ASA está protegido por excipientes (fórmulas multimatriz MMX) que permiten llegar al fármaco a puntos concretos del tubo digestivo (39).

La eficacia del tratamiento parece ser directamente proporcional a la dosis empleada. Dado que el 5-ASA administrado por vía oral presenta concentraciones rectales inferiores a las del colon derecho, excepción hecha de las formulaciones MMX, el tratamiento tópico en forma de supositorios, espumas o enemas que libera el fármaco directamente en el colon distal también es de utilidad (40).

✓ CORTICOIDES

Los corticoides, todavía en el siglo XXI y en la era de los biológicos, son los fármacos más usados en el tratamiento de los pacientes con colitis ulcerosa. Por tanto, hasta que no dispongamos de nuevos fármacos que demuestren seguridad a largo plazo, van a seguir siendo la piedra angular del tratamiento y nuestros esfuerzos deben ir dirigidos a conocerlos y manejarlos bien.

Según las recomendaciones de las distintas guías de práctica clínica, en pacientes con colitis ulcerosa que no responden a los salicilatos, los corticoides serán los fármacos de primera elección (41). Cuando el paciente presenta una enfermedad moderada-grave está indicado iniciar tratamiento con corticoides sistémicos (42).

La administración de corticoides sistémicos se ha relacionado con la aparición de numerosos efectos secundarios. La prevalencia y gravedad de su aparición depende fundamentalmente de la dosis y duración del tratamiento. Aumentan el riesgo de infecciones y se los ha considerado como los principales responsables de la aparición de osteopenia y osteoporosis en estos pacientes (43).

Como alternativa a los corticoides clásicos podemos utilizar los corticoides de acción tópica con eficacia similar y buen perfil de seguridad, como el

dipropionato de beclometasona que está indicado actualmente en la CU leve a moderada de forma concomitante a los salicilatos en pacientes que previamente no han respondido a ellos.

✓ INMUNOSUPRESORES

Aunque el tratamiento médico de los pacientes con colitis ulcerosa ha avanzado mucho en las últimas décadas, más del 25 % de los pacientes requieren antes o después una colectomía (44) y es en este escenario donde los fármacos inmunosupresores van a desarrollar un importante papel: tanto en los pacientes con CU corticodependientes como en los corticorrefractarios. Definimos la corticodependencia (45) como aquella situación en la que, para un correcto control clínico, se precisan dosis de prednisona superiores a 10 mg/día o reactivación de la enfermedad antes de 3 meses de haber suspendido los corticoides. La incidencia de corticodependencia en los pacientes con CU se desconoce, pero se estima que podría ser similar al 20-30% descrito para los pacientes con enfermedad de Crohn.

Definimos corticorresistencia como aquella situación en la que la enfermedad se mantiene activa pese al tratamiento con dosis plenas de corticoides (45).

Disponemos en la actualidad de tres familias diferentes de fármacos inmunosupresores: tiopurinas (azatioprina y mercaptopurina); metotrexato y calcineurínicos (ciclosporina y tacrolimus).

Algunos de estos fármacos se emplean en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal desde hace más de 15 años, inicialmente de forma empírica, y cada vez con mayor frecuencia. Actualmente su eficacia está plenamente demostrada en algunas situaciones clínicas. Resumimos en la siguiente tabla (Tabla 3) los niveles de evidencia y grado de recomendación recogidos en el consenso elaborado por la organización europea de Crohn y Colitis (ECCO) (41).

TABLA 3. INMUNOSUPRESORES EN CU: RECOMENDACIONES Y NIVELES DE EVIDENCIA (ECCO)

Fármaco	Indicación	Nivel de evidencia	Grado de recomendación
Azatioprina/ mercaptopurina	Inducción remisión moderado corticorrefractario	1b	B
	Mantenimiento corticodependiente	1a	A
	Mantenimiento tras inducción ciclosporina	1b	C
Metotrexate	No indicación		
Ciclosporina	Inducción remisión grave corticorrefractario	1b	C
Tacrolimus	Inducción remisión grave corticorrefractario	1b	C

✓ BIOLÓGICOS

Las dificultades del tratamiento de la colitis ulcerosa ya fueron perfectamente resumidas en 1950 (46), momento en el que la mortalidad de los brotes agudos graves superaba en algunas series el 25%, la mortalidad anual global era del 9%, y “el paciente tenía más del 56% de probabilidad de sobrevivir 20 años”(47). Aunque en algunos centros se había empezado a utilizar la salazopirina, el cambio fundamental en el tratamiento derivó de la demostración de un jovencísimo Sidney Truelove, de que la hidrocortisona era muy eficaz en el tratamiento de los brotes agudos (48).

En las décadas siguientes, se generalizó el uso de salicilatos y corticoides, se definieron las pautas para su uso en el tratamiento agudo y en el mantenimiento y de la ciclosporina en el brote grave corticorrefractario, y mejoraron sensiblemente las expectativas quirúrgicas. Con todo ello se redujo sensiblemente la mortalidad,

hasta el punto de que en varios estudios epidemiológicos se asemejaba a la de la población control.

Al revisar el estado actual del tratamiento del brote agudo y el de mantenimiento llama la atención el hecho de que, a pesar del uso correcto de las modalidades de tratamiento disponibles, sigue habiendo muchas "oportunidades" de mejora (49). Es más, sigue siendo necesaria a menudo la cirugía que, además, no siempre soluciona la enfermedad, como atestigua la frecuente reservoritis.

En este contexto se plantea la posibilidad de utilizar terapias "biológicas" en el manejo de las enfermedades inflamatorias intestinales. Arbitrariamente se incluyen en el concepto "biológicos": 1) preparaciones de origen biológico, como productos hemáticos o vacunas; 2) péptidos o proteínas recombinantes; 3) anticuerpos; 4) terapia basada en ácidos nucleicos; 5) terapia génica; y 6) moléculas de pequeño tamaño diseñadas para interferir con procesos fisiológicos. En teoría, los primeros pasos se dan basándonos en los conocimientos fisiopatológicos que tenemos sobre la enfermedad, escogiendo dianas terapéuticas potenciales y después, desarrollando productos que bloqueen o potencien determinadas rutas metabólicas o inmunológicas.

Sin duda, en la enfermedad en la que los biológicos han representado un avance más importante es la artritis reumatoide (50).

Por otra parte, aunque las posibilidades teóricas son muchas (51),(52), desde un punto de vista clínico actual solo tienen interés aquellos biológicos que han alcanzado la fase II de investigación clínica (Tabla 4).

TABLA 4. FARMACOS BIOLÓGICOS EN EII

Diana	Sustancia	Laboratorio	Fase de desarrollo	Aprobación
TNF	Infliximab	MSD	IV	FDA/EMA 2007
TNF	Adalimumab	Abbvie	IV	2011
TNF	Golimumab	MSD	IV	2013
Integrina	Vedolizumab	Millenium	IV	2013
CD3	Visilizumab	PDL	Interrumpido	No
CD25	Daclizumab	Roche	Interrumpido	No
CD25	Basiliximab	Cerimon	III	No
CTLA-4	Abatacept	BMS	III	No
CD20	Ratuximab	Roche	III	No

1.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE EII

La gravedad y la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en la sociedad occidental han motivado un crecimiento exponencial de la actividad investigadora en este campo en las últimas décadas. La necesidad de una mejor comprensión de la fisiopatología con el objetivo último de mejorar el arsenal terapéutico disponible, ha favorecido la aparición de una amplia amalgama de modelos animales experimentales en los que intentar reproducir las principales características de esta entidad.

Actualmente, y a pesar de los distintos abordajes metodológicos empleados, ningún modelo ha sido reconocido como una réplica exacta de la enfermedad en humanos; circunstancia probablemente debida a la

heterogeneidad y complejidad de la propia EII y al desconocimiento de parte de los mecanismos celulares y moleculares que desembocan en la aparición y mantenimiento de esta patología. Asimismo, estos modelos no están exentos de la importante limitación que siempre supone la experimentación en animales con fines traslacionales; por lo que los resultados obtenidos deberán ser siempre interpretados con cautela.

Modelos de EII en ratón

Se describen en la literatura más de 65 modelos experimentales que han sido utilizados con la intención de simular las características clínicas, biológicas e histológicas de la EII del ser humano (53). En función de las herramientas y la metodología experimental empleada en la inducción de la colitis, y con el objetivo de sistematizar este apartado, estos modelos pueden ser clasificados en 7 categorías:

Inducción química.

Modelos knockout.

Modelos de Colitis espontánea.

Modelos transgénicos.

Modelos de Transferencia adoptiva.

Inducción inmunológica.

Modelos knockin

✓ INDUCCIÓN QUÍMICA.

Esta clase de modelos, gracias a su sencillez y su demostrada eficacia y eficiencia, han sido los más ampliamente utilizados (54).

- Colitis Inducida por Dextrano sulfato sódico (DSS)

Este modelo experimental, descrito inicialmente por Okayasu et al, es uno de los más comúnmente empleados (53),(54),(55).

El DSS ha demostrado inducir una colitis autolimitada en varias especies de roedores como ratas, hamsters, cobayas y ratones.

En términos generales, la administración oral *ad libitum* en el ratón del polímero DSS 2-5 % produce un cuadro de diarrea hemorrágica y pérdida de peso en un plazo de 4-8 días (54). Es fundamental señalar que en las características del proceso patogénico inducido influyen, además de variables predecibles como la concentración de DSS y la duración de la administración, otros factores que pueden ser obviados a priori como:

-Cepa de ratón. En 1998 Mähler et al demostraron que existe una variabilidad determinada genéticamente en la susceptibilidad al daño generado por el DSS (56). Posteriormente en el año 2005, Melgar, Agneta Karlsson y Erik Michaëlsson publicaron un estudio en el que la administración oral de DSS 3% durante cinco días progresaba a la cronicidad en la cepa C57/Bl6 a pesar de la interrupción de la toma de DSS. Como punto de partida en una investigación que haga uso de este modelo es recomendable evaluar previamente la concentración de DSS y el tiempo de exposición necesarios para cada cepa (54).

-Peso molecular. DSS de 5000 Da induce inflamación en el ciego y colon proximal, mientras que DSS con un peso molecular de 40.000-50.000 Da provoca una colitis de afectación más distal. Polímeros de mayor peso molecular (500.000 Da) no inducen inflamación colónica (54).

El mecanismo exacto mediante el cual este compuesto genera la lesión mucosa es desconocido. Se postula que parte importante del daño es secundario a un proceso químico sin mediación del sistema inmune. Sin embargo, el análisis del proceso inflamatorio agudo revela un aumento de citocinas proinflamatorias asociadas a células de la inmunidad innata como IL1 –beta, IL -6 y TNF-alfa por lo que se cree que macrófagos y neutrófilos desempeñan un papel relevante (54),(57).

A pesar de que algunos autores califiquen este abordaje experimental como un modelo de diarrea aguda autolimitada sin intervención de la respuesta inmune adaptativa, en función del protocolo puede inducirse una colitis aguda o crónica.

El estudio anatomopatológico del colón en la fase aguda suele revelar acortamiento, infiltrado importante de granulocitos y mononucleares, edema, ulceración manifiesta de la mucosa, pérdida de células caliciformes y en ocasiones abscesos crípticos. Para el estudio microscópico suele utilizarse el colón distal por ser el más severamente afectado.

La reproducibilidad y accesibilidad de este modelo, su similitud con el cuadro clínico e histológico de la colitis ulcerosa en el humano; así como su contrastado uso en numerosos estudios han sido los determinantes que han impulsado su elección como modelo a emplear en nuestro experimento.

- Colitis Inducida por ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS)

Descrito por primera vez en ratas en el año 1989 por Morris GP et al. mediante la administración intrarrectal de TNBS disuelto en etanol al 50 % observaron que se producía una inflamación y ulceración del colón dosis dependiente (5-30mg) de al menos 8 semanas de duración que clínicamente se manifestaba con diferentes grados de diarrea, pérdida de peso y prolapso rectal. Histológicamente acontece un proceso inflamatorio transmural en el colón con aparición parcheada de úlceras con infiltración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, mastocitos, fibroblastos y formación de granulomas (58).

- Colitis inducida por ácido acético

MacPherson BR y Pfeiffer CJ idearon este modelo en el año 1978 al observar que la instilación intrarrectal de 0.5ml de ácido acético en concentraciones que variaban del 10% al 50% inducía una colitis difusa dosis-dependiente (59).

El hecho de que no se establezca un proceso inflamatorio crónico constituye una importante limitación del modelo ya que obvia una de las principales características de la CU; no obstante, su sencillez y la similitud con la fase aguda de la EII en humanos (60) han favorecido su uso en multitud de experimentos.

- Colitis inducida por yodoacetamida/ N- etilmaleiamida

En el año 1997, Satoh, Sato, Takami y Szabo, idearon un nuevo modelo en ratas basándose en la hipotética capacidad protectora de la mucosa gástrica de los compuestos sulfidrílicos endógenos (Ej. Glutación). Postularon que el bloqueo de estas moléculas podría originar un daño en el epitelio colónico. Para comprobar la validez de su hipótesis estudiaron el efecto de dos sustancias bloqueantes de grupos sulfidrilo de forma separada, yodoacetamida y N-etilmaleimida. Fueron administradas a diferentes concentraciones vía catéter en la mucosa colónica. Observaron que ambas sustancias químicas provocaban en los animales diferentes alteraciones que incluían diarrea hemorrágica, pérdida de peso, dilatación de colón y un daño inflamatorio con un patrón histológico similar a la CU en el humano (61).

- Colitis inducida por oxazolona

En 1998 Borevant, Fuss, Chu y Strober describieron un modelo de colitis de aparición más precoz que el provocado con TNBS/etanol mediante enema de oxazolona y etanol.

La colitis está confinada al colon distal y microscópicamente aparece una inflamación superficial caracterizada por ulceración, edema, y un infiltrado inflamatorio mixto de linfocitos, granulocitos y eosinófilos (62).

- ✓ COLITIS EN RATONES KNOCKOUT (KO)

En términos generales, la característica común a todos ellos es la inactivación de un gen concreto cuyo producto funcional desempeña una actividad

importante no completamente conocida en la homeostasis de la mucosa colónica. La pérdida de este producto funcional favorece la aparición de un proceso inflamatorio en el tubo digestivo, y en ocasiones en otras partes del organismo, de características variables. Una de las variantes que más atención ha recibido es el modelo IL10 -/- (53),(54).

✓ MODELOS ESPONTÁNEOS DE COLITIS.

En 1994 Sundberg et al. desarrollaron una nueva subcepa de ratón en la que, de forma espontánea, aparecía una colitis (63). Estos investigadores observaron que la cepa C3H/Hej presentaba de forma esporádica diarrea, colitis derecha y úlceras perianales en menos del 1 % de los casos. La cría selectiva de los ratones afectados desembocó en la génesis de una subcepa específica designada como C3H/HejBir que presentaba una colitis derecha espontánea en un 88 % de los machos y un 79% de las hembras (64).

Este modelo también ha sido usado en combinación con modelos de colitis inducida y ha contribuido de manera importante en el estudio e identificación de factores genéticos y ambientales de susceptibilidad de la EII (60).

✓ MODELOS TRANSGÉNICOS.

Esta categoría engloba a los modelos de ratón modificados mediante ingeniería genética que sobreexpresan un gen de interés en todas sus células corporales (modelos transgénicos convencionales) o exclusivamente en determinados tipos celulares (modelos transgénicos condicionales). La sobreexpresión de dicho gen desembocaría en un aumento de los niveles de su producto funcional, el cual sería parcial o completamente responsable de iniciar y/o mantener la inflamación de la mucosa digestiva. Este abordaje metodológico ha permitido realizar avances de gran relevancia en la fisiopatología de la EII (60).

✓ MODELOS DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA

CD 45 es un glicoproteína transmembrana con actividad tirosinfosfatasa presente en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas (23). De este subtipo de modelos el más utilizado nace en 1993. Powrie et al publicaron un estudio en el que la inyección de linfocitos T CD4+ naive que expresaban niveles altos de la isoforma RB de CD45 procedentes de ratones sanos wildtype a ratones singénicos con inmunodeficiencia combinada severa SCID inducía una colitis crónica progresiva con diarrea no sanguinolenta, pérdida de peso en un plazo de 5-8 semanas (65).

✓ INDUCCIÓN INMUNOLÓGICA ANTI CD40

La ruta de señalización CD154 (CD40L)/ CD40 ha demostrado jugar un papel importante en la patogénesis de la colitis ulcerosa tanto en modelos animales como en humanos.

Mediante la administración única intraperitoneal de anticuerpos monoclonales con capacidad agonista anti CD40 en ratones inmunodeficientes RAG -/- , se produce en el animal en los 4 días siguientes a la inyección un cuadro agudo y autolimitado caracterizado por pérdida rápida de peso, diarrea, esplenomegalia, hepatopatía y aumento del tamaño de los ganglios mesentéricos alrededor del día siete (66).

✓ MODELOS KNOCKIN (KI)

Se incluyen ratones modificados genéticamente que son portadores de una mutación/es en un gen de interés. Entre estos se encuentran: PI3Kp110d KI, TNF(ARE) KI, gp130 KI, Epi/N-cadherin KI (53).

1.3. CARDIOTROFINA-1, CITOQUINA ANTIINFLAMATORIA Y ANTIAPOPTÓTICA

✓ ESTRUCTURA MOLECULAR

La proteína Cardiotrofina-1 (CT-1) fue caracterizada e identificada en 1995 por Pennica y cols., como una proteína de 21,5KDa, que potencialmente induce hipertrofia de cardiomiocitos en modelos "in vivo" de células cardiacas (67). Es un mediador de comunicación celular y está implicada en el proceso de supervivencia de los cardiomiocitos en respuesta al estrés oxidativo. También tiene un efecto protector frente a la apoptosis.

La CT-1 es un miembro de la familia de interleukina-6 (IL-6) (68), que comprende además de la IL-6, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la oncostatina M (OSM), la interleucina 11 (IL-11), la interleucina 27 (IL-27), la interleucina 31 (IL-31), la citoquina parecida a cardiotrofina (CLC) y la neuropoietin/cardiotrofina-2 (NP/CT-2).

Son también llamadas citoquinas gp130 por presentar en su complejo de receptores, una subunidad común, la glicoproteína 130 (gp130), encargada de traducir la señal al interior de la célula. Presentan también una segunda o tercera subunidad que juegan un papel vital en la formación del complejo receptor.

Poseen efectos pleiotrópicos y redundantes (69) en el organismo y están involucradas en una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo respuesta inmune, inflamación, desarrollo neuronal y hematopoyesis (70). Además, activan genes involucrados en crecimiento, diferenciación, supervivencia, apoptosis y proliferación.

La mayoría de los efectos de la CT-1 han sido descritos en el corazón, pero actualmente se han descubierto importantes efectos protectores en otros órganos como hígado, riñón, sistema nervioso, etc. (71).

La CT-1 presenta además un gran número de funciones a veces, con efectos opuestos.

Puede aumentar la supervivencia de las células y también puede causar daño en los tejidos. La evidencia reciente ha demostrado que la exposición crónica a niveles muy elevados de CT-1 está asociada a fibrosis cardiaca, renal y vascular, con daño estructural y funcional en el corazón, aorta y riñón (72).

Así, la CT-1 produce ambos efectos, protectores y perjudiciales en muchos órganos, y estos efectos opuestos podrían ser dependientes de la dosis y del tiempo de exposición.

Los efectos perjudiciales de CT-1 sobre el riñón y corazón, se ponen de manifiesto cuando se mantienen niveles elevados de citoquinas en plasma, ya sea por sobreproducción natural o cuando es administrada a altas concentraciones.

Todos estos efectos no se observan cuando se administra a bajas dosis o cuando el número de administraciones es pequeño (73).

✓ RECEPTORES DE CT-1

El receptor de CT-1 está formado por un heterocomplejo de 3 proteínas transmembrana altamente glicosiladas, que son: la glicoproteína 130 (gp130), la subunidad B del receptor LIF (LIFR B), también llamado glicoproteína 190 (gp190) y la subunidad alfa del receptor de CT-1 (CT-1Ralfa). (Figura 7)

GP130

Se encuentra formando parte del receptor de todas las moléculas de la familia, y es la encargada de iniciar el mecanismo de acción (74).

Consta de:

- El dominio extracelular
- El dominio transmembrana (TM)

- La región citoplasmática, necesaria para la unión a JAK1 y 2 y la transducción de señales al interior de la célula.

CT-1R α

CT-1R α o gp80R, es la subunidad α específica de la citoquina, sin capacidad de enviar señales al citoplasma. Su región extracelular es la de unión con la CT-1. CT-1R α participa en la formación de este complejo trimérico y es la que le confiere una alta sensibilidad y especificidad para CT-1.

Receptor del factor LIF (LIFR β)

El receptor LIFR β , también denominado gp190, es la subunidad transductora de señal al interior de la célula, que no es específica de la CT-1, sino que es compartida por receptores de otras citoquinas de la familia.

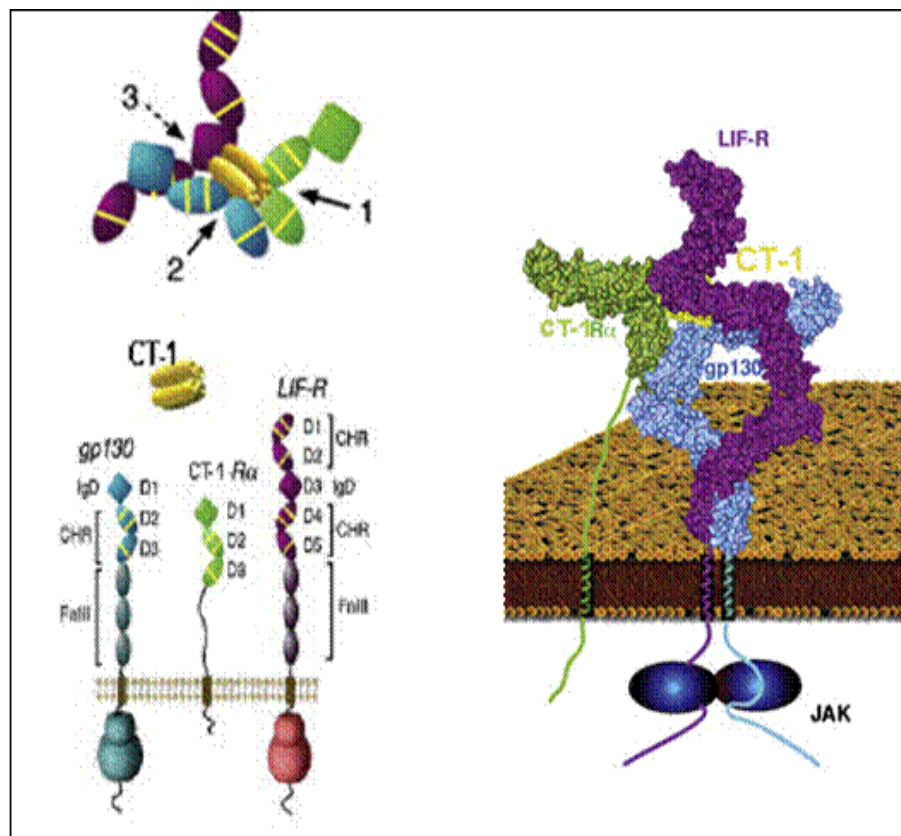


Figura 7.- La CT-1 se une a un complejo trimérico de receptores para activar la cascada de señalización, formado por los receptores: gp130, CT-1R α , LIFR β .

✓ ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO RECEPTOR

Tras la unión de CT-1 al receptor, ambos gp130 y LIFR- β son fosforilados en residuos tirosina, haciendo más evidente que la señalización de CT-1 es a través del heterodímero gp130/LIFR- β (75). La activación de gp130 por CT-1 se lleva a cabo de manera secuencial. La CT-1 interaccionaría con su receptor específico. Este complejo binario (CT-1/CT-1R α) es entonces competente para acoplarse al receptor gp130, permitiendo la unión de gp130, para formar un complejo trimolecular intermedio sin capacidad de señalización.

Este complejo trimolecular formado por la unión de la CT-1 a sus receptores, produce heterodimerización de gp130, LIFR y la tercera subunidad del receptor. Esto induce una serie de señales intracelulares que incluyen la activación temprana de tirosina cinasas de la familia de las janus cinasas (JAK-1, JAK2 y Tyk2). (Figura 8).

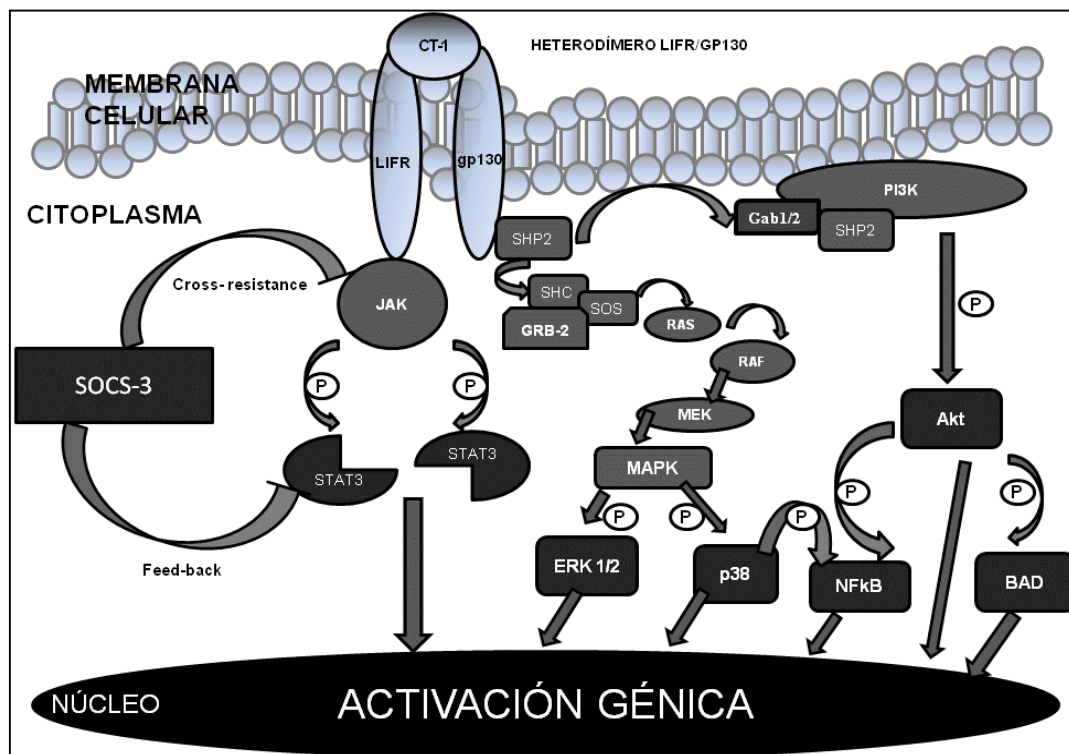


Figura 8. Receptor de CT-1, compuesto por heterodímero LIFR/gp130 y las vías intracelulares activadas por CT-1.

✓ VIAS DE SEÑALIZACIÓN

La unión de CT-1 a gp130 desencadena la activación de tres cascadas de señalización:

-JAK/STAT (janus kinasa/trasductores y activadores de transcriptasa)

-ERK1/2/MAPK (cinasa regulada por señales extracelulares 1/2/ protein cinasa activada por mitógenos)

-PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3 kinasa/protein kinasa B)

- JAK/STAT

La activación de esta vía se inicia por la unión de CT-1 a sus receptores, y depende principalmente de la activación de las dos familias de proteínas, las *janus cinasas* (JAK-1, JAK-2 y Tyk2) y el grupo de factores de transcripción citosólicos STATs (STAT-1, STAT-3, STAT-5). Por este motivo, a la vía de señalización de la CT-1 se la conoce como vía JAK/STAT, representando una forma de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo extraordinariamente rápida.

La unión de CT-1 a su receptor produce un cambio conformacional en este, que hace que las JAKS se aproximen. Una vez activadas, las JAKS van a fosforilar tanto al receptor (en su dominio intracelular) como a los STATs. La fosforilación de las STATs induce el reclutamiento del factor de transcripción STAT3 (76).

En ausencia de estimulación, las STATs se encuentran latentes en el citoplasma y por lo tanto están transcripcionalmente inactivas. Pero una vez que son fosforiladas por las JAK a través de la fosforilación de sus residuos de tirosina conservados, se lleva a cabo la dimerización con otros STATs formando homo o heterodímeros.

El reclutamiento de un único grupo de STAT para cada familia de receptores de citoquinas supone un hecho crítico para definir la especificidad de la respuesta biológica. Algunos receptores de citoquinas tienen un único sitio de anclaje para STAT, mientras que otros poseen más de un sitio de unión. La presencia de más de

un sitio de unión permite que dos moléculas de STAT puedan ser activadas simultáneamente facilitando la dimerización. Las JAK son las que proporcionan el sitio de unión para los STAT (77).

Cuando STAT1 ó STAT3 se une a los receptores (LIF β ó gp130) que han sido fosforilados en residuos tirosina, son activados y forman homodímeros STAT1-STAT1, STAT1-STAT3 o STAT3-STAT3 los cuales se comportan como factores de transcripción, que se translocan al núcleo para unirse a promotores específicos en el DNA genómico, de ese modo se estimula la transcripción de diferentes genes (Figura 9.) Una vez defosforilados en el núcleo, se inactivan y vuelven al citoplasma (78).

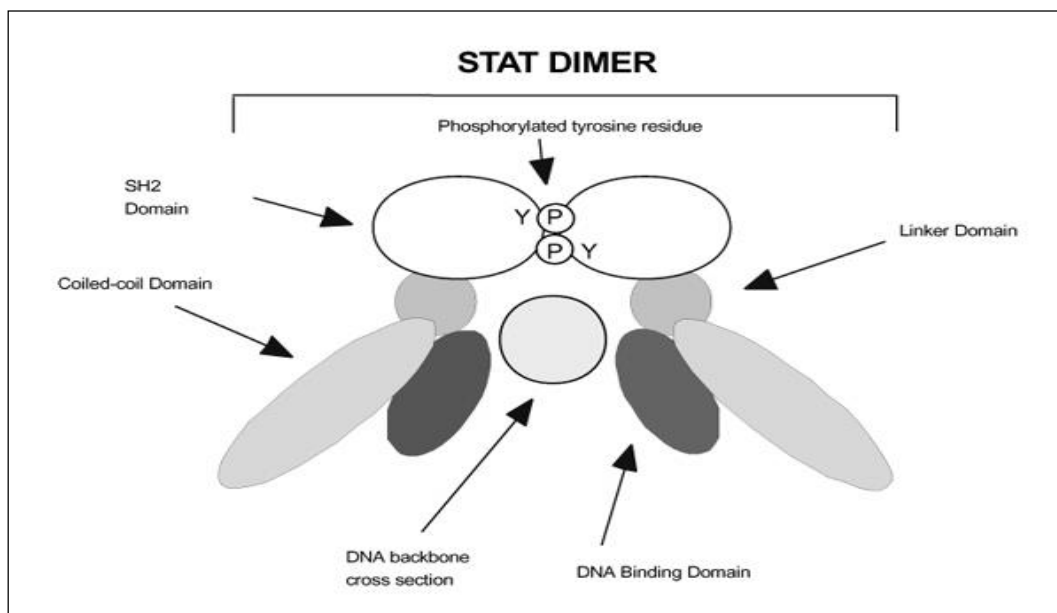


Figura 9: Interacción del dímero con el ADN

- Regulación negativa de la vía JAK-STAT

Tan importante como la capacidad para iniciar la respuesta frente al estímulo producido por la CT-1, resulta la terminación de la misma (Figura 10). De hecho, resulta lógico pensar que la falta de la regulación de las vías JAK/STAT puede ser

importante en la patogénesis de distintas enfermedades de índole variada. La duración de la activación de los STAT es limitada decayendo su respuesta en un tiempo limitado (79).

Existen 3 familias principales de reguladores negativos de esta vía de señalización: **PTPs** (proteína fosfatasa de residuos de tirosina), **SOCS** (familia de supresores de señalización de citocinas) y **PIAS** (proteína inhibidora de las STATs activadas).

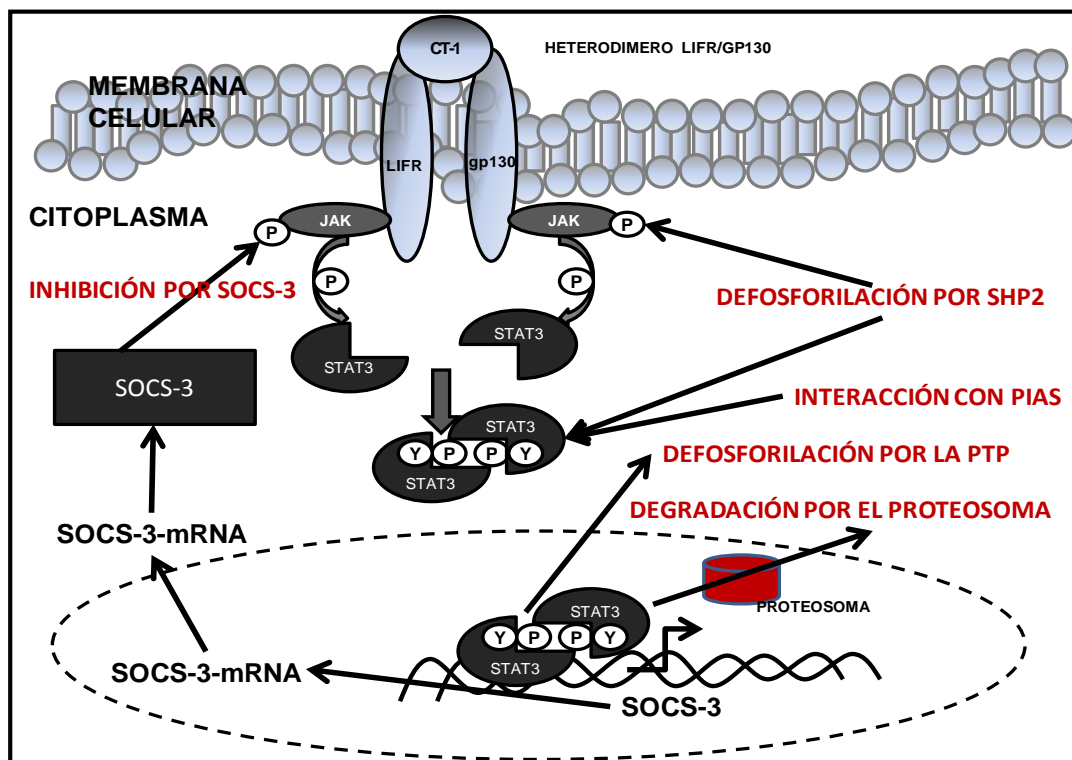


Figura 10. Regulación negativa de la vía JAK/STAT. Representación esquemática de algunas de las vías de regulación de la vía JAK/STAT. Las JAK kinasas pueden ser reguladas a distintos niveles: proteínas SOCS, PTP (proteínas tirosinas fosfatasas) y mediante degradación mediada por conjugación con ubiquitininas.

- ERK1/2

Además de la vía JAK/STAT, la unión de la CT-1 a sus receptores puede activar otras vías de señalización como la p42/44 MAPK (p42/44 proteína cinasa activada por mitógenos), la cual también es conocida como ERK1/2 (80). La

estimulación celular que conduce a la fosforilación de gp130, tras la unión de CT-1 a gp130, también induce la unión de la tirosina fosfatasa SHP-2 llevando a la activación secuencial de SHP2, Ras, Raf, y ERK1/2.

La vía MAPK es directamente responsable de la fosforilación y activación de NF-IL6 (factor nuclear IL-6), un factor involucrado en la señal de traducción de citocinas (81).

PI3K-Akt

Otra de las vías de señalización activada por la CT-1 es la PI3K-Akt (fosfatidil inositol 3 cinasa/proteína cinasa B)(82).

Una vez que CT-1 se une al receptor y este es activado, se fosforila PI3K produciéndose un rápido incremento en los niveles de actividad de la PI3K. Al estar PI3K activada, se produce la fosforilación de PIP2, dando lugar a PIP3, que activa PDK-1 (cinasa dependiente de fosfoinosítidos) que a su vez fosforila AKT. AKT fosforilado fosforila I κ B, una de las subunidades de NF- κ B, lo que hace que esta se separe del complejo y permite que Rel-A (p65) se fosforile, dimerice con otra subunidad (como p62) y se forme un factor de transcripción activado, con capacidad de entrar en el núcleo celular, uniéndose al promotor de diferentes genes.

La activación de esta vía está asociada con supervivencia celular, inflamación y patogénesis de gran número de enfermedades incluyendo cáncer (83) y fibrosis renal (84). También está involucrada en crecimiento celular, proliferación y apoptosis.

✓ VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU IMPLICACIÓN

Es probable que CT-1 lleve a cabo sus efectos por una combinación de las rutas de señalización, antes mencionadas y es muy importante determinar que ruta o rutas están involucradas en cada efecto particular de la CT-1 (Figura 11).

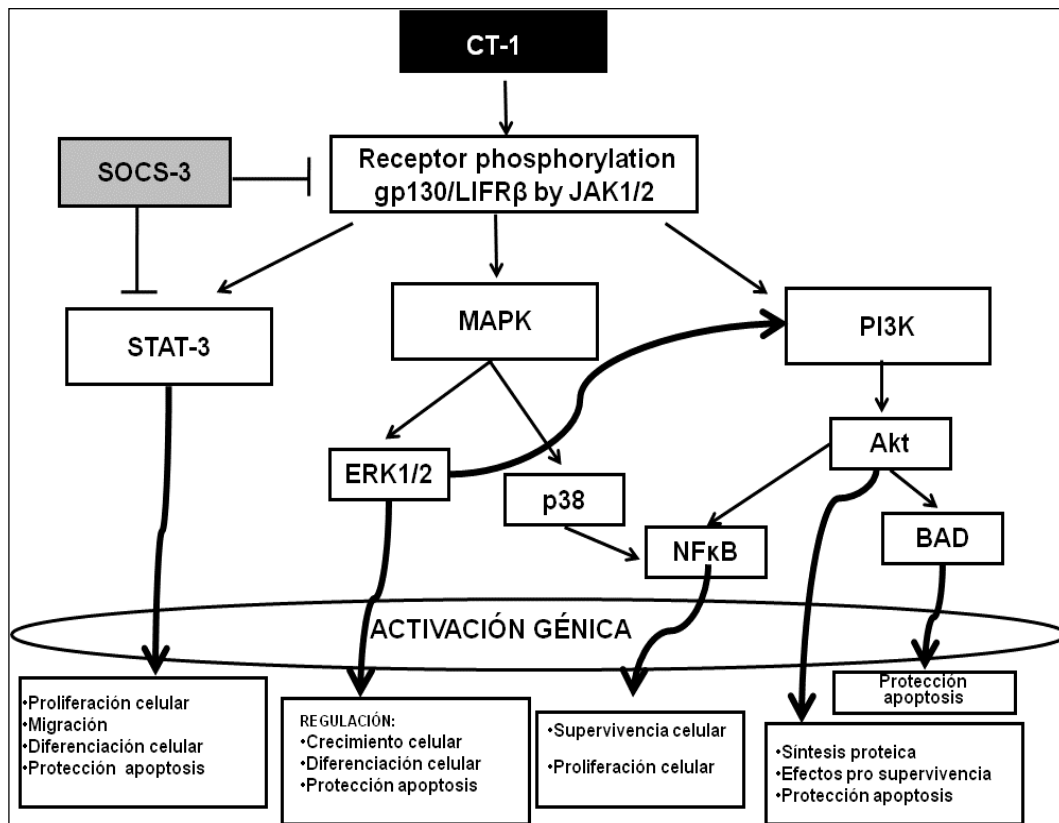


Figura. 11. Vías de señalización activadas por la CT-1.

La vía JAK/STAT transduce señales de protección contra la respuesta inflamatoria (85), protege de la isquemia (86) y del estrés oxidativo (87).

Una de las vías claramente implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía de la PI-3K/AKT. La activación de PI-3K induce la activación por fosforilación de AKT. La activación de AKT provoca a su vez la fosforilación de BAD. BAD es un miembro de la familia de Bcl-2 y es un regulador importante de la señal de supervivencia. BAD inactivo dimeriza con las proteínas Bcl-x o Bcl-2 neutralizando su actividad antiapoptótica. La fosforilación de BAD conlleva la liberación de Bcl-2 o Bcl-x que suprimirán la vía de apoptosis. Por lo tanto la CT-1 también fosforila el factor proapoptótico por la vía PI3K/Akt, ejerciendo protección atribuida en parte a la sobrerregulación del gen antiapoptótico bcl-2 y la disminución del proapoptótico bax. (88),(89).

También, se ha demostrado que CT-1 activa el factor nuclear kappa B (NFκB) en cardiomiocitos (90), hepatocitos (91), células endoteliales de la vena umbilical (92), células epiteliales renales (93) y neuronas sensoriales (94).

✓ MECANISMOS DEL EFECTO PROTECTOR CELULAR DE CT-1

El efecto protector de CT-1 en los tejidos podría ser explicado mediante los efectos en proliferación tisular y apoptosis, estrés oxidativo, inflamación y regulación del metabolismo celular.

- Estrés oxidativo

Un mecanismo por el que CT-1 puede proteger los tejidos del daño isquémico u otros daños es la reducción del estrés oxidativo (95),(96).

El mecanismo por el que la administración de CT-1 reduce el estrés oxidativo es que la activación de gp130/STAT3, incrementa la expresión de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) un enzima que reduce el daño de H₂O₂.

- Inflamación

CT-1 induce la síntesis de IL-6. Esta citoquina también podría tener efecto protector en el daño celular (97).

La activación de NF-κB disminuye el daño celular y tiene efecto pro y antiapoptótico (98).

La traslocación de p65 NF-κB al núcleo, induce la expresión de genes pro y anti-apoptóticos, tales como genes que expresan TNF-alfa, lo que resulta en apoptosis en las células endoteliales. La inhibición de la activación del NF-κB reduce la liberación de TNF-alfa y la apoptosis.

- Metabolismo energético

CT-1 estimula el metabolismo mediante la vía de la activación de la proteína cinasa dependiente de monofosfato de adenosina (AMPK) (99).

- Proliferación y apoptosis

CT-1 podría mejorar la función del hígado cirrótico y estimular la regeneración hepática mediante la estimulación de la angiogénesis y la proliferación tisular.⁷² Además produce proliferación de miocitos cardíacos (100).

La apoptosis juega un papel en el daño tisular isquémico o no isquémico.

CT-1 aumenta la supervivencia tisular mediante la activación de la vía de señalización antiapoptótica.

- ✓ EFECTOS DE LA CARDIOTROFINA

Se ha demostrado que CT-1 tiene efectos en una gran variedad de tejidos, incluyendo riñón, hígado, corazón, tejido neural, etc.

- Efectos de CT-1 en el corazón

En el corazón, la CT-1 es sintetizada fundamentalmente por los cardiomiocitos y secretada hacia la circulación periférica (101).

CT-1 tiene un gran número de funciones diferentes como, protección de miocardio, efectos hemodinámicos, y propiedades endocrinas. CT-1 también está involucrada en patologías cardiovasculares como hipertensión, enfermedades valvulares, fallo cardíaco y enfermedades de arterias coronarias (102), y la administración crónica de la CT-1 incrementa el peso del corazón y el ventricular (103),(104).

Efectos cardioprotectores

- Hipoxia del miocardio:

Se ha demostrado un aumento de la expresión de CT-1 en diversas situaciones fisiopatológicas de hipoxia cardíaca: angina de pecho, infarto cardíaco e insuficiencia cardíaca y parece proteger del mismo (103).

Durante el infarto de miocardio aumenta la producción de RLO (105) y la hipoxia. Los RLO podrían regular la expresión de la CT-1, que a su vez, activa las vías de señalización MAPKs (ERK1/2, JNK, p38) y PI3K a través de los RLO (106).

La CT-1 está implicada en el crecimiento y la supervivencia de las células cardíacas. En cultivos de células madre murinas embrionarias, la CT-1 estimula la cardiomiogénesis y la proliferación celular por un mecanismo en el que están involucradas la activación de las cascadas de señalización molecular JAK/STAT, MAPK y NF-κB, y en el que también están implicados los RLO.

- Isquemia/reperfusión:

En numerosos estudios experimentales, la CT-1 actúa como un potente factor de supervivencia cardíaca, y promueve la proliferación de cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (107).

En modelos de ratas con isquemia de miocardio, la CT-1 juega un papel muy importante en la reparación del tejido y su cicatrización (103).

CT-1 induce una protección significativa del miocardio humano contra la lesión isquémica cuando el tejido está expuesto a este factor por un período largo pero no cuando se expone durante un corto período (108).

- Hipertrofia cardíaca

La CT-1 se aisló en 1995 basada en su capacidad de causar hipertrofia en cultivos de miocitos cardíacos (67). Los mecanismos exactos por los que la CT-1 induce hipertrofia en cardiomiocitos no están del todo claros.

En resumen como podemos ver en la Figura 12: 1) MAPK/ERK juega un papel esencial en la función de supervivencia de la CT-1; 2) la regulación de la CT-1 sobre los procesos apoptóticos es mediada en parte por GATA4 y por otras vías que tienen sus efectos a través de ERK1/2 y 3) las vías de señalización STAT3 y ERK juegan diferentes papeles en procesos hipertróficos y antiapoptóticos mediados por la CT-1 (109),(110),(111).

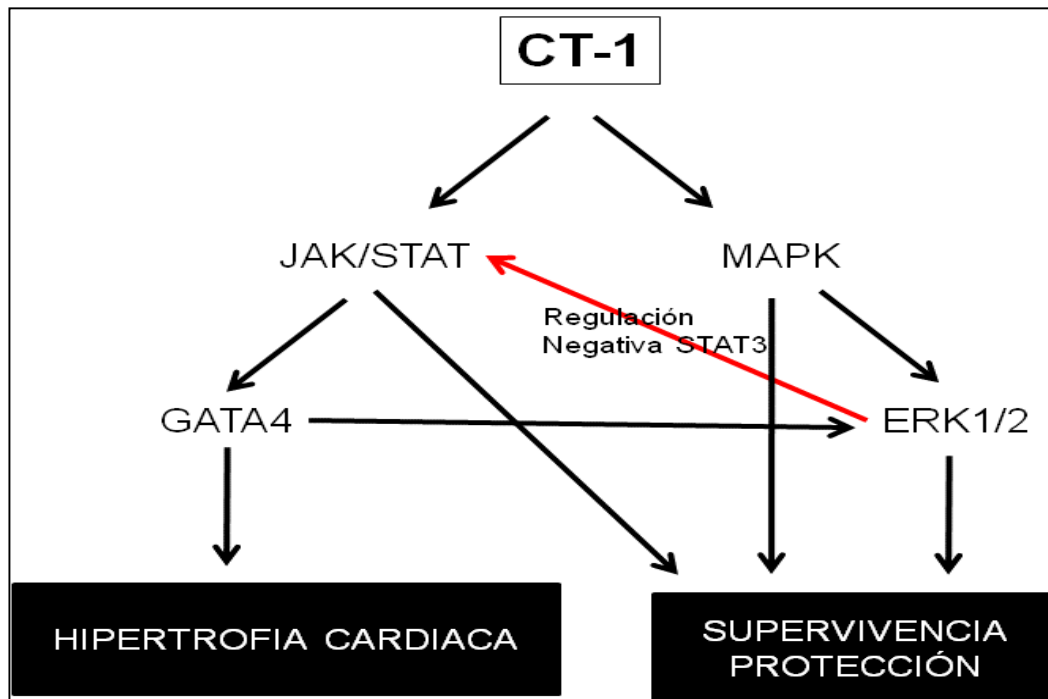


Figura 12. Vías de señalización por las que CT-1 ejerce sus efectos sobre la hipertrofia y supervivencia cardíacas.

Efectos hemodinámicos

CT-1 también tiene efecto sobre funciones hemodinámicas y cardiovasculares. Se ha demostrado que la administración intravenosa de CT-1 (4-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) a ratas causa hipotensión sistémica dosis dependiente (112).

La respuesta depresora de la CT-1 coincide con una reducción en la resistencia vascular sistémica y da lugar a una significativa elevación en el gasto cardiaco asociado con un incremento concomitante en la frecuencia cardiaca.

Efectos endocrinos

La CT-1 estimula la secreción del péptido natriurético cerebral (BNP, brain natriuretic peptide) y del péptido natriurético atrial (ANP, atrial natriuretic peptide). BNP y ANP tienen propiedades hipotensoras *in vivo*, pero es poco probable que sean los responsables de la disminución en la presión sanguínea causada por la administración de CT-1, ya que los efectos hipotensoras de BNP y

de ANP no son bloqueados por L-NAME, y en cambio el efecto hipotensor de CT-1 si lo hace (113).

- Efectos de CT-1 en el pulmón.

La CT-1 se detecta en abundancia en pulmón de humano adulto y se expresa en las células del músculo liso bronquial (HBSCM), tanto en humano adulto como en feto (114).

CT-1 tiene efecto antiapoptótico a través de la activación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2, ya que un inhibidor de ERK1/2 (PD98059), y podría contribuir al incremento de la masa del musculo liso en daño de la vía respiratoria (115).

El tratamiento con CT-1, en un modelo de hipertensión con hipoxia pulmonar crónica, protege la función endotelial de la arteria pulmonar; disminuye la presión arterial pulmonar y atenúa la hipertrofia ventricular derecha (116).

La CT-1 previene de la acumulación neutrofílica pulmonar, disminuye el deterioro del endotelio causado por la endotoxina (ETX), y además posee propiedades antiinflamatorias en modelos de daño pulmonar agudo inducido por ETX (117).

- Efectos de CT-1 en el hígado.

Efectos hepatoprotectores

CT-1 podría tener un importante papel en la regulación del metabolismo de hepatocitos en la respuesta inflamatoria. Aumenta durante la regeneración del hígado después de la hepatectomía parcial y ejerce potentes efectos antiapoptóticos sobre hepatocitos (118).

Además, la administración de la CT-1 a ratas o ratones protege al hígado del daño provocado por la isquemia/reperfusión mientras que en los ratones deficientes en CT-1, el daño producido por la isquemia es mayor (119).

Efectos en el fracaso hepático fulminante.

El fracaso hepático fulminante (FHF) es una enfermedad de rápida evolución, que carece de tratamiento no quirúrgico efectivo. En un modelo de rata con FHF, inducida por la administración intraperitoneal de D-galactosamina (1.4g/Kg), la administración de CT-1 a la 12 y 18 horas indujo en el grupo tratado una mayor supervivencia, una mejoría en las pruebas histológicas del hígado, reducción en el tiempo de activación de la coagulación, y disminución de los niveles de bilirrubina total y de alanina aminotransferasa en suero. La administración de la CT-1 disminuyó las células apoptóticas e incrementó la expresión de marcadores de proliferación celular en el tejido hepático (120,120).

También se ha demostrado que CT-1 puede ejercer un efecto protector en la cirrosis hepática después de una hepatectomía, ya que aumenta la supervivencia y mejora la función hepática. La administración de la CT-1 en ratas aumenta la expresión de NF- κ B (p65), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), Ciclina D1 y p42/44 en el hígado remanente y en hepatocitos enfermos. Por lo tanto la administración de CT-1 podría mejorar la función del hígado remanente en cirróticos y estimular la regeneración del hígado a través del aumento de la angiogénesis y de la proliferación celular (91).

CT-1 podría ser una terapia hepatoprotectora para mejorar el resultado del trasplante hepático, especialmente en situaciones difíciles como en injertos de tamaño pequeño o en carcinoma hepatocelular en el que la resección masiva provoca una baja reserva hepática funcional (120),(91),(121).

- Efectos de la CT-1 en el tejido neural y sistema neuromuscular

CT-1 es la única citoquina de la familia de las IL-6 que puede ser detectada en ratas en el plexo coroideo y en humanos en el plexo coroideo y en el líquido cefaloraquídeo. Tiene un potencial efecto sobre la supervivencia de la neuronas, aumentado la misma, tanto in vitro, como in vivo. En enfermedades de la motoneurona en ratas, dispone de efectos miotróficos y neurotróficos (122).

CT-1 protege del daño cerebral por isquemia en ratones in vivo y reduce la apoptosis neuronal disminuyendo la actividad de la caspasa 3 y 8 y de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). Se ha sugerido que lo hace a través de la activación de JAK/STAT3, NF- κ B, ERK1/2, y Akt. (123),(124).

- Efectos de la CT-1 en la retina

CT-1 promueve la supervivencia de los fotorreceptores y que probablemente las células de Müller median este efecto. También sugieren que la liberación prolongada de la CT-1, es esencial para el rescate de los fotorreceptores a largo plazo (125).

- Efectos de la CT-1 en el tejido adiposo

Se ha observado en pacientes con síndrome metabólico mayores niveles de CT-1 en suero que en pacientes control, por lo que la síntesis de CT-1 en el tejido adiposo podría estar relacionada con los elevados niveles de CT-1 en plasma en pacientes con síndrome metabólico (126).

Un grupo de investigadores observó que los animales que carecían de cardiotrofina-1 presentaban un importante descenso del gasto energético y, con el paso del tiempo, se hacían obesos y diabéticos. Asimismo los investigadores comprobaron que la inyección de esta proteína a ratones obesos provocaba un aumento de la combustión de la grasa almacenada en el tejido adiposo y un descenso del peso corporal, como resultado de la disminución de los depósitos grasos. Además, pudieron ver que la administración de cardiotrofina-1 refuerza la acción de la insulina, lo que facilita la entrada de glucosa en las células y hace descender la glucosa en sangre (127).

- Efectos de la CT-1 en el riñón

La administración de CT-1 previene el daño renal y la inflamación inducida por la isquemia/reperfusión. La administración de CT-1 mejora la función renal y disminuye la inflamación en modelos animales. Se ha demostrado que en el daño

renal por isquemia/reperfusión aumenta la supervivencia y disminuye los niveles de creatinina. Estos efectos de CT-1 parecen estar mediados por la reducción de la producción de radicales libres de oxígeno y el descenso del infiltrado de neutrófilos y macrófagos. La disminución de la inflamación se demuestra por el descenso en plasma de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL1B, INFgamma, la menor activación de NF-kB y la reducción de la apoptosis. Esto indica que CT-1 podría usarse como estrategia terapéutica para proteger al riñón de la isquemia/reperfusión (93)

Además, CT-1 previene la toxicidad renal producida por los contrastes yodados en ratón. Con la administración de CT-1 se previene la reducción del filtrado glomerular característico del fallo renal agudo inducido por los contrastes yodados, previene el incremento en el tejido renal de niveles de marcadores de daño renal (NAG, KIM-1, NGAL), reduce la activación de caspasa y la proliferación celular. El estrés oxidativo, característico de la nefropatía inducida por el contraste, también se previene con la CT-1 (128).

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO DOCTORAL

Dado que:

- En España se ha producido un aumento de la incidencia de Colitis Ulcerosa.
- Este aumento de incidencia, los nuevos tratamientos y la dependencia de atención hospitalaria hacen que esta enfermedad suponga una importante carga económica para los sistemas sanitarios.
- En la actualidad, y a pesar de los distintos abordajes terapéuticos empleados, ningún tratamiento ha conseguido curar la Colitis Ulcerosa.
- Las tasas de colectomía, cirugía con alta morbi-mortalidad, no han disminuido en los últimos años.

Es necesario investigar nuevos tratamientos que controlen la actividad inflamatoria.

La **hipótesis** del presente estudio es que la CT-1 tiene un efecto modulador de la respuesta inflamatoria en la colitis ulcerosa. Por lo tanto, la administración de CT-1 en un modelo murino de colitis inducida por administración de DSS revertiría el daño funcional, estructural y la inflamación que se asocia a este modelo experimental de colitis.

Por todo ello los **objetivos generales** de este proyecto doctoral son:

El **objetivo general** de este estudio es analizar si la CT-1 puede servir como terapia para revertir las alteraciones observadas en un modelo experimental de colitis en ratón inducido por la administración oral de DSS.

Los **objetivos concretos** consisten en analizar el efecto de la administración terapéutica de CT-1 (después de inducir la colitis) en:

1. La clínica de la enfermedad: diarreas, sangrado, pérdida de peso, etc.

2. Las alteraciones histológicas en el colón que se observan en este modelo: pérdida de la mucosa, alteraciones en las criptas, apoptosis, infiltración de células inflamatorias, etc.
3. Las alteraciones en la translocación bacteriana inducidas por la enfermedad
4. La reacción inflamatoria que se produce en el colon: niveles plasmáticos y expresión en tejido colónico de citoquinas (TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-6 e IL1-7) y marcadores de inflamación (activación de NF κ B, iNOS, pSTAT3)

Material y Métodos

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En nuestro modelo experimental, se trabajó con ratones macho de seis semanas de edad de la estirpe C57BL/6J suministrados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz de 12 h/12h de oscuridad bajo el nivel 3 de condiciones de bioseguridad. Fueron alimentados *ad libitum*, con agua y con dieta estándar. Los ratones fueron estabulados en jaulas individuales y manejados siguiendo las guías internacionales sobre el cuidado y el uso de los animales de laboratorio (Directiva 2003/65/CE y Real Decreto 53/2013). Se mantuvieron en estas condiciones hasta la edad deseada de seis semanas. Los animales fueron sometidos a dieta absoluta, con agua, *ad libitum*, 12 horas antes del sacrificio correspondiente.

Todos los procedimientos con animales fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

3.2 MATERIALES

✓ INSTALACIONES

- Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (PAE SA001, Salamanca, España), que proporcionó los animales de experimentación empleados en este estudio y donde permanecieron durante el estudio.
- Laboratorios del Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca; y laboratorios del Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Salamanca, donde se realizaron los estudios histológicos de colitis.
- Laboratorio del Departamento de Microbiología y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, donde se hicieron los estudios microbiológicos.
- Laboratorios de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca,

donde se realizaron las técnicas quirúrgicas y el resto de los estudios:

- Laboratorio 1 para trabajo con animales de experimentación, dotado de instalación fija de aire acondicionado y renovación del mismo, zonas de estabulación, mobiliario y de los elementos necesarios para la realización de modelos experimentales quirúrgicos desarrollados en la Tesis Doctoral.
- Laboratorio 2 para el desarrollo de las técnicas de determinación, en todo tipo de muestras, dotado de instalación fija de aire acondicionado, gases (O₂ y CO₂), vacío, mobiliario y de los instrumentos necesarios para la realización de los estudios de: Wester Blot, PCRs y ELISAs.
- Seminario para mantener reuniones de trabajo, dotado de sistema informático y proyección, fijos, y mobiliario adecuado para tales fines.
- Almacén para el material fungible

Todas las instalaciones anteriormente mencionadas cumplen con la normativa y legislación vigente para los cometidos que se han desarrollado en cada una de ellas.

✓ EQUIPOS EMPLEADOS

Aparatos	Casa comercial
Sellador de bolsas de autoclave	Selecta Sealcom 600
Esterilizador por gases	Amprolene AN74i
Autoclave	Raypa Steam Sterilizer.
Estufa	Heraeus E42
Estufa	p-selecta
Baño de ultrasonidos	Branson 2510

Sistema de anestesia por gases	Matrx
Mesas de quirófano robotizadas	
Fuente de luz fría	Schott
Congelador -80°C	Scientific
Contenedor de nitrógeno líquido de 110 litros	
Termodesinfectador	Miele
Balanza de precisión	Balanza Sartorius T2101
Sistema de purificación de agua	Millipore Elix 3
2 Agitadores orbitales	Cole Parmer Rocker Platform
Agitador magnético	Raypa AG-2. 2
Eppendorf	Mixmate
pHmetro	Oaktlon ph 510 series
Espectrofotómetro	Unicam Helios α
Lector de placas	Thermo
Equipo de Western Blot: BIO-RAD	Miniprotean
Equipo de Western Blot: BIO-RAD	Protean-xi cell
Termodesinfectador	Miele
Máquina de hielo automática	85 AS-E
Centrífuga Eppendorf	miniSpin
Equipo PCR Eppendorf	
2 Alimentadores Power-Pac HC	BIO-RAD
Equipo de revelado y análisis de imagen ImageQuant RT ECL	General Electrics
Equipamiento informático	

3.3 MÉTODOS.

3.3.1 INDUCCIÓN DE LA COLITIS.

El estudio se inició con la inducción a la muestra seleccionada de ratones, de un cuadro de colitis similar clínica e histológicamente a la colitis ulcerosa de los humanos.

Se realizó con la administración oral de Dextrano sulfato de sodio (DSS) (Affymetrix 40.000-50.000 KDa Ref. Cas 9011-18-1) (129).

La concentración de DSS utilizada será del 5%. Esta concentración fue seleccionada por dos aspectos:

- Resultados de la bibliografía existente (130),(131),(132).
- Realización de una fase de puesta en marcha del modelo de provocación de la colitis con distintas concentraciones (3,5%, 5% y 7%) con el fin de decidir cuál era la indicada para llevar a cabo el experimento. Se llevó a cabo con tres grupos de tres ratones en cada uno. Observamos que en nuestro modelo, concentraciones más elevadas del 5% provocan en los ratones un cuadro clínico de colitis grave e incluso la muerte y también daños histológicos muy graves, mientras que los efectos de la concentración de 3,5% eran demasiado leves. Por ello se decidió usar concentración de DSS del 5%.

La administración de DSS se realizó en el agua de bebida durante 7 días. Se calculó la cantidad total de ml de agua que bebe cada ratón durante los días de duración, que es entre 3 y 6 ml por día, a los que se añade una concentración de DSS al 5%.

3.3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.

La muestra de ratones empleada para el modelo curativo fue de 23 que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- **Grupo simulado (Sham; n=3)**: Constituido por tres ratones que no recibieron ni DSS ni CT1.

A los 20 ratones restantes se les administró DSS durante 4 días consecutivos hasta que presentaron actividad clínica secundaria al daño intestinal (diarrea \pm rectorragia). En ese momento (al cuarto día), los 20 ratones restantes se distribuyeron homogéneamente en dos grupos según la gravedad clínica.

- **Grupo control (DSS; n=10)**: Formado por 10 ratones que recibieron DSS.
- **Grupo tratamiento (DSS+CT1; n=10)**: Formado por los 10 ratones restantes que recibieron tres dosis de CT-1 (200 μ g/kg iv) a los 4,5 y 6 días de iniciar la administración de DSS.

Además de este modelo curativo, se realizó un pequeño estudio con un grupo de ratones knock out (K.O.) para Cardiotrofina-1. Es estudió se realizó en 8 ratones, 4 KO para CT-1 que se han descrito previamente (133).

- **Grupo WT-DSS** (n=4): Ratones de genotipo silvestre con acceso *ad libitum* al agua de bebida con una solución de DSS al 5%, durante 7 días.
- **Grupo KO-DSS** (n=4): Ratones con inactivación del gen productor de CT-1 que tuvieron acceso *ad libitum* al agua de bebida con una solución de DSS al 5%, durante 7 días.

3.3.3. MONITORIZACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS DE LA COLITIS

Durante los 7 días de duración del proceso experimental se realizó un seguimiento de la evolución de la colitis mediante:

- La observación de las heces de los ratones, de forma diaria y aproximadamente a la misma hora. Para ello se colocó diariamente una cartulina blanca en cada jaula y se evaluaron y puntuaron dos parámetros:
 - La consistencia de las heces fue medida usando una escala de 4 puntos:

0, heces normales; 1, heces blandas; 2, heces muy blandas pero formadas; y 4, líquidas (134).

- La intensidad del sangrado en las heces fue evaluado según una escala de 4 puntos: 0, sin sangre; 1, leve sangrado; 2, moderado sangrado; y 4, hemorragia masiva (134).
- La supervivencia y el peso: los animales por grupos detallados fueron estabulados en jaulas y observados diariamente hasta el día 7 de evolución para evaluar su estado general y supervivencia, así como el peso de cada día.

Estos datos clínicos (peso, supervivencia, consistencia y sangrado en las heces), se recogieron en una tabla para después realizar el análisis de los datos.

3.3.4 SACRIFICIO DE LOS RATONES Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Al finalizar el periodo experimental los ratones supervivientes fueron sacrificados mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal). Se recogieron muestras de sangre (3-5 ml) mediante punción aórtica que fueron centrifugadas a 7000 r.p.m. durante 7 min a 4 °C y almacenadas a -80 °C. Posteriormente se recogió el colon de cada animal, excluyendo el ciego. Se midió su longitud, se inspeccionó el aspecto y se dividió en tres fragmentes, proximal, medio y distal. Un trozo de colon, de la parte proximal, media y distal, fue fijado inmediatamente en formaldehído al 4% para la realización de estudios histológicos, mientras que el resto de colon fue almacenado a -80°C para posteriormente llevar a cabo el resto de análisis bioquímicos.

3.3.5 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las piezas de colon fueron mantenidas en el fijador durante 24 horas como máximo. Tras ese periodo, los intestinos fueron lavados con agua corriente y sumergidos en alcohol al 70% durante toda la noche. Posteriormente, fueron procesados como sigue:

Se sometió a los tejidos a una deshidratación, requisito necesario para su inclusión posterior en parafina:

- Etanol al 80% durante 1 hora.
- Etanol al 90% durante 1 hora.
- Etanol al 100% dos pases de hora.
- Etanol de 100º - tolueno en proporción 1:1 durante 1 hora.
- Tolueno puro durante 2-3 horas.

Después de la deshidratación, los tejidos se sumergieron en parafina líquida y mantenidos en estufa a 60°C durante 24 horas.

Al día siguiente, los tejidos fueron introducidos en moldes metálicos específicos para la formación de bloques y se les añadió parafina limpia. Una vez enfriados durante 2-3 horas a 4°C los bloques formados y numerados convenientemente, fueron desmontados de los moldes metálicos y mantenidos a dicha temperatura hasta su corte.

Los bloques fueron cortados con un microtomo Microm HM 310. De esta manera, se efectuaron secciones de 3 µm de grosor para las tinciones con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y los estudios inmunohistoquímicos. En el caso de las muestras destinadas a inmunohistoquímicas los portaobjetos utilizados estaban salinizados previamente para incrementar la adherencia de los tejidos.

✓ [Tinción hematoxilina-eosina](#)

Los cortes fueron desparafinados e hidratados siguiendo la técnica descrita en el punto anterior. A continuación, los portas fueron cubiertos con hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos y lavados con agua en varios cambios. Posteriormente fueron cubiertos con eosina durante 8 minutos y deshidratados con soluciones crecientes de alcoholes según se expone a continuación:

- Alcohol 70% durante 5 min.
- Alcohol 80% durante 5 min.
- Alcohol 90% durante 5 min.
- Alcohol 1000% durante 5 min.
- Xilol 3 pases de 5 min.

Posteriormente los portas fueron montados con DPX y cubreobjetos.

✓ Técnica de Inmunohistoquímica:

Se utilizaron cortes de 3 μ m de todos los grupos y para cada una de los anticuerpos utilizados en el estudio, que se desparafinaron y se hidrataron.

A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico mediante la incubación de las secciones con una solución de citrato en microondas durante tres minutos (BioGenex, CA).

Para inhibir la peroxidasa endógena se utilizó agua oxigenada al 3% durante 10 minutos y, nuevamente, se realizó un lavado de 5 minutos con PBS. A continuación, se incubaron los cortes durante una hora con suero bloqueante, con el fin de que no tuviera lugar un marcaje inespecífico.

Los pasos posteriores se realizaron de forma automatizada mediante el sistema Bond-max[®] (Leica Biosystems, Melbourne, Australia). Se efectuaron previamente comparaciones entre el método manual y el automático mostrando ambos similares resultados en los patrones de tinción, pero con una mayor reproductibilidad e intensidad de tinción con el método automático, por lo que este fue el de elección para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

El sistema retiró el exceso de líquido que pudiera quedar en las preparaciones y las mismas se incubaron durante una hora con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- Anti CD68, monoclonal de ratón: Dako Diagnósticos, Barcelona, España, a una dilución de 1:100.
- Anti iNOS, monoclonal de ratón: Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA, a una dilución de 1:500.
- Anti Caspasa 3, policlonal de conejo: Cell Signaling Technology, MA, USA a una dilución 1:50.

El procedimiento de visualización se realizó utilizando el Novolink Polymer Detection System® (RE7140-K) con una incubación con post-primario de 8 minutos, polímero durante 8 minutos y Diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos. Por último se realizó una tinción de contraste de la muestra con hematoxilina.

3.3.6 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Las muestras de ganglios linfáticos, pulmón y bazo fueron recogidas en condiciones de esterilidad. El transporte de las muestras al laboratorio de microbiología y el procesamiento de las mismas se realizó de forma inmediata. Se pesaron y se diluyeron a 1:10 en solución salina estéril. Las muestras se homogeneizaron y se cultivaron con una asa calibrada de 100 µl (0,1 ml) en placas de agar sangre, agar chocolate, agar manitol y agar McConkey, y las placas se incubaron durante 24 ha 37 ° C para aislamiento de bacterias aerobias y en agar Schaedler con 5% de sangre de cordero (Biomerieux) para el cultivo de bacterias anaerobias y se incubaron en una cámara anaeróbica durante 48 horas a 37 ° C. Los aislamientos fueron identificados de acuerdo a los protocolos de rutina del laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de Salamanca en base a sus características morfológicas y propiedades bioquímicas.

3.3.7 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LAS VARIABLES MOLECULARES

✓ [ELISA](#)

Obtención de las muestras:

Utilizamos muestras sanguíneas no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a -80°C .

Principios del ensayo:

Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de “sándwich”. En primer lugar se utilizó una placa con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-citoquina adherido en cada uno de ellos para capturar la citoquina presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar la placa para eliminar el material no adherido se añadió un anticuerpo policlonal anti-IGG de ratón conjugado con peroxidasa. A continuación la placa se lavó de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato en la que la peroxidasa catalizaba una reacción que hacía cambiar el color del sustrato. El cambio de color se detuvo por acidificación.

Preparación de la placa y procedimiento del ensayo:

Diluimos el anticuerpo de captura en PBS en la concentración necesaria para trabajar. En una placa de 96 pocillos pusimos 100 μl por pocillo de anticuerpo de captura diluido. Tapamos la placa e incubamos toda la noche a temperatura ambiente. Aspiramos cada pocillo y lavamos con 400 μl de tampón de lavado, repitiendo el proceso 2 veces con un total de tres lavados. Después del último lavado eliminamos bien los restos de tampón de lavado mediante aspiración o volcando la placa en papel secante. Añadimos 300 μl de reactivo de dilución a cada pocillo. Incubamos a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora. Repetimos el paso aspiración/lavado como en el paso 2, y las placas estaban listas para añadir la muestra. Añadimos 100 μl de muestra o Standards en reactivo de dilución o en un diluyente apropiado por pocillo. Cubrimos con una tira adhesiva e incubamos 2 horas a temperatura ambiente. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μl por pocillo de

anticuerpo de detección, diluido en reactivo de dilución. Cubrimos con una nueva tira adhesiva e incubamos 2 horas a temperatura ambiente. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μ l de la dilución de Estreptavidina peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo. Cubrimos la placa e incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μ l de solución substrato a cada pocillo. Incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa. Añadimos 50 μ l de solución de parada a cada pocillo y movimos la placa con mucho cuidado para que se mezclara bien. Determinamos la densidad óptica midiendo la absorbancia a 450 nm λ . La absorbancia obtenida era proporcional a las cantidades de citoquina de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Los kits utilizados para medir la concentración de citoquinas en plasma fueron los que aparecen indicados a continuación:

Producto	Referencia
kit ELISA mouse TNFa	R&D systems ref. #MTA00B
Kit ELISA mouse INFgamma	R&D systems ref. #RYD-MIF00
Kit ELISA mouse CT-1	RayBiotech ref. ELM-CT-1

✓ [PCR](#)

La RT-PCR es una técnica semicuantitativa que permite determinar la expresión de genes determinados mediante transcripción inversa (RT, acrónimo del término inglés *reverse transcription*) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) celular al ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), y posterior

amplificación de una determinada región de éste mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos (135).

De esta manera, se consigue obtener rápidamente una cantidad de material biológico observable (ADNc) a partir de cantidades muy pequeñas de ARNm. La presencia o ausencia, o la mayor o menor cantidad del ARNm de un determinado gen se corresponde con una mayor o menor expresión, que se determina por una mayor o menor cantidad de su ADNc amplificado por la PCR.

Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total.

El aislamiento de RNA se realiza con el método NucleoSpin®RNA, para prevenir la degradación del RNA durante el procedimiento de aislamiento. El tejido colónico congelado se lisa mediante incubación en una solución que contiene grandes cantidades de iones caotrópicos. Este tampón de lisis inactiva inmediatamente RNasas, que están presentes en casi todos los materiales biológicos, y crea las condiciones que favorecen la adsorción de ARN a la membrana de sílice. ADN contaminante, que también está unido a la membrana de sílice, se elimina mediante una solución de ADNasa que se aplica directamente sobre la membrana de sílice durante la preparación (la DNasa libre de RNasa se suministra con el kit de extracción). El ARN puro se eluyó finalmente bajo condiciones de baja fuerza iónica con H₂O libre de RNasa.

La preparación de ARN utilizando kits NucleoSpin® de ARN se puede realizar a temperatura ambiente. El eluido, sin embargo, debe ser tratado con cuidado porque el ARN es muy sensible a pequeñas cantidades contaminantes de RNasas, que a menudo se encuentran en el material de laboratorio, las huellas dactilares y el polvo. Por ello hay que utilizar reactivos especiales y material especialmente lavado para este fin. Para asegurar la estabilidad del ARN, debe mantenerse congelado a -20 ° C durante corto plazo o -70 ° C para almacenamiento a largo plazo.

Medida de la concentración del ARN.

Se realizó una dilución 1:10 en H₂O DEPC con una fracción (10 µL) de la solución de ARN obtenida para evitar errores derivados de manipular volúmenes muy pequeños. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NANODROP-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Technologies, US). Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 40 µg/mL de ARN. Se aseguró la ausencia de elevada contaminación proteica, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260nm/280nm y 260nm/230nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

Retrotranscripción (ARNm →ADNc).

En este paso se sintetiza el ADN complementario del ARNm (que es una pequeña parte del ARN total extraído). Esto se consigue mediante un cebador complementario de la cola de poliadenina (poli-A) que contiene el ARNm en el extremo 3' y que está ausente en el resto del ARN celular. Esta secuencia complementaria es la polidesoxitimina (poli-dT).

Dos µg de ARN de cada muestra se llevó a un volumen final de 27,5 µL utilizando agua DEPC y se incubaron a 65°C durante 3 minutos -para que el ARN se desnaturalizara a su estructura primaria- e inmediatamente se pasaron a hielo. Seguidamente se añadió a cada muestra de ARN un volumen de la *premezcla de reacción* de 12,5 µL que contenía: 2 µl de dNTPs (mezcla equimolar de desoxinucleótidostrifosfato -dATP, dCTP, dGTP y dTTP- 10 mM, Applied Biosystems), 8 µL de tampón "M-MLV 5x" (proporcionado por el fabricante, Promega), 1 µL de oligo-dT (1 µg/µL, Isogen; oligonucleótido formado por 16 desoxitimas que permite "retrotranscribir" únicamente el ARNm), 0,5 µL del inhibidor de ARNsas "RNAsin" (Promega) y 1 µL de la enzima retrotranscriptasa (RT M-MLV, Promega). Finalmente se llevó a cabo la reacción de *retrotranscripción* a

42°C durante 90 minutos en un termociclador (MyCycler, BioRad). Una vez obtenido el ADNc correspondiente a cada muestra se almacenó a -20°C.

Determinación de la concentración de ADNc.

Se realizó una dilución 1:10 en H₂O mQ estéril con una fracción (10 µL) de la solución de ADNc obtenida. La concentración de ADNc se determinó por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NANODROP-1000. Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50µg/mL de ADNc. Se aseguró la ausencia de excesiva contaminación proteica o de fenol u otros contaminantes, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260 nm/280nm y 260nm/230nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

PCR (amplificación de secuencias específicas de ADNc).

Igualamos todas las concentraciones de ADNc a la más pequeña de las obtenidas en el paso anterior (7.3.5) en un volumen final de 23µL con agua mQ estéril. A cada muestra de ADNc (10 µL) se añadieron 27µL de la premezcla de reacción formada por los siguientes componentes: 25µL de la enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega) que ya incluye los dNTPS, el tampón de reacción con Mg y la enzima, 1µL de oligonucleótido 3' (cebador directo) y 1µL de oligonucleótido 5' (cebador inverso) (que estaban en un concentración de 100ng/µL) de las secuencias específicas de los genes que se deseaba amplificar (Tabla 5).

Las muestras se incubaron en un termociclador (MyCycler, BioRad). Se seleccionó el programa adecuado para cada par de oligonucleótidos añadidos (Figura 13). Todos los programas utilizados tenían en común: (i) una primera fase de desnaturalización del ADNc utilizado como molde (95°C durante 5 minutos), única en todo el proceso; (ii) una segunda fase de desnaturalización con la que comienza cada ciclo de amplificación (95°C durante 1 minuto); (iii) la fase de hibridación de los oligonucleótidos a una determinada temperatura específica de

cada par de oligonucleótidos , durante 1minuto); (iv) una fase de extensión de la hebra por la Taq polimerasa (a 72 °C durante 1minuto); y (v) una última fase de extensión final que permitía a la enzima sintetizar las hebras inacabadas (72°C durante 5minutos). Las fases de la ii a la iv se repitieron un cierto número de ciclos específico de cada amplificación, después de completar la fase i y antes de entrar en la fase v. Lo que varió entre unos programas y otros fue la Tm y el número de ciclos que se repetían las fases ii a la iv (Figura 13).

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados. Los *primers* y su *Tm* o temperatura de unión, utilizados para llevar a cabo la PCR de los distintos genes a analizar se detallan a continuación:

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicon (pb)	Tm (°C)
TNF α	<i>Fw</i>	AGCACAGAAAGCATGATCCG	212	60
	<i>Rv</i>	CTGATGAGAGGGAGGCCATT		
IFN γ	<i>Fw</i>	TACACACTGCATCTTGGCTTTG	128	57,5
	<i>Rv</i>	CTCCACATCTATGCCACTTGAG		
IL-6	<i>Fw</i>	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	79	60,5
	<i>Rv</i>	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC		
IL-10	<i>Fw</i>	ATGCTGCCTGCTCTTACTGACTG	216	58.8
	<i>Rv</i>	CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTGC		
IL-17	<i>Fw</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	142	58.8
	<i>Rv</i>	AGCTTTCCTCCGCATTGA		
GAPDH	<i>Fw</i>	GTCGGTGTGAACGGATTTG	153	55,9
	<i>Rv</i>	GAATTTGCCGTGAGTGGAGT		

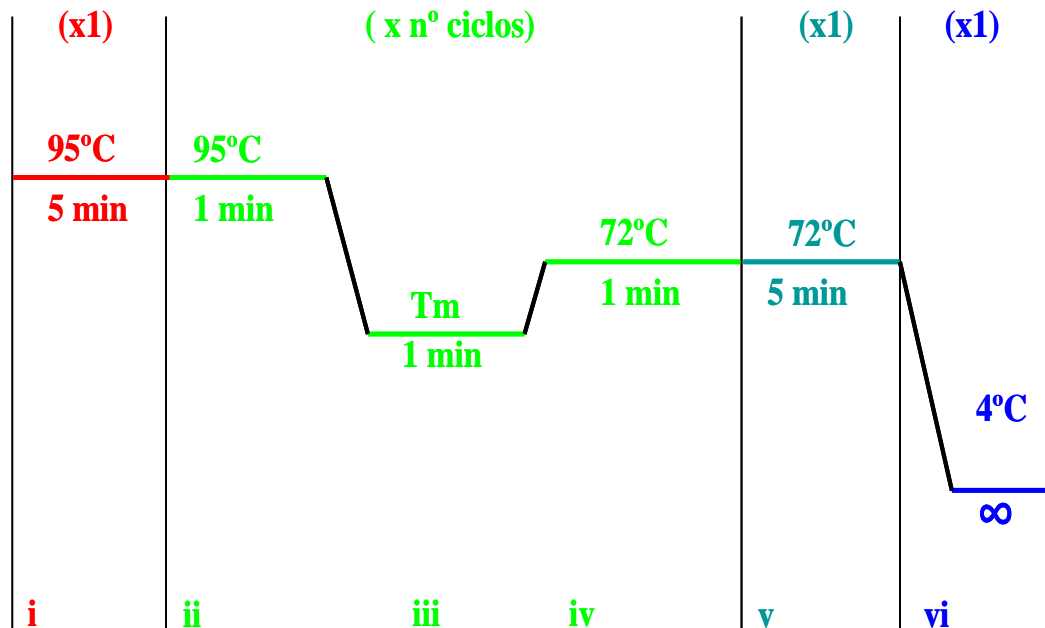


Figura13.- Esquema de las fases de la amplificación por PCR.

Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez realizada la PCR, se cargaron 20 μL de cada muestra obtenida en los pocillos del gel de 2% de agarosa en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) pH=8,1-8,3 con Syber Safe (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel de agarosa) como colorante intercalante, que permitió visualizar el ADNc a la luz ultravioleta. En uno de los pocillos, se cargó 1 μL de marcador de pesos moleculares (100bp ladder ADN, Invitrogen). La electroforesis se efectuó aplicando al gel un voltaje constante de 110 V en una cubeta llena de TBE. Para observar las bandas a la luz ultravioleta y para capturar la imagen, se colocaron los gels en un *transiluminador* (ImageQuant RT ECL imager, General Electric Healthcare).

La cuantificación por densitometría de membranas de Western Blot y de gels de agarosa de PCR se lleva a cabo mediante el software ImageQuant TL (General Electric Healthcare).

✓ WESTERN BLOT.

Extracción de proteínas de mucosa de colon para western blot:

De las muestras de colon recogidos aproximadamente 1/3 del colon se congeló instantáneamente introduciéndolo en nitrógeno líquido, conservándolo en tubos de criocongelación a -80°C.

Posteriormente, la muestra congelada se trocea y se toman aproximadamente 100 mg de tejido, a los que se añaden 1000 µL de tampón de lisis, para la homogenización.

Tampón de lisis conteniendo magnesio: MLB (Magnesium-containing Lysis Buffer) 5X (Upstate Biotechnology #20-168)

Preparar el tampón de lisis MLB en hielo: MLB 5x (µL), Agua ultrapura (µL), NaCl 150 mM, glicerol 10%, NaF 25 mM, Na₂VO₄ 1 mM, PMSF 100 mM, leupeptina 10 µg/mL, y aprotinina 10 µg/ml.

Se procedió a la homogenización de las muestras a 4°C, se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y a continuación, el lisado tisular, se centrifugó durante 25 minutos a 12000 g y a 4°C. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización, una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.

Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el kit Bio-Rad DC Protein Assay. Esta es una técnica colorimétrica de determinación de proteínas basada en el método de Lowry (1951). El ensayo consta de dos pasos, primero las proteínas reaccionan con cobre en un medio alcalino, solución alcalina de cobre y tartrato, y después las proteínas tratadas con cobre reducen el reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico) dando una reacción coloreada azul con pico máximo de absorbancia a 750 nm.

Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras fueron diluidas (1:20) en tampón de lisis y se utilizó un kit de Bio-Rad, basado en el método de Lowry (136).

La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Microtest™ 96, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) utilizando 5 μ L tanto para las muestras como para la recta patrón. El ensayo consta de dos pasos, primero las proteínas reaccionan con cobre en un medio alcalino, solución alcalina de cobre y tartrato, y después las proteínas tratadas con cobre reducen el reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico) dando una reacción coloreada azul con pico máximo de absorbancia a 750 nm.

Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA. A continuación se añadieron 25 μ L del reactivo A (suplementado con 20 μ L del reactivo S por cada mL reactivo A, ya que las muestras contenían detergente: IGEPAL CA-630), posteriormente se añadieron 200 μ L del reactivo B. La mezcla se incubó al menos 15 minutos y se midió la absorbancia a 750 nm. La concentración proteica de las muestras se obtiene a partir de los datos de absorbancia por extrapolación en una recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de albúmina bovina sérica, en un rango entre 0,2 mg/mL y 1,6 mg/mL. Esta recta patrón se realiza cada vez que mide un grupo de muestras.

Detección de proteínas por Western Blot.

El método de Western blotting se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis en función de su peso molecular, que, una vez separadas, se pueden identificar, localizar y cuantificar por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos (137).

Los anticuerpos están acoplados a sistemas de detección, que permiten localizar las proteínas y establecer una relación entre la intensidad de la señal del sistema de detección y la cantidad relativa de la proteína en las diferentes

muestras. El sistema de detección más utilizado es el quimioluminiscente. En él, el anticuerpo está unido a la enzima HRP que, en presencia de un sustrato apropiado, produce una reacción luminiscente. La luz generada en la membrana se detecta mediante una cámara para capturar la imagen (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare). La intensidad de la señal queda reflejada como mayor o menor área de impresión, que es proporcional a la cantidad de anticuerpo y, este a su vez, proporcional a la cantidad de proteína. La separación de las proteínas mediante electroforesis se basa en el método de Laemmli (138).

Los geles que permiten la separación electroforética de las proteínas se preparan con acrilamida/bisacrilamida al 30% (29,2% acrilamida y 0,8% bisacrilamida).

En primer lugar se prepara el gel separador o *running gel* con un porcentaje entre 6-15% de acrilamida, en función del tamaño de la proteína que se quiera identificar. El gel separador se deja polimerizar durante 20 minutos.

Seguidamente se prepara el gel concentrante o *stacking gel*, que es el que contiene los pocillos para la carga de muestras, con 5% de acrilamida. Dejamos polimerizar 20 minutos. Todos los geles para las distintas proteínas se han preparado con un grosor de 1mm.

Cargamos 150 µg/pocillo de extracto proteico de cada muestra de tejido, o 25 µl de plasma al que hemos eliminado la albúmina, mezclándolo con el mismo volumen de tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS y 0,01% de azul de bromofenol) 2X y el agente reductor 2-mercaptoetanol, previamente desnaturalizado a 100 °C durante 5 minutos. (Figura 14).

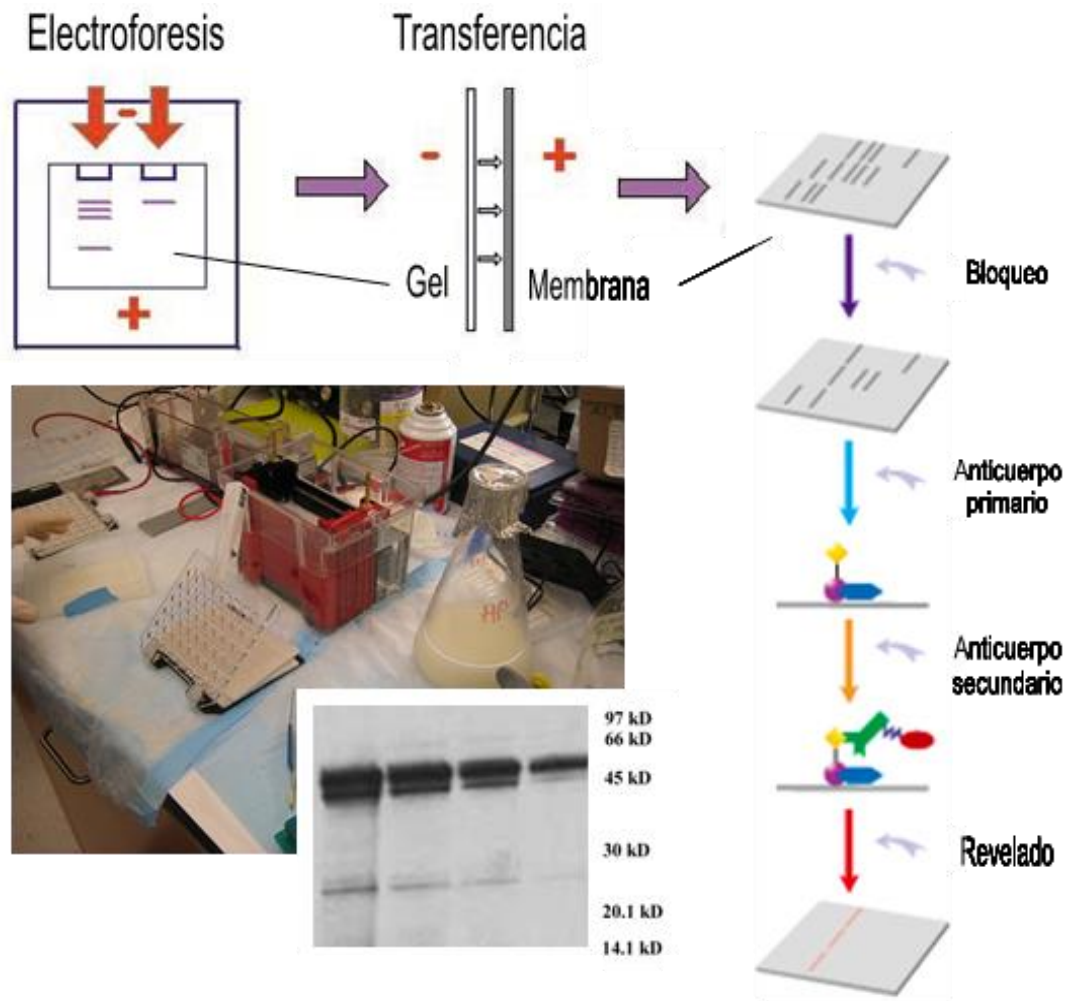


Figura 14. Representación esquemática del sistema de electroforesis.

En estas condiciones (desnaturalización y reducción), se deshicieron las interacciones entre proteínas con objeto de que cada una migrara aproximadamente a la altura del marcador de peso molecular que le correspondía por tamaño, y su identificación pudiera beneficiarse de este criterio. Una vez polimerizados, los geles se colocan en la cubeta de electroforesis que contiene el tampón de electroforesis. En los correspondientes pocillos se cargan las muestras y 10 μ L de marcador colorimétrico de pesos moleculares. (Low / Broad range, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

La electroforesis se lleva a cabo mediante una fuente de alimentación, con un voltaje constante de 120V durante 120 minutos aproximadamente, tiempo suficiente para separar las proteínas, con tampón de electroforesis.

Las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. El gel está orientado hacia el polo negativo, mientras que la membrana se sitúa en el positivo. La corriente generada entre los dos electrodos hace que las proteínas se muevan hacia el polo positivo. La transferencia se realizó en un Trans-Blot Semi-Dry transfer cell BIO-RAD con solución de transferencia (glicina 190 mM, Tris 20mM pH 8.3), durante 30 minutos, manteniendo el voltaje de 25 V, que proviene de la fuente de alimentación, habiendo embebido previamente el material y equilibrado el gel y la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL Amersham Biosciences) en el tampón de transferencia durante 15 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado TTBS e inmediatamente se incubó con 10 mL de tampón de bloqueo en agitación constante, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección.

La incubación con el anticuerpo primario, a la dilución y temperatura adecuada en el tampón correspondiente en agitación constante, se realizó durante tiempos diferentes dependiendo de cada proteína. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado, y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario, a la dilución adecuada, durante los tiempos que especificaremos con cada proteína. Al terminar se hicieron otros 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado.

La detección de las bandas específicas de las distintas proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia. Para el revelado se utiliza una solución comercial (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare), en una proporción de 40:1, el volumen final de reactivo por membrana necesario es de 0.1 ml/cm², se pone en contacto con la membrana

durante 5 minutos, en agitación constante a T^a ambiente y a continuación se desechó la solución de revelado. Seguidamente se colocó la membrana en una cámara para capturar la imagen (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare). Una vez capturada la imagen es cuantificada la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa (ImageQuant TL software).

Los anticuerpos primarios y secundarios, utilizados para llevar a cabo el Westernblot de las distintas proteínas a analizar se detallan a continuación en la Tabla 6.

TABLA 6. Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios usados en el Westernblot

ANTICUERPO	PM (kDa)	INCUBACIÓN										CASA COMERCIAL	REFERENCIA
		BLOQUEO	PRIMARIO				SECUNDARIO						
			tiempo	T ^a	Dil.	Dvte.	Especie	tiempo	T ^a	Dil.	Dvte.		
iNOS	130	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Santa Cruz Biotech.	sc-651
CT-1	24	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	rat	1h	RT	1-10 000	3% BSA	R&D systems	MAB 438
pSTAT-3	79-86	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Cell Signaling	9145S
STAT-3	79-96	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Cell Signaling	9132
pNFkB	68	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Cell Signaling	3031S
NFkB	68	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Cell Signaling	3034S
Caspasa-3 activada	17-19	5% BSA	o/n	4°C	1-1000	3% BSA	Rabbit	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Cell Signaling	9661
β-actina	42	5% BSA	o/n	4°C	1-10000	3% BSA	mouse	1h	RT	1-10 000	3% BSA	Sigma	A 5441

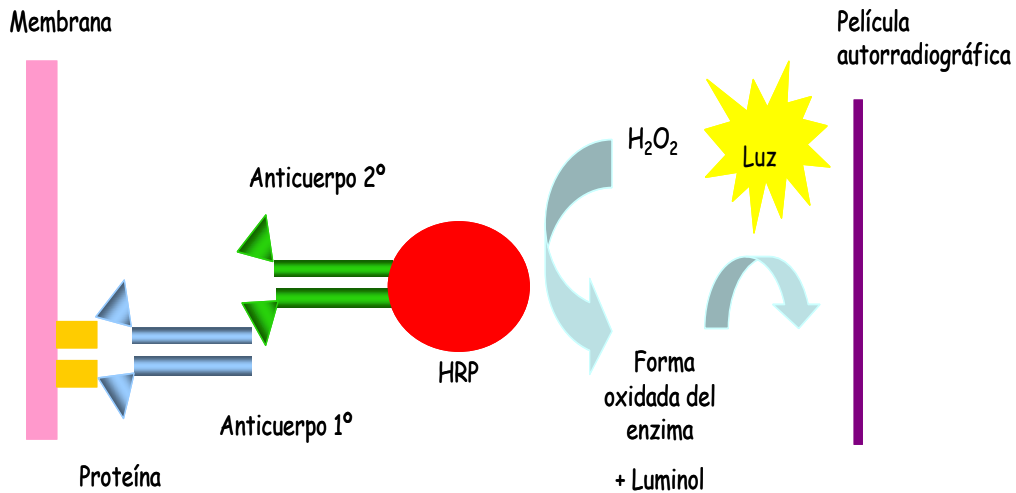


Figura 15. Principio del sistema de detección en el “Western blot”.

El anticuerpo primario reconoce a la proteína y se une a ella. El anticuerpo secundario reconoce al primario, y lleva asociada la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produce luz que imprime una película fotográfica con intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario unido a la proteína, en definitiva, de forma proporcional a la cantidad de proteína.

3.4 ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

En el caso de las variables clínicas (diarreas y sangre en las deposiciones), por la naturaleza de la cuantificación de estas variables, se han aplicado test no paramétricos. En este caso y dado que se presentan dos factores a analizar, uno de medidas repetidas (tiempo) y otro de medidas independientes (grupos experimentales), se ha analizado gráficamente la presencia de la interacción entre el tiempo y los grupos experimentales. Si se detecta la presencia de dicha interacción se analizan las diferencias entre los niveles de un factor para cada nivel del otro factor. En el caso de los tiempos se ha utilizado el test no paramétrico de Friedman para datos emparejados. Para detectar entre qué tiempos hay diferencias se ha aplicado el test no paramétrico a posteriori de Nemenyi. Para la

comparación de los grupos experimentales para cada tiempo se ha utilizado el test de Kruskal Wallis con su test a posteriori de Dunn.

En el caso del peso debido a que se distribuye normalmente, se ha utilizado el Análisis de la varianza (ANOVA) con un factor de medidas repetidas y un factor independiente. En el caso de detectar interacción se ha realizado el mismo proceso que para las variables anteriores pero con la utilización del ANOVA de medidas repetidas para los tiempos y el ANOVA de un factor para medidas independientes en el caso de los grupos experimentales.

Para el análisis de las variables de cuantificación de las células del tejido (estudio inmunohistoquímico), debido a la naturaleza de este tipo de datos, se ha realizado el test no paramétrico de Kruskal Wallis para ver si hay diferencias entre los tres grupos y posteriormente el test Dunn para conocer a que grupos se deben las diferencias.

Para contrastar la Normalidad de los datos se ha considerado el test de Shapiro-Wilks.

En todos los contrastes con más de dos grupos se ha realizado una corrección Bonferroni para evitar el incremento del error tipo 1. El nivel de significación utilizado ha sido el 5%.

Para el análisis de los datos se ha utilizado el SPSS versión 21 y Xlstat versión 7.5.

En el análisis de las variables citoquinas y marcadores inflamatorios, todos los valores han sido representados como $X \pm DS$ (media \pm desviación estándar).

La inferencia estadística de los resultados presentados (valores numéricos procedentes de muestras aleatorias independientes obtenidas de las poblaciones estudiadas) se realizó con el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) aplicando los siguientes test estadísticos dependiendo del tipo de distribución y de las varianzas:

- Ante variables Normales con varianzas iguales aplicamos el test de Scheffe.

- Ante variables Normales con varianzas distintas aplicamos transformaciones estabilizadoras de la varianza y posteriormente el test de Scheffe.
- Ante variables de cualquier otra distribución con varianzas iguales o distintas utilizamos métodos no paramétricos: el test Kruskal Wallis

Para todos los estudios anteriormente indicados un valor de $p < 0,05$ se aceptó como resultado significativo.

Resultados

4.1 RESULTADOS CLÍNICOS

El desarrollo de colitis, así como la gravedad de la actividad inflamatoria desarrollada en el colon de los ratones se evaluó mediante los siguientes parámetros:

✓ Consistencia de la heces:

En el grupo control, la consistencia de las heces disminuía de forma progresiva a partir del tercer día de la ingesta de DSS. El día siete, último día del estudio, el 90% de los ratones de este grupo presentan deposiciones líquidas (4 puntos).

En el grupo tratamiento, ningún ratón presentó deposiciones líquidas y tan solo el 20 % presentaba discretos cambios de la consistencia (1-2 puntos).

En el grupo simulado no cambió la consistencia de las heces.

El estudio estadístico reveló que en los tres primeros días no había diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Los días 4,5, 6 y 7 se encuentran diferencias cada vez mayores hasta ser altamente significativas (día 5; p-valor=0,002; día 6: p-valor=0,0006; día 7: p-valor<0,0001)

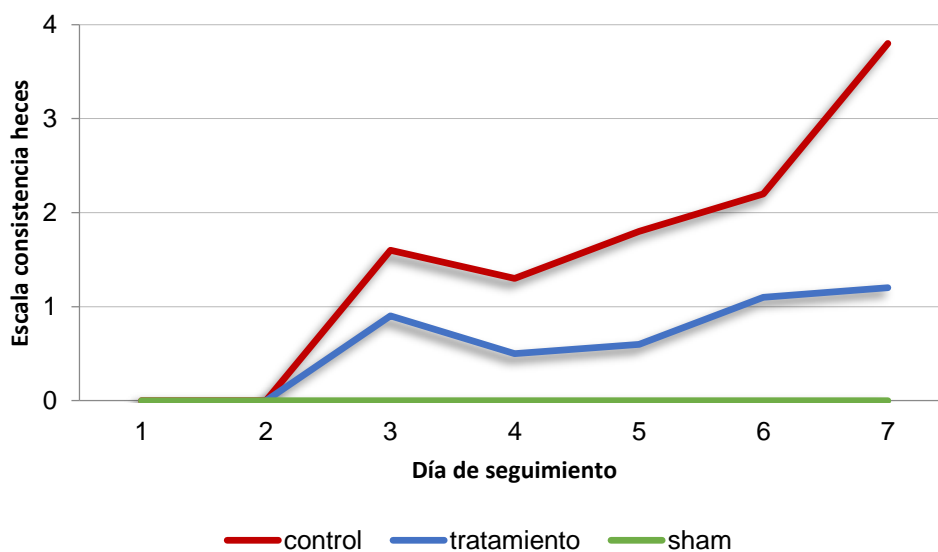


Figura 16. Cambio en las características de las deposiciones a lo largo de los 7 días del estudio

✓ Sangre en las heces:

En los ratones del **grupo control** comienza a aparecer sangre en las heces en pequeña cantidad a partir del cuarto día, en el 60% de la muestra. La cantidad de sangre se incrementa durante la monitorización, con sangre abundante el último día del seguimiento en el 100% de estos ratones.

En el **grupo tratamiento** sólo el 20 % de los ratones presenta hemorragia grave (4 puntos) al final del seguimiento.

En el **grupo simulado** no aparece sangre en las deposiciones.

Las diferencias estadísticamente significativas se observaron a partir del quinto día (día 5; p-valor=0,002; día 6: p-valor=0,006; día 7: p-valor=0,0018). Al analizar entre que grupos había diferencias, se observó que era entre el grupo control y los otros dos grupos.

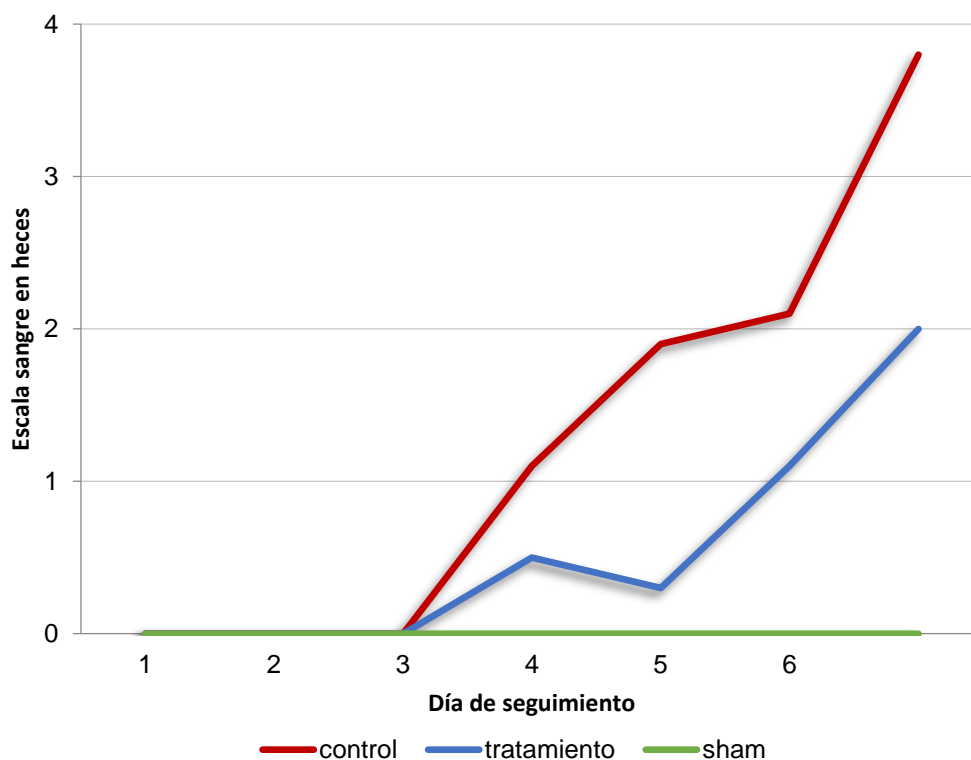


Figura 17. Evolución de la presencia de sangre en las deposiciones a lo largo de los 7 días del estudio.

✓ Peso:

Los ratones presentaron una pérdida discreta de peso durante el seguimiento del alrededor del 2% en todos los casos, incluido el simulado. Si analizamos las diferencias entre los grupos experimentales para cada uno de los días, no se ha detectado significación estadística en los seis primeros días, pero sí en el séptimo (p-valor=0,018). Estas diferencias se deben al grupo sham frente al control (p-valor=0,012) y frente al grupo tratamiento (p-valor 0,002)

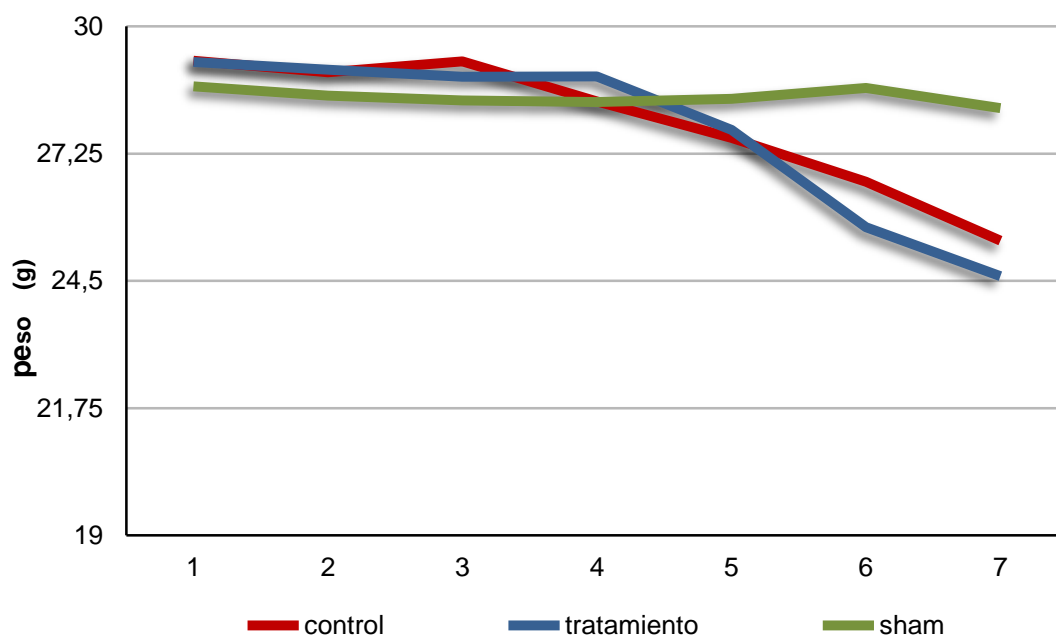


Figura 18. Evolución del peso a lo largo de los 7 días del estudio.

✓ Estado general:

La valoración del estado general de cada ratón se ha realizado de forma subjetiva a lo largo de los días del seguimiento en base a la movilidad, la capacidad de reacción y la respuesta a estímulos. Claramente en el grupo control, había una pérdida de movilidad y de respuesta a estímulos que se hacía muy llamativa en los dos últimos días del seguimiento. No observamos estos cambios en los otros grupos, tratamiento y simulado.

✓ Acortamiento del colon:

No existen diferencias en la longitud del colon entre los distintos grupos.

✓ Mortalidad:

Ningún ratón murió durante el seguimiento, aunque el último día del estudio se observaba una clara diferencia en el estado de los ratones, apareciendo una importante diarrea líquida con gran cantidad de sangre, postración y ausencia de respuesta a estímulos en los del grupo control, mientras que los del grupo tratamiento tenían un aspecto y comportamiento mucho más normal.

Macroscópicamente también encontramos claras diferencias en el aspecto del colon como se demuestra en las siguientes fotos. El colon de los ratones del grupo control aparecía dilatado, con gran cantidad de contenido hemático frente al del grupo tratamiento.



Figura 19: Colon grupo control



Figura 20: Colon grupo tratamiento

Ratones knock out:

Se estudiaron cuatro ratones con inactivación del gen de CT-1 de los cuales dos fallecieron durante el seguimiento, al quinto día de iniciar la ingesta de DSS en el agua de bebida. Los otros dos ratones de este grupo presentaban diarrea líquida y hemorragia grave desde el cuarto día con claras diferencias clínicas respecto a los ratones del modelo curativo.

4.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS Y DE INMUNOHISTOQUÍMICA

✓ Tinción con Hematoxilina Eosina:

Al estudiar las muestras teñidas con hematoxilina eosina de los animales pertenecientes a los tres grupos, se observa que los ratones del grupo control presentan las alteraciones típicas de colitis ulcerosa, consistentes en ulceraciones distribuidas de manera focal por la superficie interna del colon. Estas úlceras invaden todo el grosor de la pared, penetrando, incluso, a la lámina propia. En las áreas ulceradas se ha producido una destrucción total de las criptas con desaparición del epitelio, incluidas las células caliciformes. En su lugar aparece un gran infiltrado inflamatorio y tejido de granulación que ocupa también la lámina propia hasta las capas musculares. En las zonas del colon que no aparecen úlceras, el tejido conserva la histología normal sin que se aprecien alteraciones estructurales. (Figura 21).

El grupo de animales tratados con CT-1, aún presenta úlceras, fundamentalmente en colon distal, pero menos numerosas que las encontradas en el grupo control y con una extensión también menor a lo largo del colon estudiado. En muchas zonas, si bien se observar infiltrado inflamatorio en la lámina propia, el epitelio de la mucosa del colon aparece bastante bien conservado, incluidas las células caliciformes. La mayor parte del colon no tiene alteraciones estructurales (Figura 22).

Los animales del grupo simulado no presentaron alteraciones estructurales, siendo el colon totalmente normal (Figura 23).

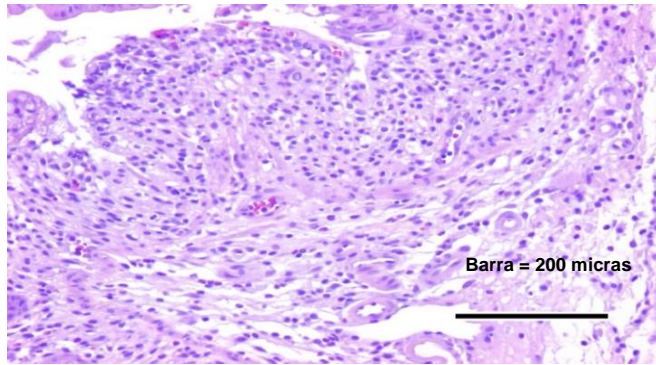


Figura 21: Grupo Control

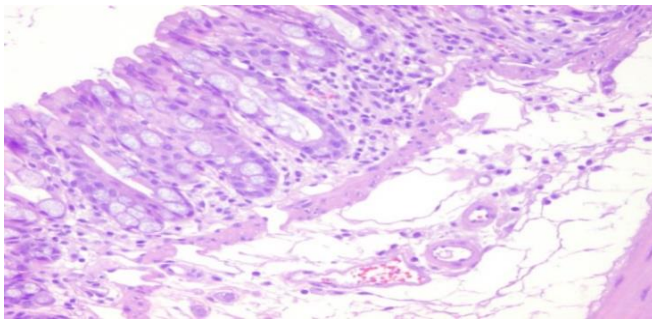


Figura 22: Grupo Tratamiento

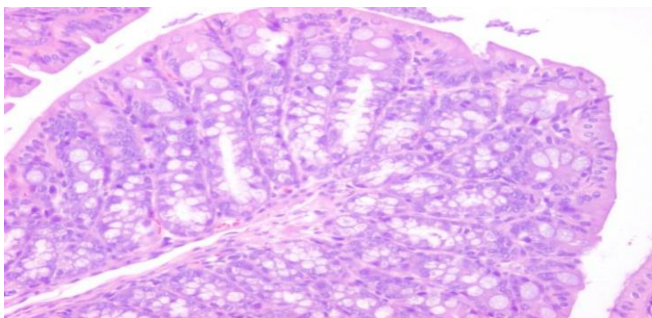


Figura 23: Grupo Simulado

Figuras 21, 22,23: Imágenes representativas de secciones de colon teñidas con hematoxilina eosina en los tres grupos estudiados

Por otra parte, al estudiar las muestras de los dos ratones knock out (K.O.) para CT-1, se observaron lesiones difusas graves en colon distal que eran visibles en todas las secciones efectuadas. Dichas lesiones ocupaban además casi toda la circunferencia de la pared del colon, con muy pocas zonas de mucosa conservada (Figura 24). Las lesiones histológicas encontradas eran claramente más graves que en el grupo control.

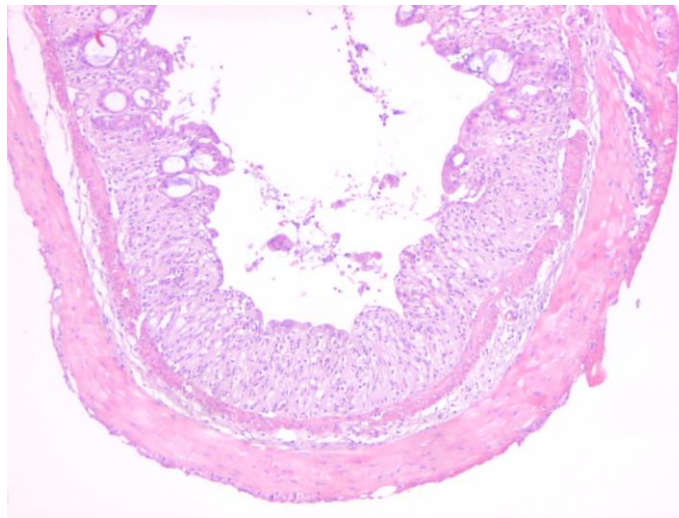


Figura 24: Imagen representativa de sección de colon distal del grupo KO teñida con hematoxilina eosina

✓ Inmnohistoquímica:

▪ CD68

El CD 68 es una glicoproteína que se encuentra en los lisosomas de los monocitos y los macrófagos. Se sabe que los macrófagos participan en la respuesta inmune innata, la cual se haya alterada en los pacientes con colitis ulcerosa. El sello distintivo de la actividad en enfermedad inflamatoria intestinal es una pronunciada infiltración de células de inmunidad innata en la mucosa intestinal. Con el objetivo de evaluar la actividad inflamatoria a través de la identificación de macrófagos utilizamos el marcador inmunohistoquímico CD68.

En los animales que recibieron DSS, se observan abundantes células que expresan CD68 localizadas fundamentalmente a cualquier nivel de las zonas ulceradas (Figura 25), aunque también es posible observar un número variable, pero en todo caso mucho menor, en el tejido conservado, donde suelen aparecer principalmente entre las criptas y el tejido conjuntivo subyacente. En los animales tratados con cardiotrofina, el número de células positivas es menor tanto en las zonas ulceradas como en el tejido normal, siendo la localización de las mismas similar a la descrita para el grupo control (Figura 26). En los animales del grupo simulado solo es posible observar de forma aislada expresión de CD68 fundamentalmente en la lámina propia, aunque también hay algunas células positivas entre las células epiteliales de la mucosa (Figura 27).

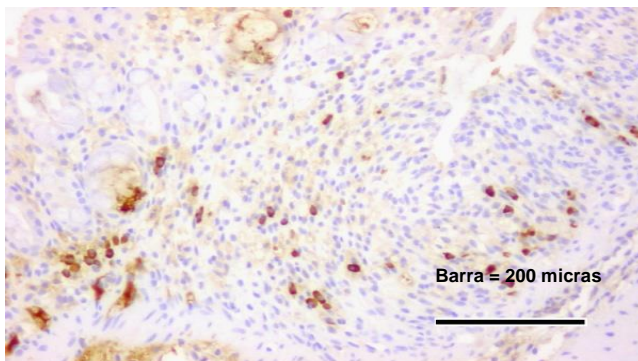


Figura 25: CD68 en Grupo Control

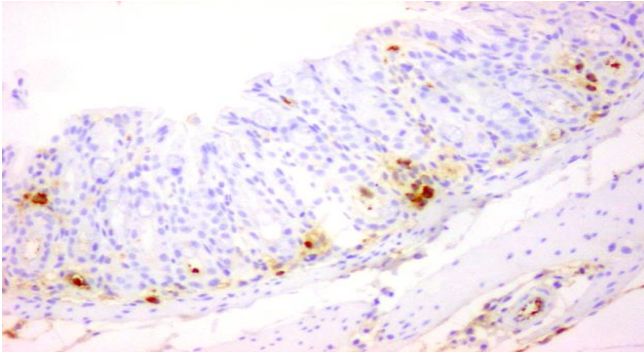


Figura 26: CD68 en Grupo Tratamiento

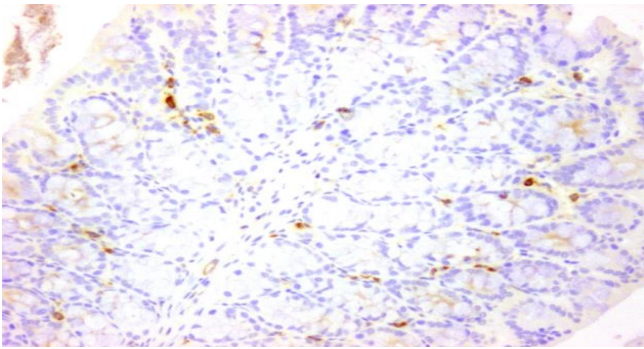


Figura 27: CD68 en Grupo Simulado

Figuras 25,26 y 27. Imágenes representativas de secciones de colon con marcador inmunohistoquímico CD68 en los tres grupos estudiados.

La cuantificación de las células que expresan CD68 (Figura 28) es significativamente mayor en el caso de los animales del grupo control que en los otros dos grupos del estudio. En el caso de los animales tratados con cardiotrofina, aunque la expresión es menor que en el grupo control, aún es significativamente mayor que la encontrada en el grupo simulado. Es decir, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. ($p < 0.0001$)

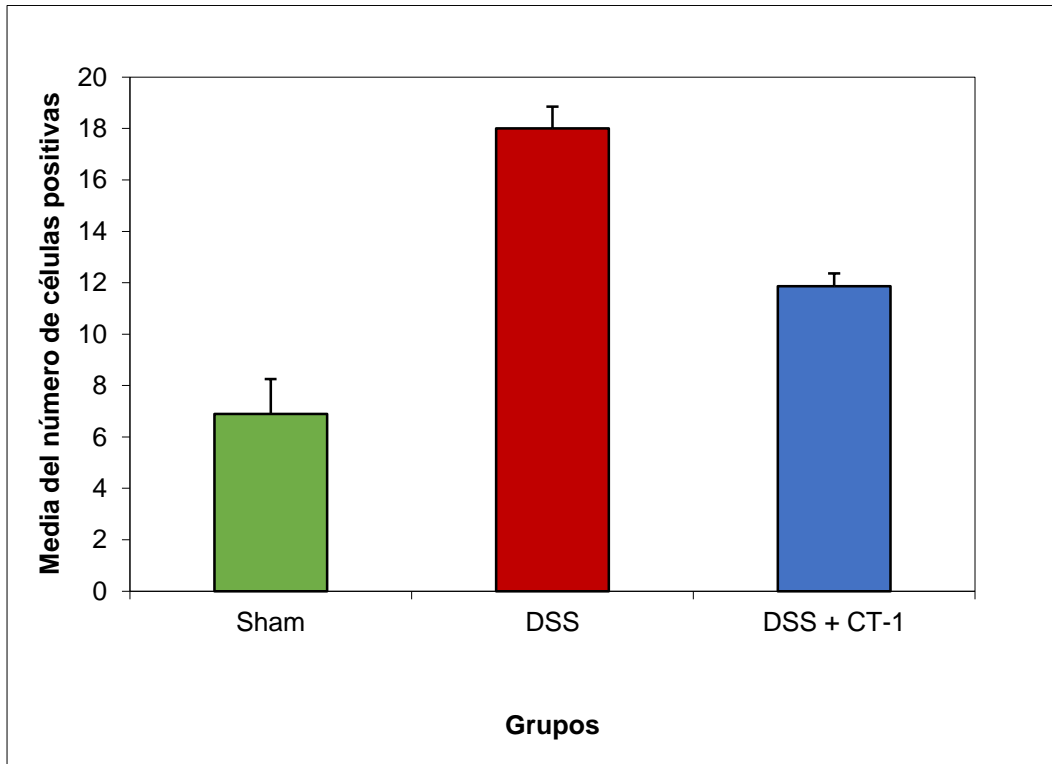


Figura 28: Cuantificación de células positivas para CD68 por inmunohistoquímica en los tres grupos estudiados

▪ Caspasa 3 activada

La caspasa 3 activada se utiliza como un marcador temprano de la apoptosis. Es un miembro de la familia de las proteasa que desempeña un papel importante en la fase de ejecución de la apoptosis.

Al microscopio es posible observar en el grupo control, un mayor número de células que expresan caspasa 3 activada en la lámina propia de las zonas ulceras y, en menor cantidad en la lámina propia y el epitelio del tejido sin ulceraciones (Figura 29). En los animales del grupo tratado, la expresión es mucho menor, incluso en las zonas en las que hay lesión (Figura 30). La localización de la expresión es similar a la descrita en el grupo control. Los animales del grupo simulado prácticamente no presentan células que expresen caspasa 3 activada (Figura 31).

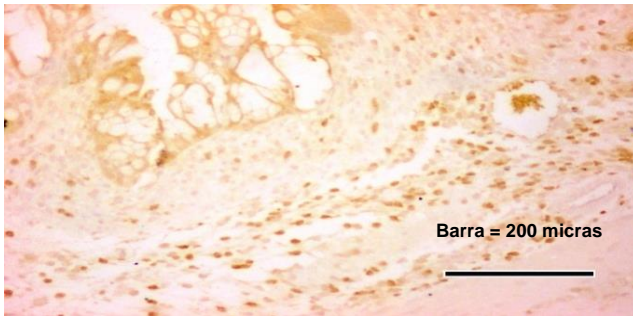


Figura 29: Grupo Control



Figura 30: Grupo Tratamiento

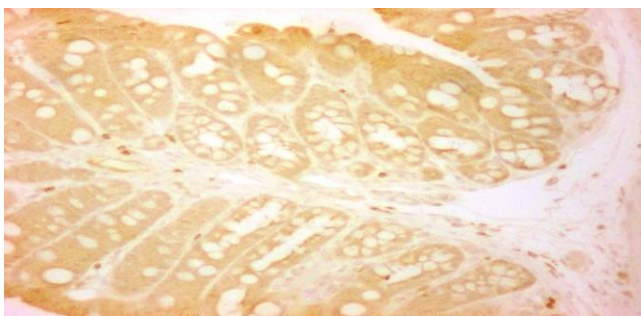


Figura 31: Grupo Simulado

Figuras 29,30 y 31. Imágenes representativas de secciones de colon con marcador inmunohistoquímico Caspasa 3 en los tres grupos estudiados.

Al realizar la cuantificación del número de células positivas para Caspasa 3, se constata que existe un número significativamente mayor de células positivas en el grupo control que en el grupo tratado con cardiotrofina y mucho más que en el

grupo simulado. Igualmente, el grupo tratado con cardiotrofina presenta un número de células positivas significativamente mayor que el grupo simulado ($p < 0.0001$) (Figura 32)

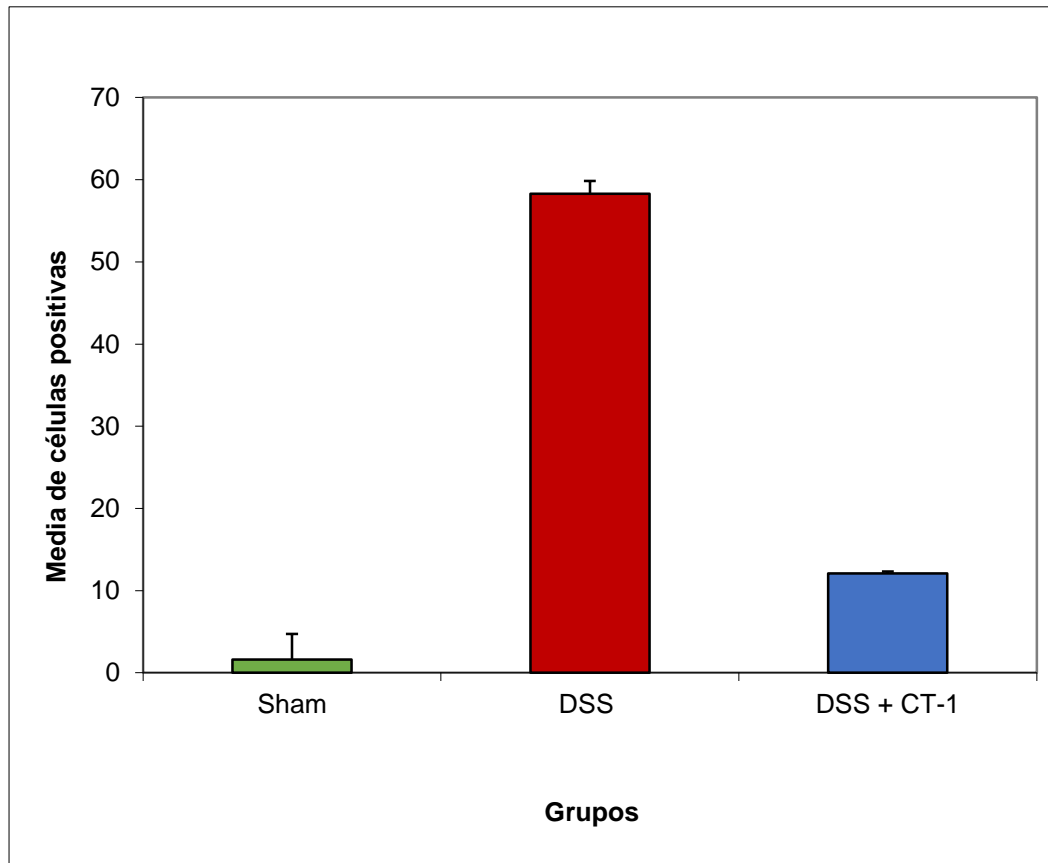


Figura 32: Cuantificación de células positivas para Caspasa 3 por inmunohistoquímica en los tres grupos estudiados

▪ iNOS

Es una enzima inducible que se expresa en macrófagos y en otras células en condiciones de inflamación, y que produce grandes cantidades de óxido nítrico jugando un papel importante en el daño celular por inflamación.

Se observa una expresión abundante de iNOS en el grupo control, fundamentalmente en las zonas ulceradas y en la lámina propia subyacente (Figura 33). La expresión en el tejido del colon sin úlceras es mucho menor. En los animales tratados con cardiotrofina la expresión de iNOS es sensiblemente menor,

incluso en las zonas en las que aún existen úlceras, aunque la distribución es similar a la descrita para el grupo control (Figura 34). Los animales del grupo simulado presentan una pequeña expresión localizada fundamentalmente entre el epitelio (Figura 35).

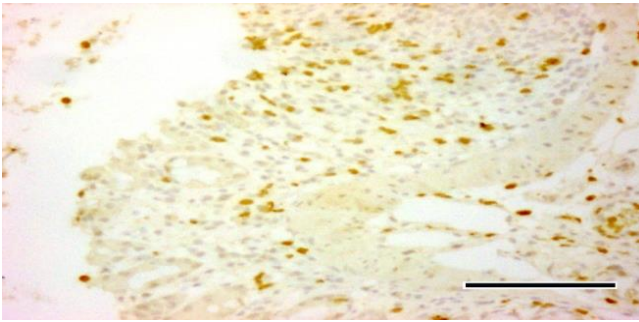


Figura 33: iNOS Grupo Control

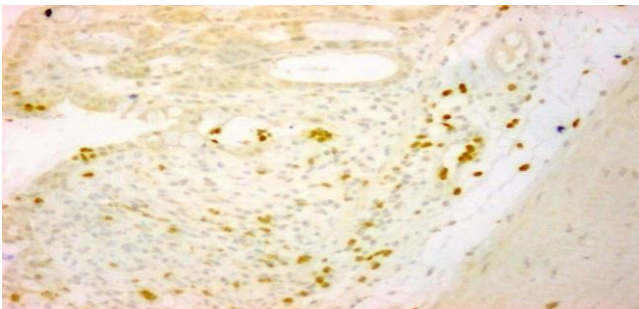


Figura 34: iNOS Grupo Tratamiento

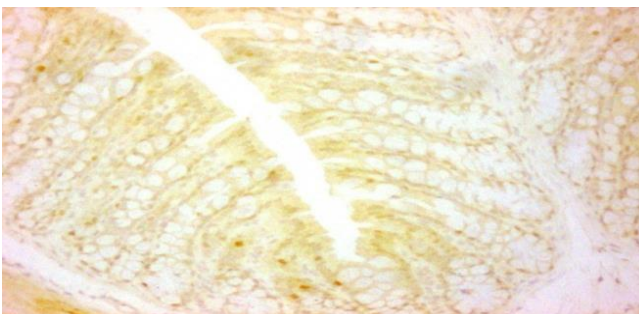


Figura 35: iNOS Grupo Simulado

Figuras 33,34 y 35. . Imágenes representativas de secciones de colon con marcador inmunohistoquímico iNOS en los tres grupos estudiados

La cuantificación de células positivas para iNOS revela un aumento de expresión de la enzima en el grupo control que es significativamente mayor con respecto a los otros dos grupos de estudio ($p < 0.0001$). En el grupo tratado con cardiotrofina la expresión es menor que en el grupo control, con una diferencia al borde la significación (Figura 36).

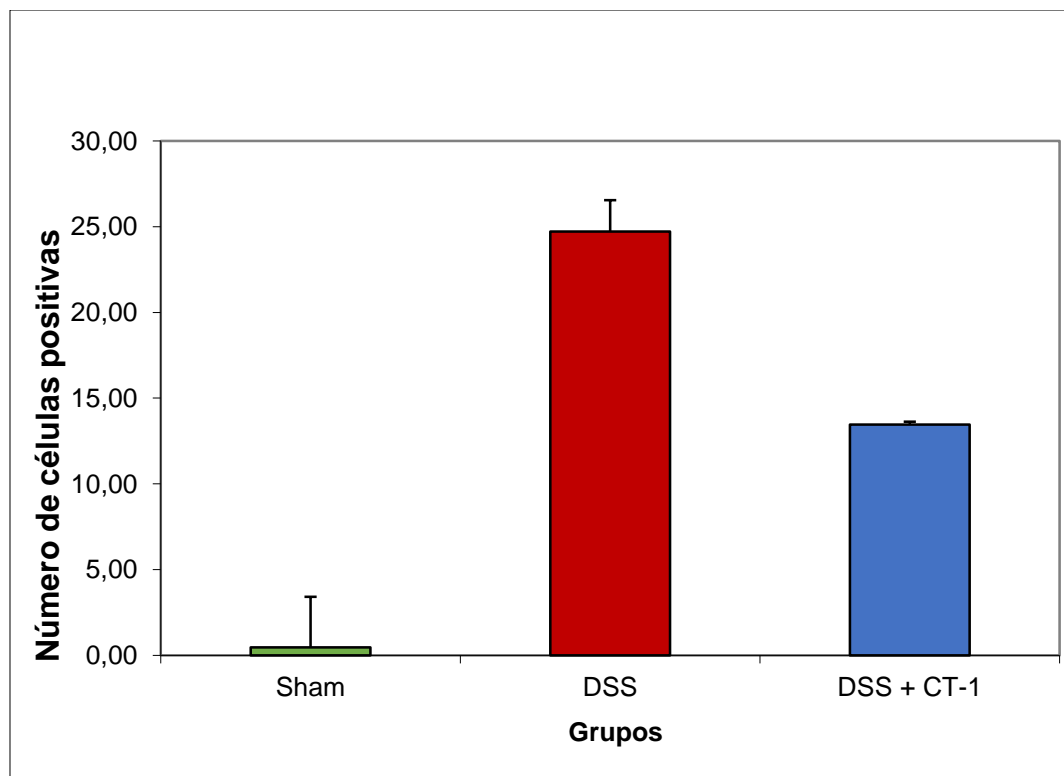


Figura 36: Cuantificación de células positivas para iNOS por inmunohistoquímica en los tres grupos estudiados

4.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Realizamos el estudio para aislamiento de bacterias en mucosa del colon en 5 animales del grupo control, 5 el grupo tratamiento y en los tres animales del grupo simulado con los hallazgos:

- En los ratones del grupo simulado no se aislaron gérmenes
- En el grupo control se apreció crecimiento bacteriano en cuatro de los cinco ratones analizados. Dos de ellos presentaban claros signos de traslocación bacteriana con aislamiento de *Enterobacter cloacae*, *E. coli* y *E. faecalis* en ganglio, *E. cloacae*, *E.coli* y *E. faecalis* y *Lactobacillus sp.* en pulmón y *E.Coli* en bazo.
- En los animales del grupo tratamiento no se aislaron gérmenes en tres de los cinco ratones estudiados. Además uno de los dos restantes presentaba datos de contaminación bacteriana, bien durante el proceso quirúrgico o en la manipulación de las muestras

Por tanto, en el grupo control se aislaron gérmenes en cuatro de los cinco animales analizados presentando dos de ellos claros signos de infección por enterobacterias oportunistas, mientras que las muestras fueron negativas en todos los animales del grupo simulado y en cuatro de los cinco ratones tratados con cardiotrofina.

4.4 ESTUDIO CITOQUINAS

✓ TNF- α

Estudiamos los niveles séricos de esta citoquina mediante Elisa y la expresión de la misma en tejido cónico por PCR

La inducción de colitis mediante la administración de DSS provoca una elevación altamente significativa de los niveles de esta citocina en sangre con respecto al grupo simulado, mientras que los valores de TNF- α en el grupo CT-1 son inferiores a los del control. (Figura 37).

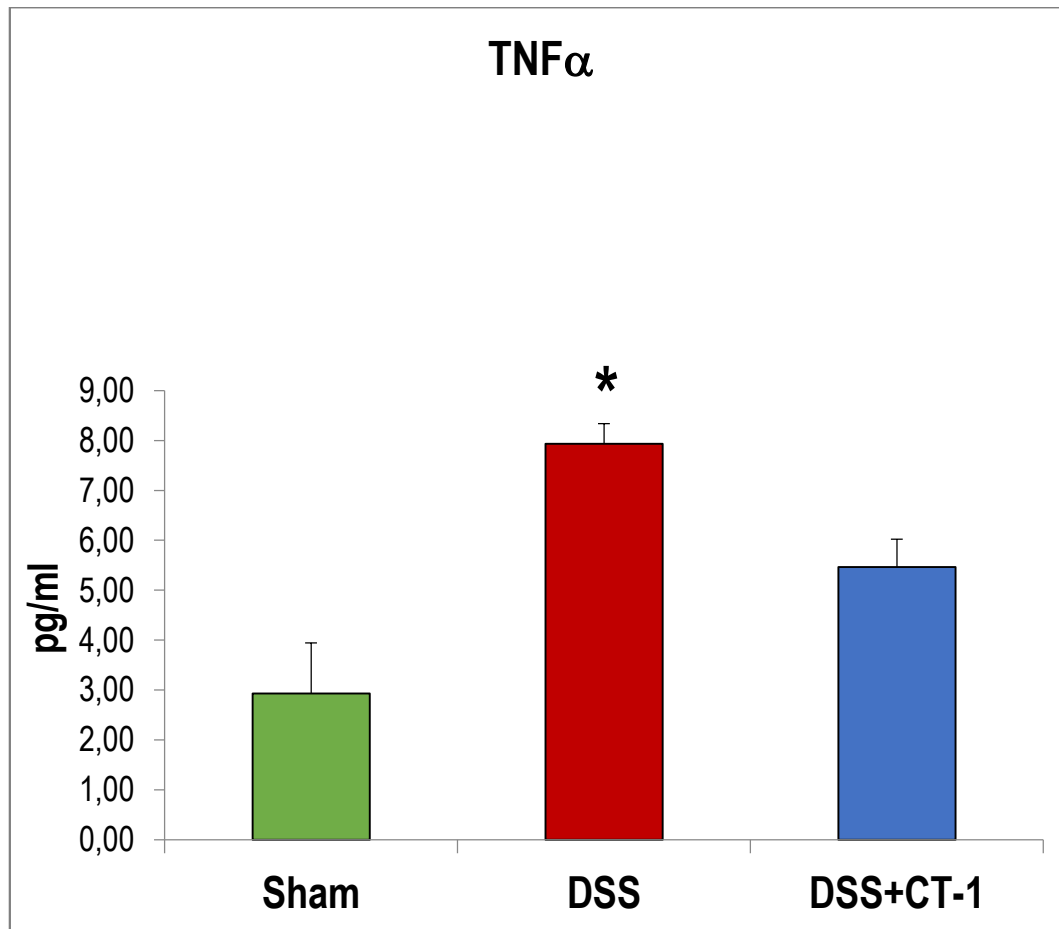


Figura 37.- Niveles séricos de TNF- α (pg/ml) por Elisa a los 7 días de inducción de colitis.

* Z>1.96 vs Sham

Al igual que ocurría con los niveles séricos, la expresión en colon de TNF- α es significativamente mayor en el grupo control y tratamiento con respecto al grupo simulado, mientras que los valores de TNF- α en el grupo CT-1 son inferiores a los del control (Figura 38)

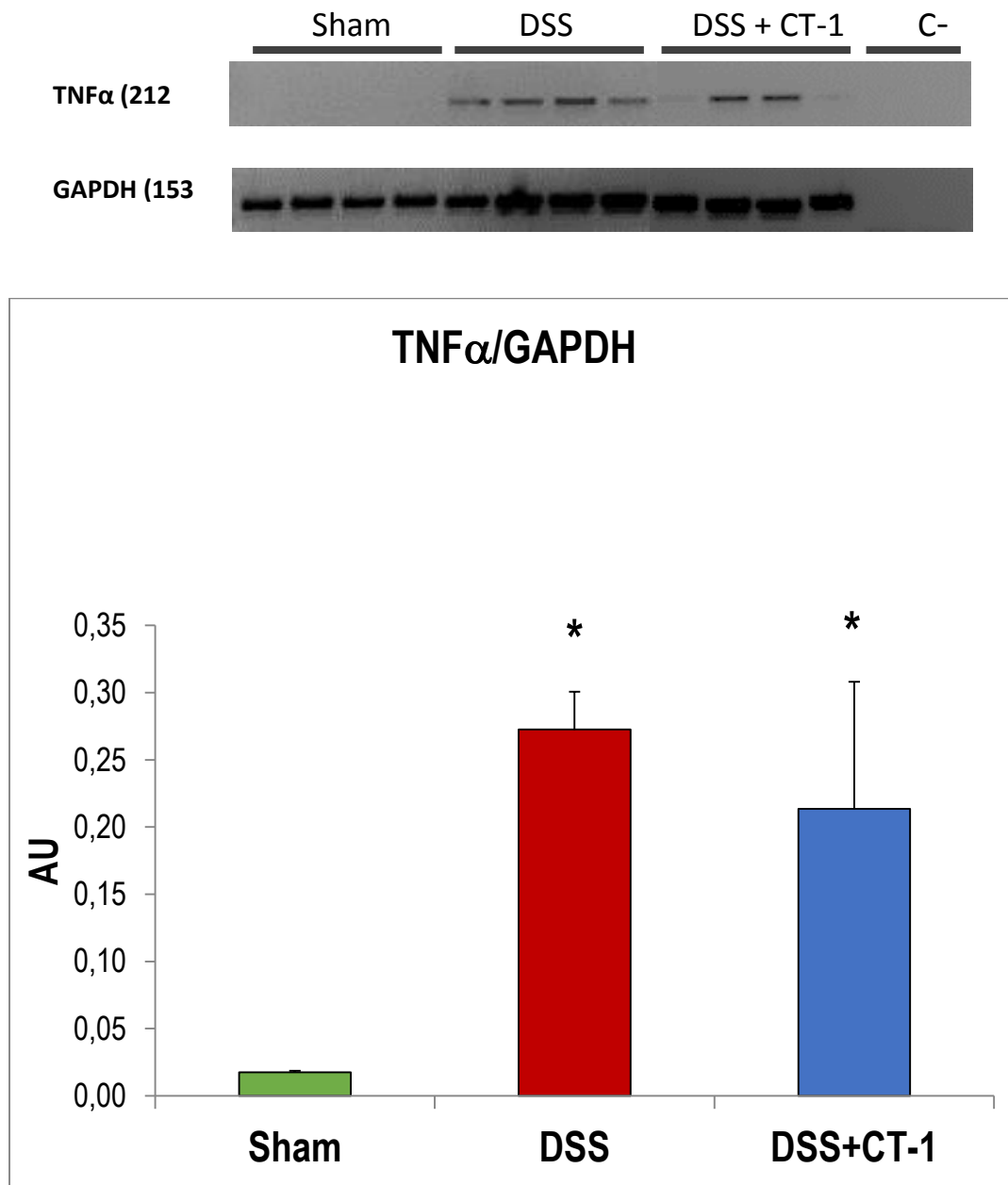


Figura 38.- Expresión génica de TNF- α por PCR a los 7 días de inducción de colitis.

* p<0,05 vs Sham

✓ **INF γ**

La expresión génica del INF- γ en tejido colónico era significativamente mayor en el grupo control que en el grupo simulado, mientras que su expresión en el grupo CT-1 era inferior a la del grupo control aunque sin alcanzar significación estadística. (Figura 39).

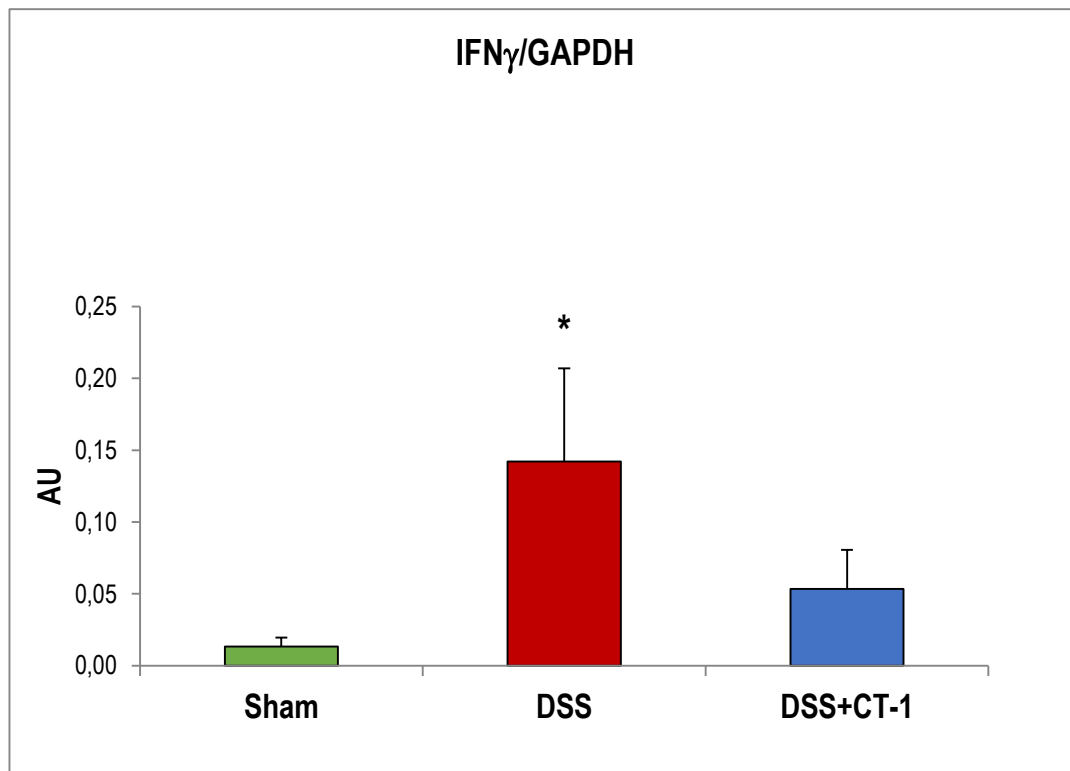
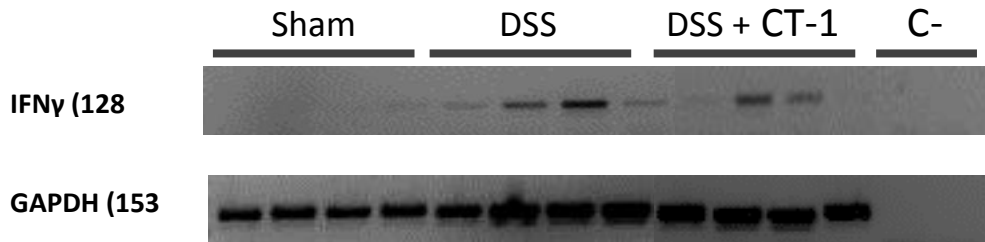


Figura 39. - Expresión colónica de INF γ por PCR a los 7 días de inducción de colitis

* $p < 0,05$ vs Sham

✓ **IL17**

La expresión génica de IL 17 en tejido colónico era significativamente mayor en el grupo control que en el grupo simulado, mientras que su expresión en el grupo CT-1 era inferior a la del grupo control. Pero al igual que ocurría con el INF- γ , las diferencias entre el grupo control y tratamiento no alcanzan la significación estadística, debido probablemente al pequeño tamaño muestral.(Figura 40).

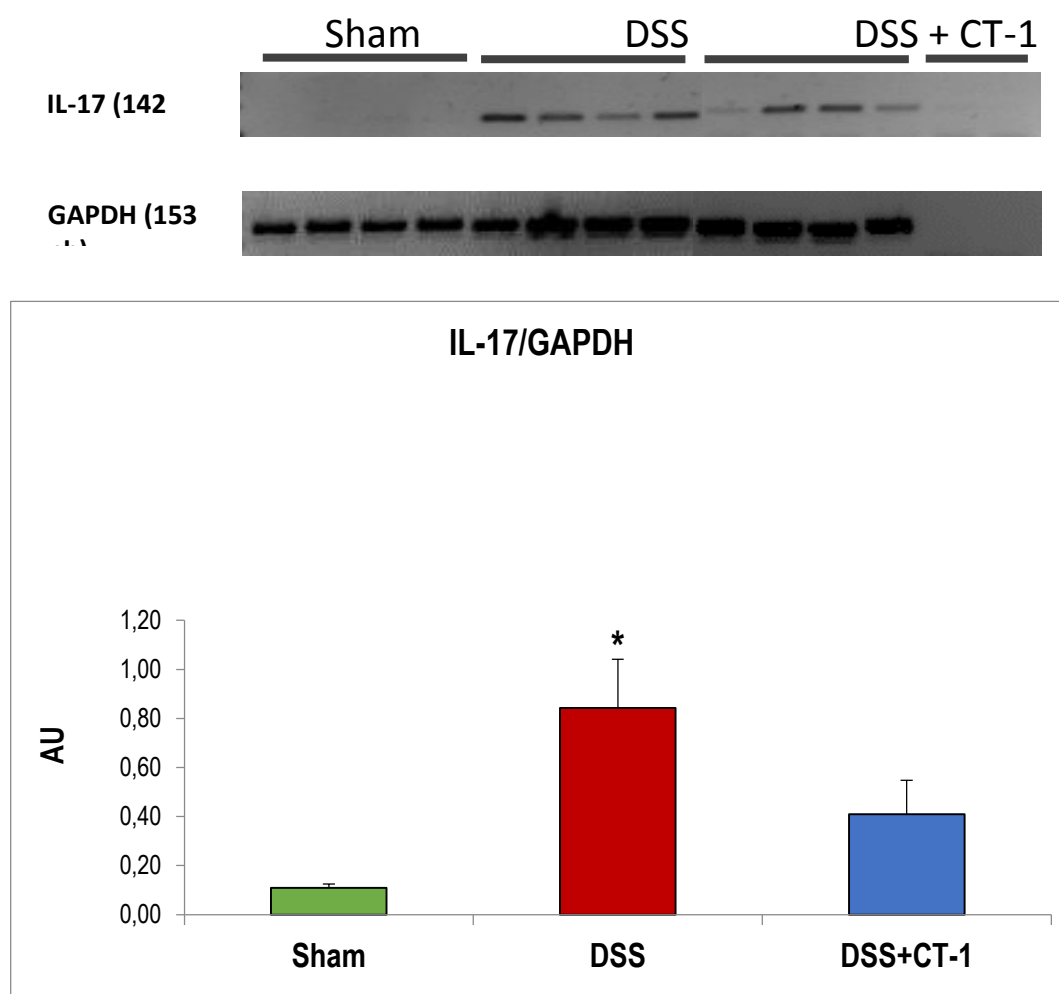


Figura 40.- Expresión génica de IL 17 por PCR a los 7 días de inducción de colitis.

* $p < 0,05$ vs Sham

✓ **IL10**

La IL-10 no se comporta de forma similar a las demás citoquinas estudiadas. La expresión génica de IL-10 fue significativamente mayor en el grupo control y en el grupo tratamiento con respecto al grupo simulado, alcanzando la expresión más alta en los animales tratados con CT-1 (Figura 41).

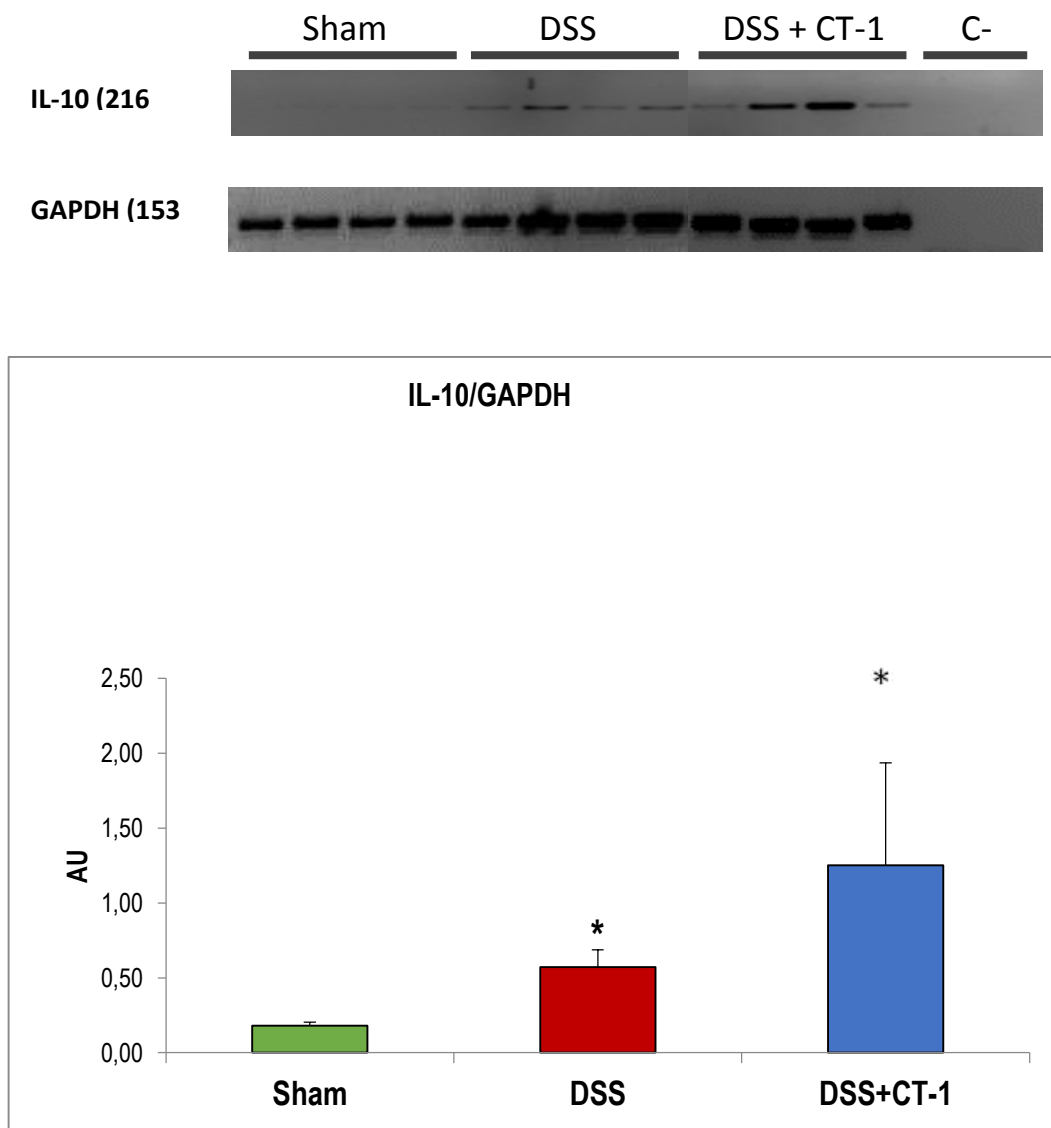


Figura 41.- Expresión génica de IL 10 por PCR a los 7 días de inducción de colitis.

* $p < 0,05$ vs Sham

✓ **IL6**

La expresión génica de IL-6 en tejido colónico era menor en el grupo control que en el grupo simulado. En los animales que recibieron CT-1, la expresión de IL-6 fue mayor que en el grupo simulado y que en el grupo control aunque sin diferencias estadísticamente significativas. (Figura 42).

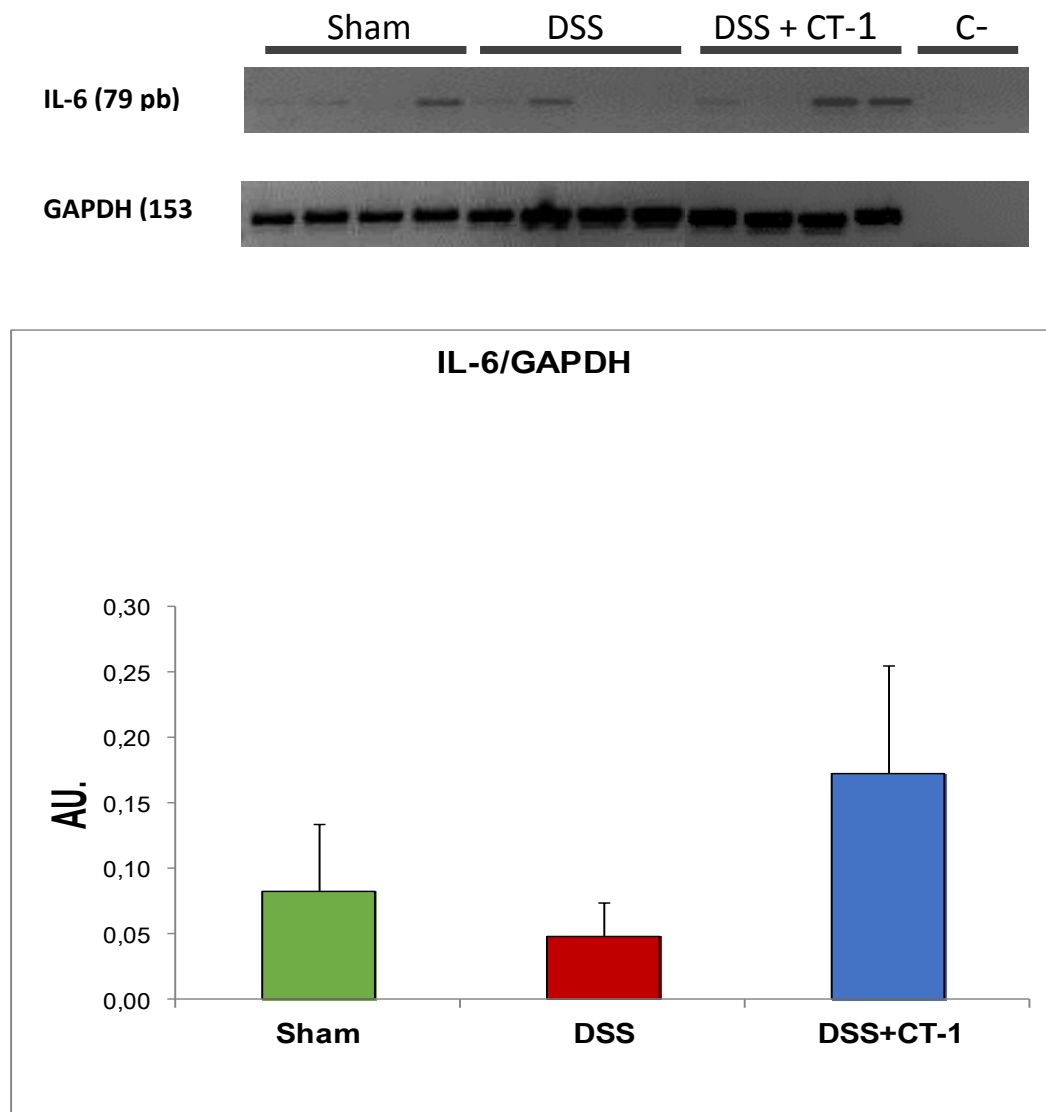


Figura 42.- Expresión génica de IL 6 por PCR a los 7 días de inducción de colitis.

4.5 ESTUDIO MARCADORES INFLAMACIÓN

✓ ACTIVACIÓN NF-κB

La activación del factor de transcripción nuclear NF-κB se hizo mediante el estudio de la fosforilación de Rel A (p65) en la Ser536.

Cuando se estudió la fosforilación de NF-κB p65 evaluada a los siete días de inducción de la colitis, observamos un aumento de la cantidad de p- NF-κB p65 en el colon de los ratones que recibieron DSS y DSS más CT-1 en comparación con el colon del grupo simulado con diferencias estadísticamente significativas. La cantidad de p-NF-κB p65 total era mayor en los animales que recibían CT-1 que en los que no la recibían (Figura 43).

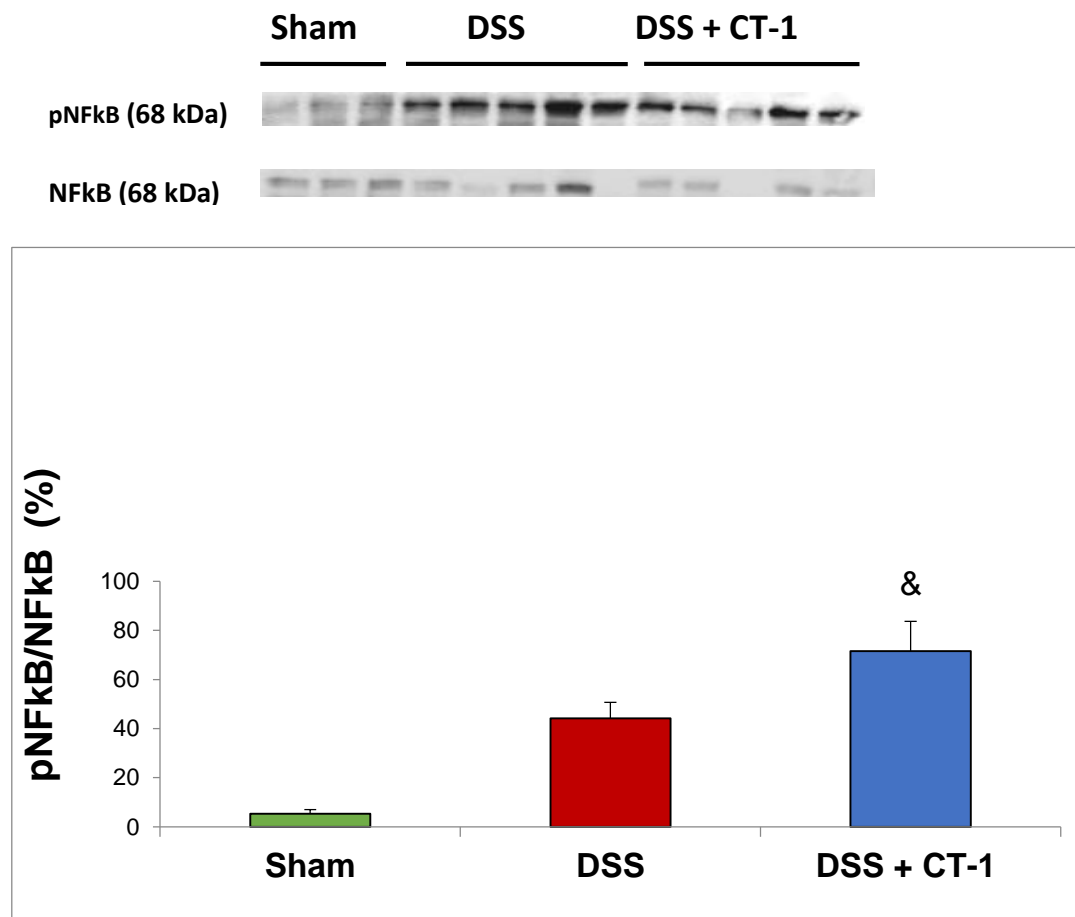


Figura 43. Western blot representativo de pNFκB y NFκB. Cuantificación del cociente pNFκB/pNFκB.

& p < 0.05, vs grupo Sham.

✓ **iNOS**

La cantidad de iNOS era mayor en el colon del grupo control que en del grupo simulado, y estas diferencias fueron estadísticamente significativa. Cuando se añadió CT-1 en el grupo tratamiento, la cantidad de iNOS era menor que en ausencia de CT-1, aunque significativamente mayor que en el grupo control. (Figura 44).

Los resultados de inmunohistoquímica apoyan los resultados del western blot, ya que se observa una expresión abundante de iNOS en el grupo tratado con DSS. Como ya comentamos, la expresión de iNOS es sensiblemente menor en el grupo tratado con cardiotrofina, incluso en las zonas en las que aún existen úlceras mientras que en grupo simulado la expresión de iNOS es mucho menor.

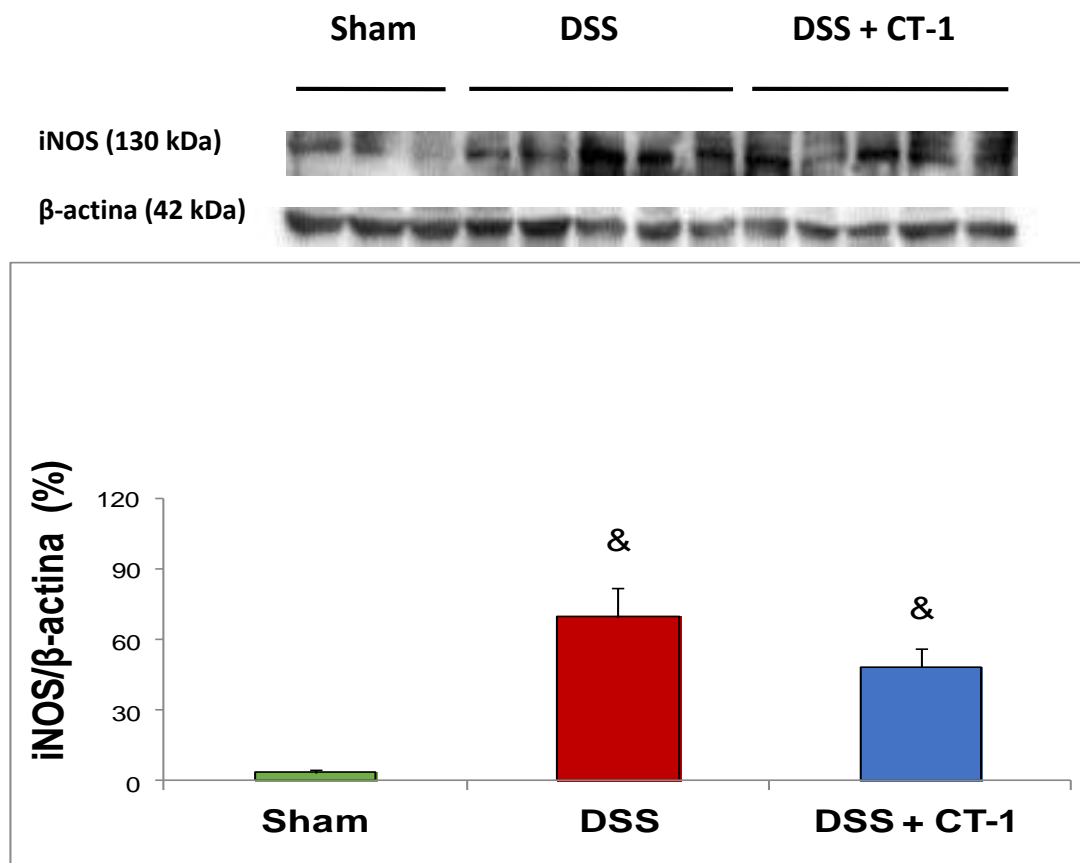


Figura 44.- A: Western blot representativo de iNOS y β-actina. Cuantificación del cociente iNOS/β-actina.

& p < 0.05, vs grupo Sham

✓ ACTIVACIÓN STAT3

La activación de la factor de la vía de señalización JAK/STAT de la CT-1 se estudió mediante la fosforilación de las STATs. Como se comentó en la introducción, en ausencia de esta fosforilación las STATs se encuentran transcripcionalmente inactivas.

Cuando se estudió la fosforilación de las STATs evaluada a los siete días de inducción de la colitis, observamos un aumento significativo de la cantidad de p-STAT3 en el colon de los ratones que recibieron DSS y DSS más CT-1 en comparación con el colon del grupo simulado. La cantidad de p-STAT3 total era s mayor en los animales que recibían CT-1 que en los que no la recibían (Figura 45).

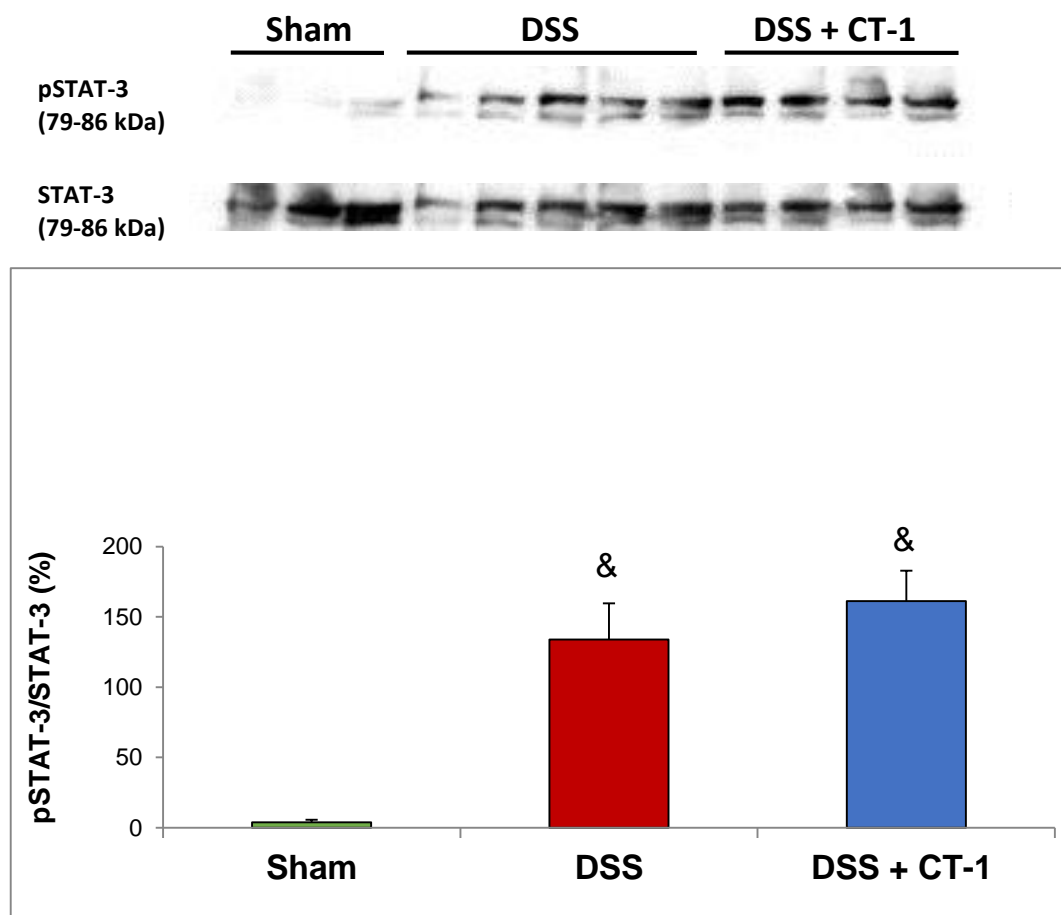


Figura 45.- A: Western blot representativo de pSTAT3 y STAT3. Cuantificación del cociente pSTAT3/STAT3

& $p < 0.05$, vs grupo Sham

4.6 ESTUDIO EXPRESIÓN CT-1

Estudiamos los niveles séricos de CT-1 mediante Elisa, la cantidad en colon por WB y la expresión de CT-1 en tejido colónico por PCR

A los siete días de la administración de DSS, el grupo tratamiento presentaba niveles séricos de CT-1 significativamente mayores que el grupo simulado y significativamente mayores que el grupo control (Figura 46).

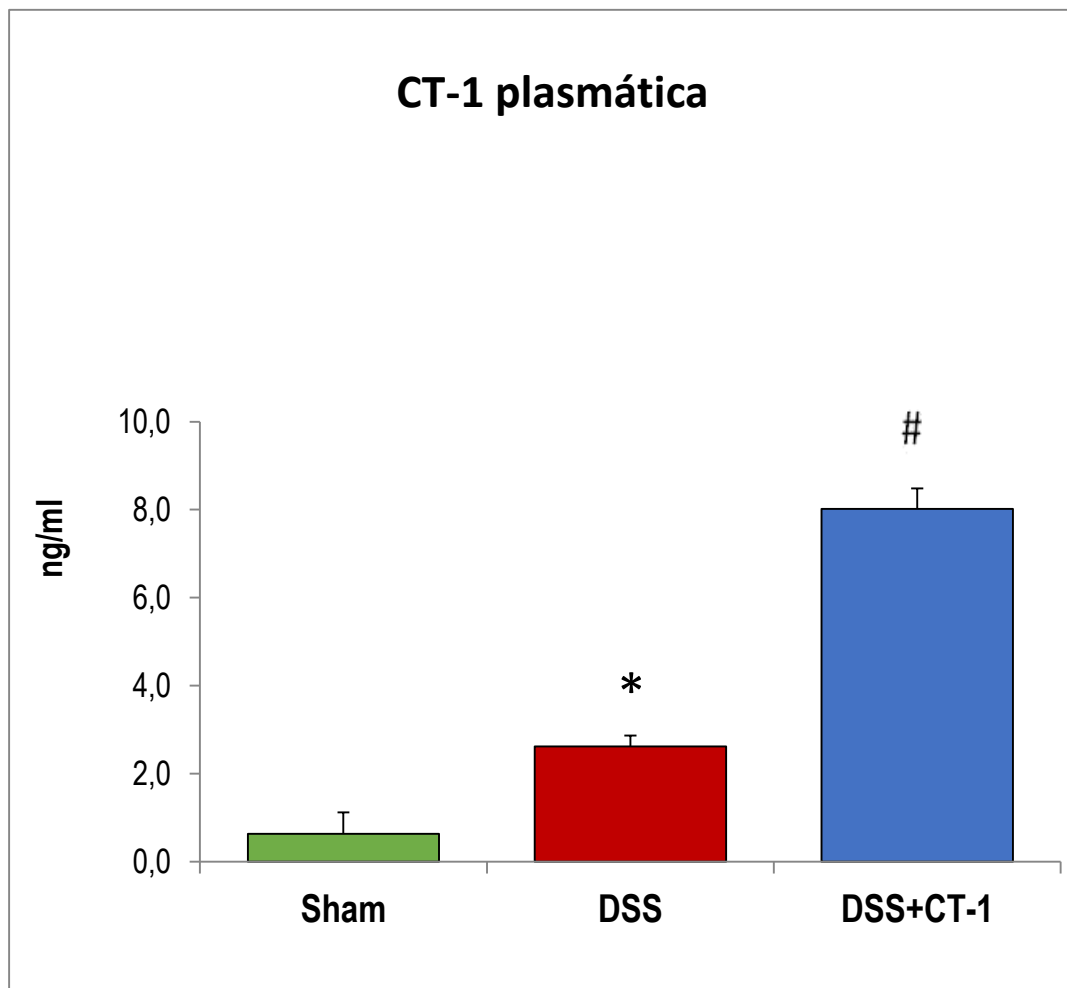


Figura 46.- Niveles séricos de CT-1 (ng/ml) por Elisa a los 7 días de inducción colitis

* $p < 0,05$ vs Sham

$p < 0,05$ vs Control

El estudio de la cantidad tisular de CT-1 demostró que, como era de esperar, en el grupo que habían recibido la CT-1, había cantidades muy grandes de esta citoquina en relación con los animales que no habían recibido CT-1 (Grupos control y simulado). No había diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratamiento (Figura 47).

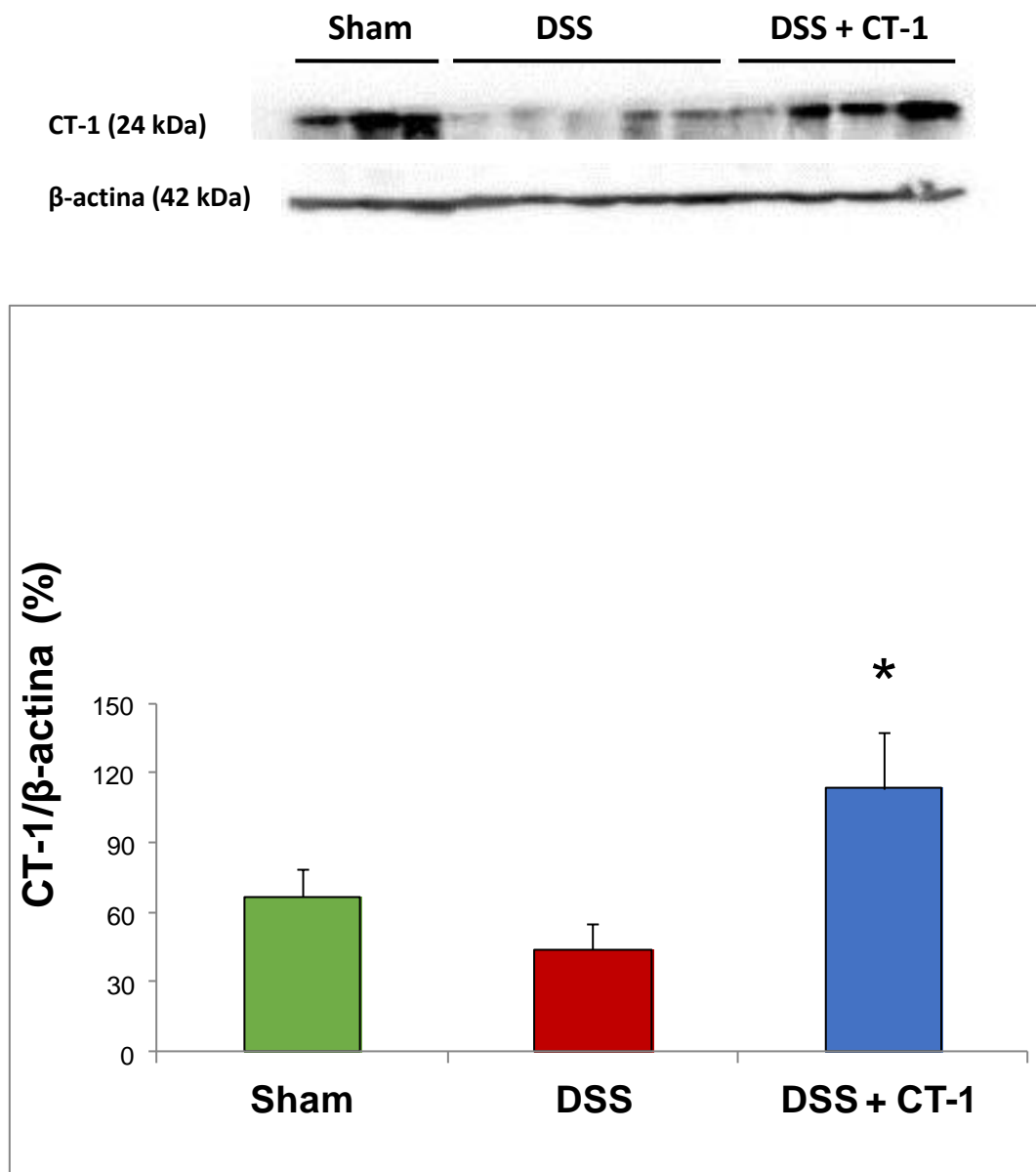


Figura 47.- Western blot representativo de CT-1 y β -actina. Cuantificación del cociente CT-1/ β -actina.

* $p < 0.05$, vs grupo Sham.

La expresión génica de CT-1 fue significativamente mayor en los ratones tratados que en grupo simulado e igualmente mayor que el grupo control (Figura 48).

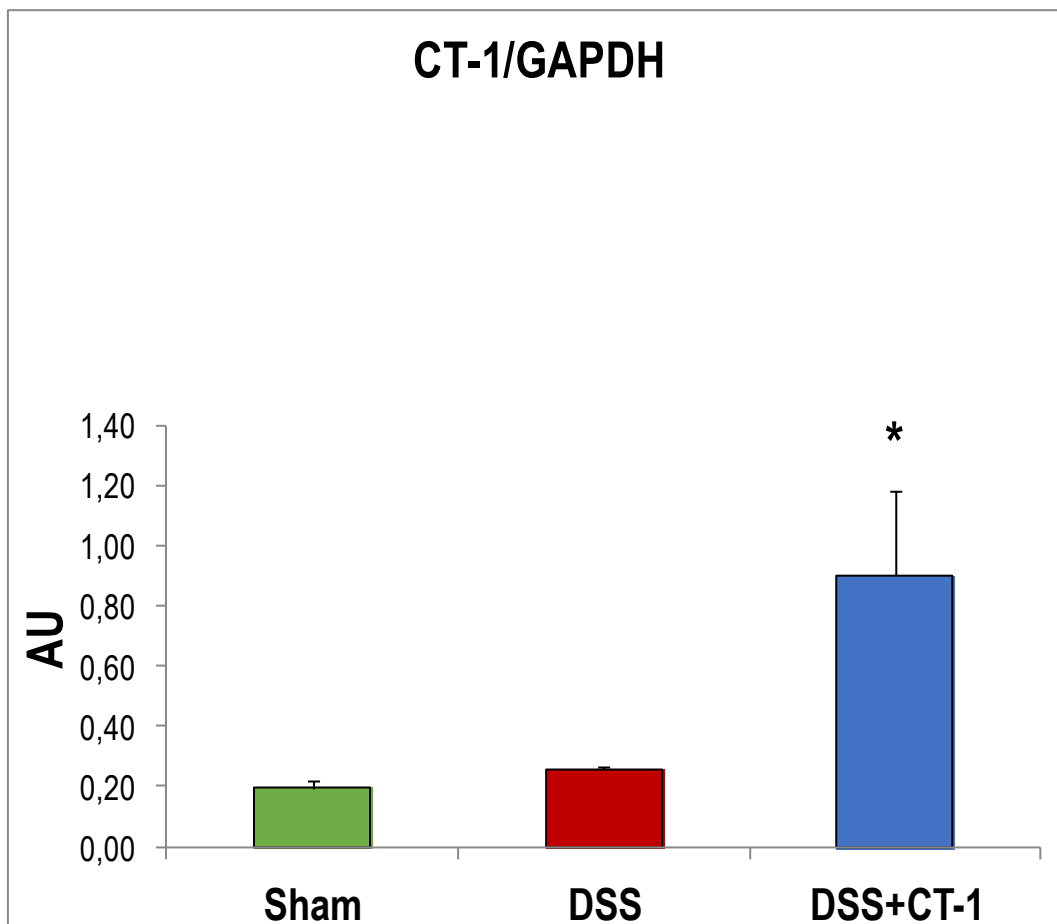
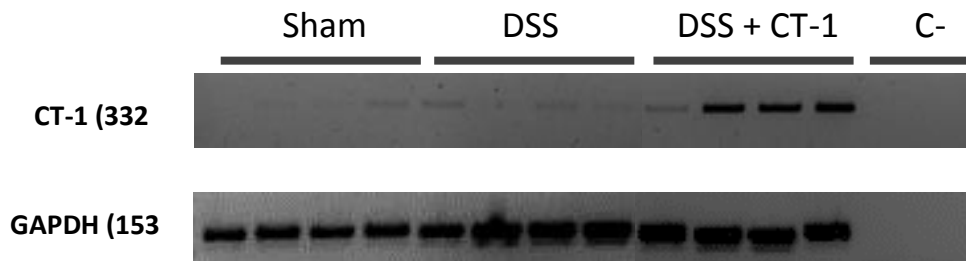


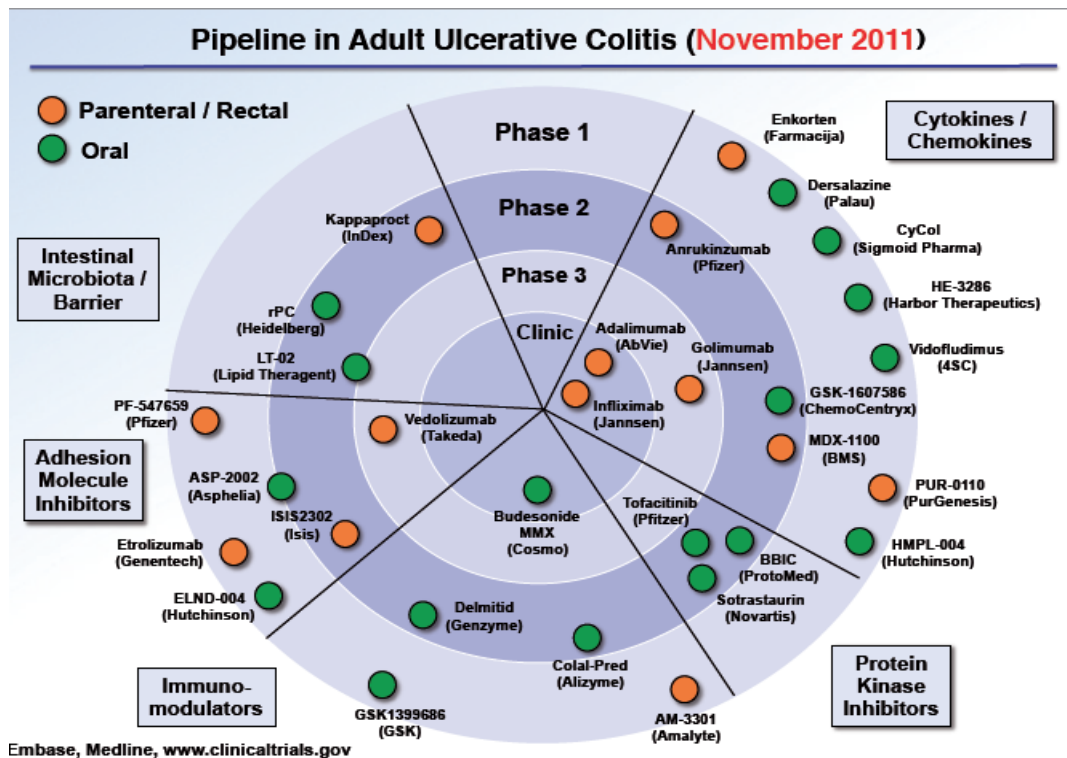
Figura 48.- Expresión génica de CT-1 por PCR a los 7 días de inducción colitis.

* $Z > 1,96$ vs. Sham

Discusión

En el momento actual no hay tratamientos farmacológicos ni quirúrgicos curativos para la EII, y hasta un 20 % de pacientes con brote grave de colitis ulcerosa son sometidos a colectomía por fracaso de los medicamentos disponibles. Ya que la característica principal en la EII es la inflamación, son necesarias nuevas terapias que limiten y controlen el alcance de dicho proceso inflamatorio.

Como se muestra en la figura, el número de moléculas nuevas aprobadas y en investigación en diferentes fases va aumentando (Figura 49)



La llegada de los biosimilares es, sin ningún tipo de duda la principal novedad en el tratamiento de la EII en el último año. Los biosimilares son nuevos fármacos que imitan, tanto como es posible con la tecnología actual, a los fármacos biológicos. En septiembre de 2013, la Unión Europea autorizó el uso de CP-P13, un fármaco biosimilar de Infliximab.

En la CU podemos distinguir entre el tratamiento del brote y el tratamiento de mantenimiento de la inactividad. Es un punto clave disponer de fármacos que actúen con rapidez y eficacia para frenar el brote como es el caso de los corticoides y los anti-TNF-alfa o los reguladores de las moléculas de adhesión, ya en el mercado. A pesar de la utilización de los mismos, en muchas ocasiones no podemos evitar la cirugía y varios de ellos no son de rápida acción (Vedolizumab). El control de la inflamación puede llevarse a cabo a través de diferentes rutas de señalización, incluidas aquellas que dependen de NF- κ B y de citoquinas. Uno de los principales moduladores de NF- κ B es la CT-1, molécula que, aunque no puede ser utilizada durante periodos prolongados por sus efectos secundarios, se caracteriza por su rapidez de acción. Dadas estas propiedades, demostradas en otros procesos, pensamos que su administración podría tener un efecto regulador de la respuesta inflamatoria por esta vía.

Para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados, tanto como para el análisis de las posibles alternativas terapéuticas, se han desarrollado diversos modelos experimentales animales de EII. De entre ellos, la administración oral de sulfato de dextrano (DSS) en ratones ha sido aceptada como un modelo adecuado para la traslación a la EII humana y para la identificación de nuevas terapias. El DSS administrado oralmente altera la barrera epitelial causando síntomas clínicos agudos (diarrea y hemorragias intestinales), pérdida de peso, acortamiento del colon, erosión y pérdida de las criptas y la consiguiente inflamación, características que se observan en la CU, ya que la permeabilidad aumentada permite la interacción masiva de la flora intestinal con el sistema inmunológico del huésped, un factor básico en la iniciación de la EII. Además, este modelo tiene muchas ventajas con respecto a otros, como son la simplicidad de su inducción, la reproducibilidad de los síntomas entre diferentes animales y la uniformidad de las lesiones histológicas inducidas.

En nuestro modelo, la elección del peso molecular y la concentración de DSS, se realizó según los datos de la bibliografía existente y tras los resultados

clínicos e histológicos que validamos en un estudio previo. Empleamos DSS a diferentes concentraciones y observamos que la concentración de DSS al 5% era la que más se ajustaba a lo que buscábamos para nuestro estudio en cuanto a desarrollo de síntomas y lesiones histológicas. Fijamos un periodo de 7 días de administración de DSS hasta el sacrificio de los animales de acuerdo con datos de la literatura. Aparecieron los síntomas al tercer-cuarto día de la ingesta de DSS. Algunos estudios prolongan la administración de DSS para el desarrollo de colitis en fase aguda a 2 semanas, pero en nuestro caso, a la concentración elegida, la clínica de los animales impedía prolongar la observación por alto riesgo de muerte en el grupo no tratado. No hemos elegido otras concentraciones ni observar a los ratones durante más tiempo tras retirar DSS por no ser de nuestro interés en esta fase el estudio de formas crónicas; queríamos comprobar si CT-1 jugaba algún papel en el proceso inflamatorio agudo compatible con CU y si su aporte frenaba el proceso. Como ya hemos indicado previamente CT-1 parece una molécula inapropiada para administración crónica por sus efectos secundarios; en una fase posterior tendremos que comprobar si una vez conseguido el control de la fase aguda de la enfermedad con CT-1, la inactividad puede mantenerse con otros fármacos evitando la necesidad de colectomía.

Se ha estudiado detalladamente el papel y el efecto de la CT-1 tras un daño en numerosos órganos, como hígado(119), corazón(103), pulmón(114) o riñón(93) y sabemos que tiene efectos antiinflamatorios por los estudios previos realizados.(97). Pero no se ha estudiado CT-1 en el colon hasta la fecha y mucho menos se ha estudiado su papel en la EII.

El modelo experimental que se ha desarrollado en el presente trabajo utilizando CT-1 como tratamiento, surgió a raíz de los resultados obtenidos en un modelo previo de prevención con ratones, en el que los signos clínicos y las variables moleculares de inflamación mejoraban en aquellos que recibieron CT-1 antes de la inducción de colitis mediante la administración de DSS. Los resultados de la acción de la CT-1 en dicho modelo preventivo abrieron el camino para su

estudio en este modelo curativo para su utilización en las fases de brote de la colitis ulcerosa y su uso puede suponer un nuevo campo terapéutico.

La administración de CT-1 se inició al cuarto día de seguimiento, cuando todos los ratones (n: 20), presentaban sangre en las heces y deposiciones al menos blandas. Utilizamos 3 ratones como grupo simulado, sin DSS ni CT-1, de iguales característica en cuanto a raza, camada, medio, etc. Elegimos este momento para iniciar la administración de CT-1 por haber detectado en ensayos previos que al cuarto día la enfermedad era clínicamente grave en los ratones en ensayos previos. Al cuarto día de seguimiento, los 20 ratones ya sintomáticos, se aleatorizaron (según los criterios clínicos de gravedad) en dos grupos, el grupo tratamiento, que continuó recibiendo DSS en el agua de bebida y al que se le administraron tres dosis de CT-1 los días cuarto, quinto y sexto, y el grupo control que también continuó recibiendo DSS pero al que no administramos CT-1.

La revisión bibliográfica sobre la CT-1 y la experiencia previa en diferentes modelos experimentales de respuesta inflamatoria nos hicieron decidir la dosis y el momento de administración respectivamente.

Hemos demostrado en este estudio que mediante la administración CT-1 se consigue mejorar significativamente la gravedad de los síntomas clínicos en ratones con colitis inducida por DSS. Así, de los 10 ratones del grupo control, al séptimo día de seguimiento, 9 mostraban signos de enfermedad grave con deposiciones líquidas y presencia de sangre en las heces de todos ellos y con gran deterioro del estado general. En cambio, de los 10 ratones del grupo a los que se le administró CT-1, 8 no presentaban datos clínicos de colitis y sólo 2 de los 10 presentaban síntomas de colitis leve al final del periodo, con discretos cambios en la consistencia de las heces, que pasaron a ser blandas y con escasa cantidad de sangre. En cambio, 9 ratones del grupo control, al séptimo día de seguimiento, mostraban enfermedad grave con deposiciones líquidas y presencia de sangre en las heces en todos ellos y con gran deterioro del estado general. Al realizar el

estudio estadístico de la variable consistencia de las heces, se observó que las diferencias entre los grupos se hacían mayores según pasaban los días, de manera que en los tres primeros días no había diferencias significativas entre los tres grupos. Sin embargo, los últimos días de seguimiento (días 6 y 7), se detectaron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$). Lo mismo ocurría al realizar el análisis estadístico de la variable sangre en las heces, encontrábamos diferencias significativas ($p < 0.0001$) el último día de seguimiento entre los ratones del grupo tratamiento y los del grupo control con respecto a los tres primeros días.

Con estos resultados demostramos que la administración a esta dosis de CT-1 controla los síntomas provocados por el DSS.

Los datos clínicos concuerdan con los hallazgos histológicos que demuestran que en comparación con los animales que no reciben CT-1, la administración terapéutica intravenosa de CT-1 reduce el infiltrado inflamatorio en la mucosa del colon y disminuye de forma muy notable el número y la extensión de úlceras intestinales de los animales tratados, cuyas alteraciones estructurales eran relativamente leves.

Esta espectacular respuesta clínica e histológica a la administración de CT-1 en ratones con colitis por DSS queda comprobada mediante el estudio inmunohistoquímico. En las preparaciones existía un número significativamente menor de macrófagos en los ratones tratados con CT-1 en comparación con la abundante cantidad de estas células en las zonas ulceradas del grupo control. Como ya comentamos previamente, los macrófagos son células que forman parte del sistema inmune innato. La CU se caracteriza por una pronunciada infiltración de estas células en la mucosa intestinal. Una forma de evaluar la menor actividad inflamatoria tras la administración de CT-1 era constatando la disminución de la expresión de macrófagos en el tejido intestinal estudiado. Del mismo modo, se evidenció una menor expresión de células que expresan iNOs en el epitelio colónico de los ratones del grupo tratamiento. Este dato inmunohistoquímico fue

ratificado mediante western blot; corroboramos que el DSS aumenta la expresión de iNOS, mientras que la administración con intención curativa de CT-1 hace que ese aumento de la expresión de iNOS sea mucho menor. La elevada producción de NO por la iNOS estimulada durante la inflamación contribuye al daño local del tejido que ocurre en otros procesos inflamatorios (139). Otros autores ya habían descrito que la administración de CT-1 disminuía los mediadores de la respuesta inflamatoria y entre ellos la iNOS,(91) lo que apoya también nuestras observaciones. También hay que tener en cuenta que los niveles de TNF- α son más bajos en los animales tratados, y TNF- α provoca la activación de iNOS que a su vez aumenta la producción de NO.

Es la primera vez que se describe este efecto antiinflamatorio de CT-1 en el epitelio colónico.

En los animales, DSS induce un aumento de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IFN- γ e IL-17. En nuestros ratones que posteriormente recibieron CT-1, los niveles plasmáticos de TNF- α , IFN- γ e IL-17 eran, aunque elevados, menores que en los que no reciben CT-1.

Benigni et al han demostrado que la administración de CT-1 a ratones que han recibido lipopolisacárido (LPS) reduce los niveles de TNF- α tanto en suero, como en corazón, y sugieren que CT-1 podría ser un inhibidor endógeno de la producción de TNF- α (140).

En relación con el mecanismo que puede explicar este efecto, se ha descrito que la CT-1 administrada exógenamente induce la sobreactivación del receptor gp130 lo que conlleva un incremento en la fosforilación de STAT-3 y STAT-1 en el riñón que posteriormente va a incrementar la activación de SOCS-3 y SOCS-1 lo que, a su vez, inhibe las citoquinas proinflamatorias (141),(142). La inyección intravenosa de CT-1 a ratas Wistar inducen en el corazón un aumento rápido de la expresión de mRNA de SOCS-1 (143). Además se ha demostrado que

SOCS-1 tiene un efecto dominante sobre el receptor del INF- γ (IFN- γ R), inhibiendo los efectos proinflamatorios de este.

En este modelo se aprecia además un aumento de citoquinas IL-10 e IL-6 con efecto predominantemente antiinflamatorio (144),(145) en las ratas a las que se administra CT-1.

La IL-10 es producida, entre otros, por macrófagos y células T. Entre sus funciones en la respuesta inflamatoria destacamos la capacidad de activar o inhibir los macrófagos, convirtiéndose, al igual que la IL-6, en otra citoquina moduladora del fenómeno inflamatorio. Ya dijimos que el estudio de familias con colitis congénita desveló la existencia de defectos en la síntesis de IL-10 o en la expresión de su receptor, ambos implicados en la inhibición de la inflamación intestinal (13). Existen dos posibles momentos en los que la producción y reconocimiento de la IL-10 puede prevenir la EII: primero, en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos o patógenos intestinales, segundo en la resolución de las respuestas excesivas a infecciones (14).

De estos datos se puede deducir que la capacidad de controlar la respuesta inflamatoria tras la inducción de colitis con DSS en los grupos tratados con CT-1 puede ser debido, entre otros mecanismos, a sus efectos en el incremento de las citoquinas IL-6 e IL-10 y al decremento de TNF- α , IFN- γ e IL-17, fenómenos vinculados a un efecto antiinflamatorio.

Recientemente se ha publicado una revisión (146) de las citoquinas dependientes de la vía STAT3, éstas son la IL-6, IL-11 e IL-22. Estas citoquinas se encuentran elevadas en pacientes con EII y en los correspondientes modelos de ratón y, a través de la activación de la vía JAK/ STAT3, pueden tanto agravar como mejorar la enfermedad. En particular, la activación de citoquinas como la IL-6 y la IL-10, mediada por STAT3 en las células de revestimiento epitelial permite la protección celular, la supervivencia y la proliferación, proporcionando así oportunidades terapéuticas para la prevención y el tratamiento de colitis. Además

la pérdida de la expresión de IL-6 se asocia con un aumento de los daños en el epitelio y la inflamación inducida por DSS en modelos de colitis.(147),(148). Estudios recientes demuestran que en la Colitis Ulcerosa, las células mononucleares de la lámina propia y las (149),(150),(151). Los niveles de STAT3 activada también fueron significativamente más altos en las células epiteliales intestinales de pacientes con CU activa en comparación con los pacientes con enfermedad inactiva o controles sanos, y estos niveles se correlacionaban con la gravedad de la colitis (151). STAT3 está clásicamente asociada con la mediación celular de supervivencia de las células epiteliales intestinales, lo que sugiere que la población de células en que STAT3 es constitutivamente activa puede dictar la patología de la EII. En ensayos que utilizan modelos de ratón se detecta que la activación epitelial STAT3 es esencial para el mantenimiento de la integridad de la barrera gastrointestinal, sugiriendo un papel protector para STAT 3 en múltiples subconjuntos de células dentro de la mucosa gastrointestinal (152),(153).

Nuestros resultados apoyan los hallazgos recientemente descritos en la literatura de que los niveles de STAT 3 activada eran mayores en aquellos ratones con colitis inducida en comparación con los ratones del grupo simulado y mayor aún en los ratones que recibieron CT-1.

En los modelos de colitis inducido químicamente, como en nuestro modelo con DSS, la activación de STAT3 por medio de la IL-6 media en la protección celular a través de la expresión de genes de la proliferación, antiapoptóticos y genes citoprotectores (148), de manera que a disminución de la expresión de esta citoquina atenúa la restitución de las células epiteliales y la respuesta general de recuperación a la colitis inducida químicamente.

NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de múltiples genes involucrados en la inflamación, entre ellos genes que codifican citoquinas proinflamatorias como (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , etc), quimiocinas como (IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES, etc), moléculas de adhesión como (ICAM, VCAM, E-selectina),

enzimas inducibles (COX-2 e iNOS), factores de crecimiento y algunas proteínas de fase aguda y receptores inmunológicos, todos ellos implicados en el control de la mayoría de los procesos inflamatorios(154),(155),(23).Se ha demostrado que CT-1 activa NF- κ B en células endoteliales y monocitos, inhibiendo los genes que codifican proteínas inflamatorias con lo que disminuyan los niveles de las mismas al administra CT-1.

Para verificar en nuestro estudio la activación de NF- κ B se analizaron los cambios en los niveles de p65 fosforilado, ya que la fosforilación de la subunidad p65 está asociada con la activación de la vía NF- κ B (20). Nuestros resultados demuestran que NF- κ B está más activada en el colon tras inducir la colitis y más aún en los animales que recibieron CT-1. El efecto de CT-1 sobre la activación de NF- κ B es variable según los diferentes trabajos de la literatura. En un modelo de infección por LPS se ha observado que la administración intravenosa de la CT-1, provoca en el corazón una disminución de la expresión de iNOS y de la activación de NF- κ B. en el riñón, la activación de NF- κ B inducida por isquemia/reperfusión disminuye cuando se administra CT-1.

Del mismo modo, nuestros resultados del estudio inmunohistoquímico, muestran una cantidad significativamente menor de células positivas para caspasa-3 activada (una de las principales ejecutoras de la apoptosis) en el grupo tratado con CT-1, con respecto al grupo control. Los efectos antiapoptóticos de la CT-1 se han documentado en diferentes modelos de daño tisular (156),(157).Por ejemplo, la CT-1 protege de la apoptosis provocada por doxorubicina en miocitos cardiacos *in vitro* (82),(158).También se ha demostrado protección contra la apoptosis inducida en células del pulmón. (114).*In vivo*, la CT-1 protege de la apoptosis en el infarto de miocardio, inhibe significativamente P53, Fas y Bax, y se incrementa la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2 (159,160).

La CT-1 también reduce la muerte celular neuronal tanto *in vivo* como *in vitro*. (123). Asimismo se ha demostrado que la CT-1 actúa como una defensa natural del

hígado contra la apoptosis, pudiendo tener un potencial terapéutico importante, ya que la CT-1 protege del fallo hepático fulminante inducido por D-gal, mediante sus efectos como molécula antiapoptótica y favorecedora de la reparación celular (120).

También se ha demostrado que CT-1 induce un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90 (161). Este incremento está relacionado con la protección de muerte celular por estrés isquémico en el pulmón (162).

La CT-1 es una citoquina de la familia de las interleucinas 6 que actúa, como hemos visto en diferentes eslabones de la inflamación y de la apoptosis (multidiana) en el colon de ratones frente a los nuevos fármacos utilizados en EII cuya acción va dirigida fundamentalmente a una diana concreta de este proceso. Ha demostrado poseer ciertas propiedades como promover el crecimiento y la supervivencia celular en numerosos tejidos, incluidos tejidos hepáticos, cardiacos, renales y del sistema nervioso.

Nuestros resultados muestran que en el colon no hay un aumento substancial de las cantidades de CT-1 tras la inducción de la colitis. Estos resultados no son diferentes de los que se han observado en el hígado, en el que se ha visto que la isquemia no induce un aumento de la expresión de CT-1 en tejido, sin embargo sí se observan diferencias en el suero por lo tanto si habría más CT-1 circulante y la CT-1 podría actuar de forma paracrina (119). Con respecto a la cantidad de CT-1 exógena administrada, nuestros resultados demuestran que se capta en grandes cantidades por el colon. Interpretamos este dato como que CT-1 no interviene en el desencadenamiento de la enfermedad pero que su aporte exógeno ejerce un efecto controlador del proceso por sus efectos anti-inflamatorios y antiapoptóticos que hemos citado.

Por último, para comprobar estos resultados, se ha procedido a realizar un estudio en ratones knock-out (K.O.) para CT-1. Al administrar DSS a estos animales

nos encontramos que dos de los 4 ratones knock-out murieron al quinto y sexto día, sin tiempo para realizarles un estudio complementario adecuado. Los datos ponen en evidencia que los animales sin CT-1 endógena desarrollan una forma muy grave de colitis que les lleva a la muerte en un corto periodo de tiempo. Desde el punto de vista histológico, también existía mayor daño estructural, con aparición de úlceras más extensas y de mayor tamaño. La contundencia del dato hace posiblemente improcedente el probar si se hubieran recuperado con aporte exógeno de CT-1, aunque hubiera sido interesante. Estos resultados parecen confirmar la hipótesis anteriormente expresada de que la Ct-1 ejerce un efecto modulador sobre el proceso de daño inflamatorio en colon, al menos en modelo de CU inducido por DSS.

Realizamos estudio microbiológico para analizar la translocación bacteriana. La translocación bacteriana consiste en el paso de bacterias viables desde la propia luz intestinal, sin rotura de la integridad de la mucosa intestinal, a sitios extraintestinales, como los ganglios linfáticos, pulmón o bazo. La consecuencia más previsible de la translocación bacteriana es su contribución al desarrollo de infecciones. Los mecanismos favorecedores de la translocación bacteriana son fundamentalmente las alteraciones en la flora intestinal (sobrecrecimiento bacteriano intestinal), las alteraciones en la barrera intestinal y las alteraciones en los mecanismos de defensa inumunitario. La aparición de translocación bacteriana supone una pérdida de la función de barrera que la pared intestinal ejerce frente a la propia flora de la luz intestinal. En nuestro estudio, la administración oral ad libitum de DSS en los animales del grupo control y tratamiento alteró la barrera epitelial incrementando la permeabilidad intestinal a las bacterias de forma similar a la descrita en los paciente con colitis ulcerosa en las fases de actividad favoreciendo de esta forma la translocación bacteriana. En este ensayo, el número de animales es escaso (5 ratones de cada grupo) y no podemos extraer conclusiones importante es este aspecto. Se detectaron bacterias intestinales en otros órganos en cuatro ratones del grupo control frente

a tan solo en un ratón del grupo tratamiento, en el cual se aislaron bacterias únicamente a nivel de pulmón. Los aislamientos se corresponden con los descritos en la literatura donde las enterobacterias oportunistas (*E. Coli*, *E. cloacae*, etc), los lactobacilos y enterococos juegan un papel determinante en este tipo de cuadros. En el grupo control se detectó paso de bacterias del intestino al pulmón, bazo y ganglios linfáticos, mientras que en el grupo tratamiento, en el único ratón donde se aislaron gérmenes fue a nivel pulmonar. Esto supone que en el último caso la traslocación he tenido lugar por vía hematógica y no linfática. De lo anterior se deduce que la administración de CT-1 repara el daño epitelial ocasionado por el DSS frenando el paso de bacterias a órganos extraintestinales.

En resumen, la administración de CT-1 tiene efectos protectores y probablemente reparativos en la colitis provocada por DSS a ratones. Estos efectos de CT-1 parecen estar mediados por una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias $TNF-\alpha$, IL-17 e $IFN-\gamma$, el incremento de las citoquinas antiinflamatorias IL-6 e IL-10, y una menor expresión de iNOS junto a efectos antiapoptóticos a través de la vía JACK/STAT3. Estos datos sugieren la posibilidad de utilizar la CT-1 terapéuticamente para frenar la fase aguda de la CU y restablecer la integridad de la barrera epitelial en humanos.

- **LINEAS DE ESTUDIO FUTURAS.**

Tras la realización de este estudio, se abre un nuevo campo de investigación de la CT-1 en humanos. Consideramos necesario el estudio de CT-1 en diferentes fases de la evolución de la CU en humanos, mediante su medición en plasma y mucosa de colon con la finalidad de conocer la implicación de esta citoquina en la actividad inflamatoria de la CU en humanos, y si es posible por tanto su empleo en el futuro para el tratamiento del brote agudo de la enfermedad en pacientes fundamentalmente en corticorresistentes o con fracaso de tratamientos

biológicos. La CT-1 podría aportar soluciones diferentes a la colectomía en estos escenarios o bien mejorar el estado general de los pacientes antes de la cirugía.

El uso clínico de la CT-1 como terapia viene facilitado por el hecho de que la agencia de control de fármacos de los Estados Unidos, la FDA (US Food and Drug Administration) la ha declarado ya fármaco huérfano para el tratamiento del fallo hepático agudo (designation request 11-3507), y para la protección del hígado contra el daño por isquemia/reperfusión inherente al trasplante de hígado (designation request 07-2449). Por su parte, la Agencia Europea del Medicamento, la EMA (European Medicine Agency) también la ha declarado medicamento huérfano para la prevención del daño por isquemia reperfusión asociado al trasplante de órganos sólidos (EU/3/06/396) y para el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda (EU/3/11/893). Además se ha registrado en US Clinical trials.gov, un ensayo clínico para determinar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de CT-1 en voluntarios sanos (identificador NCT01334697) (www.clinicaltrials.gov, checked on June 15, 2014). Todo esto facilitaría el paso de la investigación básica aquí realizada a su uso clínico, normalmente un camino muy largo y muy costoso.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- ✓ La Cardiotrofina-1 endógena juega un papel protector del colon frente a la agresión inducida por la administración de DSS.

- ✓ La administración de Cardiotrofina-1 mejora la enfermedad en animales en los que se ha inducido una CU por DSS.

- ✓ Este efecto parece estar mediado por la reducción de los procesos inflamatorios inducidos por DSS

- ✓ Estos datos sugieren la posibilidad de utilizar Cardiotrofina-1 para restablecer la integridad de la barrera epitelial y mejorar la clínica de la CU instaurada.

Bibliografía

- (1) Jorgensen SP, Agnholt J, Glerup H, Lyhne S, Villadsen GE, Hvas CL, et al. Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 Aug;32(3):377-383.
- (2) Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct;14 Suppl 2:S9-11.
- (3) Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* 1992 May;33(5):687-693.
- (4) Probert CS, Jayanthi V, Pollock DJ, Baithun SI, Mayberry JF, Rampton DS. Crohn's disease in Bangladeshis and Europeans in Britain: an epidemiological comparison in Tower Hamlets. *Postgrad Med J* 1992 Nov;68(805):914-920.
- (5) Bernstein CN. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* 2010;28(3):406-410.
- (6) Bernstein CN, Singh S, Graff LA, Walker JR, Miller N, Cheang M. A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *Am J Gastroenterol* 2010 Sep;105(9):1994-2002.
- (7) Auvin S, Molinie F, Gower-Rousseau C, Brazier F, Merle V, Grandbastien B, et al. Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988-1999). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 Jul;41(1):49-55.
- (8) Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.
- (9) Jayanthi V, Probert CS, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiology of Crohn's disease in Indian migrants and the indigenous population in Leicestershire. *Q J Med* 1992 Feb;82(298):125-138.
- (10) Kugathasan S, Judd RH, Hoffmann RG, Heikenen J, Telega G, Khan F, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study. *J Pediatr* 2003 Oct;143(4):525-531.

- (11) Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Jan;17(1):1-5.
- (12) Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013 Dec;62(12):1795-1805.
- (13) Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 2012 Aug;143(2):347-355.
- (14) Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 2013 Aug;34(8):371-378.
- (15) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):599-603.
- (16) Jess T, Riis L, Jespersgaard C, Hougs L, Andersen PS, Orholm MK, et al. Disease concordance, zygosity, and NOD2/CARD15 status: follow-up of a population-based cohort of Danish twins with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005 Nov;100(11):2486-2492.
- (17) Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.
- (18) Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nat Rev Microbiol* 2010 Aug;8(8):564-577.
- (19) Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2011 Jul-Aug;2(4):211-216.
- (20) Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):344-362.
- (21) Latanich CA, Toledo-Pereyra LH. Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009 Jul-Aug;22(4):301-315.
- (22) Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693-733.

- (23) Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008 Jun 5;453(7196):807-811.
- (24) Van Waes C, Yu M, Nottingham L, Karin M. Inhibitor-kappaB kinase in tumor promotion and suppression during progression of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 1;13(17):4956-4959.
- (25) Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L, et al. In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 2004 Mar;65(3):834-845.
- (26) Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int* 2002 Oct;62(4):1160-1170.
- (27) Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001 Dec;7(12):1291-1297.
- (28) Villanacci V, Manenti S, Antonelli E, Chiudinelli M, Giuliano V, Bassotti G. Non-IBD colitides: clinically useful histopathological clues. *Rev Esp Enferm Dig* 2011 Jul;103(7):366-372.
- (29) Tysk C, Bohr J, Nyhlin N, Wickbom A, Eriksson S. Diagnosis and management of microscopic colitis. *World J Gastroenterol* 2008 Dec 28;14(48):7280-7288.
- (30) Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2-6; discussion 16-9.
- (31) Sans M, Correa I. Criterios diagnósticos y clínicos de la colitis ulcerosa. In: Gassul M, Gomollón F, Hinojosa J, Obrador. A., editors. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*; 2007. p. 253-263.
- (32) Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006 Mar;55(3):426-431.
- (33) Sipponen T, Savilahti E, Karkkainen P, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, et al. Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct;14(10):1392-1398.
- (34) Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, et al. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear

antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006 Oct;101(10):2410-2422.

(35) Sans M, Fuster D, Llach J, Lomena F, Bordas JM, Herranz R, et al. Optimization of technetium-99m-HMPAO leukocyte scintigraphy in evaluation of active inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000 Sep;45(9):1828-1835.

(36) Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis (Spanish version). *Rev Gastroenterol Mex* 2014 Oct-Dec;79(4):263-289.

(37) Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 2013 Feb;7(1):1-33.

(38) Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006 Jun;55(6):749-753.

(39) Sandborn WJ, Hanauer SB. Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003 Jan;17(1):29-42.

(40) Katz S, Lichtenstein GR, Safdi MA. 5-ASA Dose-Response: Maximizing Efficacy and Adherence. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2010 Feb;6(2 Suppl 3):1-16.

(41) Travis SP, Stange EF, Lemann M, Oresland T, Bemelman WA, Chowers Y, et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Current management. *J Crohns Colitis* 2008 Mar;2(1):24-62.

(42) Lichtenstein GR, Sbreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Mex* 2006 Jul-Sep;71(3):351-401.

(43) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids. *J Intern Med* 2005 Apr;257(4):374-384.

(44) Sicilia B, Vicente R, Arroyo MT, Arribas F, Gomollon F. Ulcerative pancolitis predicts the need for colectomy: study of an incident cohort of patients with ulcerative colitis in Aragon (Spain). *Gastroenterol Hepatol* 2005 Feb;28(2):55-59.

- (45) Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008 Mar;2(1):1-23.
- (46) PALMER WL, KIRSNER JB, MARSHALL H. Therapeutic considerations in chronic ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 1950 Apr;32(4):627-639.
- (47) Farmer RG. The clinical evolution of inflammatory bowel disease, 1960-2010: an eyewitness account. *Am J Gastroenterol* 2010 Sep;105(9):1922-1924.
- (48) TRUELOVE SC, WITTS LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955 Oct 29;2(4947):1041-1048.
- (49) Hanauer SB. The role of biologics in ulcerative colitis. *Dig Dis* 2010;28(3):497-500.
- (50) Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol* 2010 Aug;10(8):605-611.
- (51) Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009 Apr;136(4):1182-1197.
- (52) Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Oct;9(10):767-774.
- (53) Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;105:263-320.
- (54) Kobozev I, Karlsson F, Zhang S, Grisham MB. Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases: translating preclinical data into new drug therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2011 May;17(5):1229-1245.
- (55) Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007 Nov 14;13(42):5581-5593.
- (56) Mahler M, Bristol IJ, Leiter EH, Workman AE, Birkenmeier EH, Elson CO, et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 1998 Mar;274(3 Pt 1):G544-51.
- (57) Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994 Dec;107(6):1643-1652.

- (58) Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989 Mar;96(3):795-803.
- (59) MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978;17(2):135-150.
- (60) Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004 Sep-Oct;50(2):81-92.
- (61) Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Jpn J Pharmacol* 1997 Apr;73(4):299-309.
- (62) Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998 Nov 16;188(10):1929-1939.
- (63) Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994 Dec;107(6):1726-1735.
- (64) Elson CO, Cong Y, Sundberg J. The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis. *Int Rev Immunol* 2000;19(1):63-75.
- (65) Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993 Nov;5(11):1461-1471.
- (66) De Jong YP, Comiskey M, Kalled SL, Mizoguchi E, Flavell RA, Bhan AK, et al. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. *Gastroenterology* 2000 Sep;119(3):715-723.
- (67) Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 14;92(4):1142-1146.
- (68) Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995 Aug 15;86(4):1243-1254.
- (69) Pennica D, Swanson TA, Shaw KJ, Kuang WJ, Gray CL, Beatty BG, et al. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* 1996 Mar;8(3):183-189.

(70) Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 2004 Jan;20(1):23-32.

(71) Garcia-Cenador MB, Lopez-Novoa JM, Diez J, Garcia-Criado FJ. Effects and mechanism of organ protection by cardiotrophin-1. *Curr Med Chem* 2013;20(2):246-256.

(72) Lopez-Andres N, Rousseau A, Akhtar R, Calvier L, Inigo C, Labat C, et al. Cardiotrophin 1 is involved in cardiac, vascular, and renal fibrosis and dysfunction. *Hypertension* 2012 Aug;60(2):563-573.

(73) Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Beaumont J, Zudaire A, Gallego I, et al. Cardiotrophin-1 in hypertensive heart disease. *Endocrine* 2012 Aug;42(1):9-17.

(74) Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol* 2008 Mar;153 Suppl 1:S414-27.

(75) Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembotski CC, et al. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem* 1996 Apr 19;271(16):9535-9545.

(76) Hendry L, John S. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem* 2004 Dec;271(23-24):4613-4620.

(77) Fujitani Y, Hibi M, Fukada T, Takahashi-Tezuka M, Yoshida H, Yamaguchi T, et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 1997 Feb 20;14(7):751-761.

(78) Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J* 2005 Dec 1;392(Pt 2):335-344.

(79) Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007 Jun;7(6):454-465.

(80) Tian ZJ, Cui W, Li YJ, Hao YM, Du J, Liu F, et al. Different contributions of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin-1. *Acta Pharmacol Sin* 2004 Sep;25(9):1157-1164.

(81) Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, et al. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein

kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 15;90(6):2207-2211.

(82) Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, et al. Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000 Aug;32(8):1385-1394.

(83) Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003 Dec 8;22(56):8983-8998.

(84) Grande MT, Fuentes-Calvo I, Arevalo M, Heredia F, Santos E, Martinez-Salgado C, et al. Deletion of H-Ras decreases renal fibrosis and myofibroblast activation following ureteral obstruction in mice. *Kidney Int* 2010 Mar;77(6):509-518.

(85) Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 4;97(1):315-319.

(86) Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 2007 Feb 9;128(3):589-600.

(87) Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 2001 Aug 28;104(9):979-981.

(88) Baines CP, Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2005 Jan;38(1):47-62.

(89) Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009 Apr;53(4):425-435.

(90) Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC. The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2001 Oct 5;276(40):37621-37629.

(91) Yang ZF, Lau CK, Ngai P, Lam SP, Ho DW, Poon RT, et al. Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. *Liver Int* 2008 May;28(5):622-631.

- (92) Fritzenwanger M, Foerster M, Meusel K, Jung C, Figulla HR. Cardiotrophin-1 induces intercellular adhesion molecule-1 expression by nuclear factor kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. *Chin Med J (Engl)* 2008 Dec 20;121(24):2592-2598.
- (93) Garcia-Cenador MB, Lorenzo-Gomez MF, Herrero-Payo JJ, Ruiz J, Perez de Obanos MP, Pascual J, et al. Cardiotrophin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation. *Transplantation* 2013 Dec 27;96(12):1034-1042.
- (94) Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, et al. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 2000 Jan 24;148(2):325-332.
- (95) Lopez N, Diez J, Fortuno MA. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine* 2005 Jun 7;30(5):282-292.
- (96) Chollangi S, Wang J, Martin A, Quinn J, Ash JD. Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina. *Neurobiol Dis* 2009 Jun;34(3):535-544.
- (97) Jung JE, Kim GS, Chan PH. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke. *Stroke* 2011 Dec;42(12):3574-3579.
- (98) Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997 Apr 10;336(15):1066-1071.
- (99) Moreno-Aliaga MJ, Perez-Echarri N, Marcos-Gomez B, Larequi E, Gil-Bea FJ, Viollet B, et al. Cardiotrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism. *Cell Metab* 2011 Aug 3;14(2):242-253.
- (100) Freed DH, Cunnington RH, Dangerfield AL, Sutton JS, Dixon IM. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res* 2005 Mar 1;65(4):782-792.
- (101) Asai S, Saito Y, Kuwahara K, Mizuno Y, Yoshimura M, Higashikubo C, et al. The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Dec 20;279(2):320-323.
- (102) Latchman DS. Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int J Exp Pathol* 1999 Aug;80(4):189-196.

- (103) Freed DH, Moon MC, Borowiec AM, Jones SC, Zahradka P, Dixon IM. Cardiotrophin-1: expression in experimental myocardial infarction and potential role in post-MI wound healing. *Mol Cell Biochem* 2003 Dec;254(1-2):247-256.
- (104) Jin H, Yang R, Keller GA, Ryan A, Ko A, Finkle D, et al. In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine* 1996 Dec;8(12):920-926.
- (105) Berg K, Jynge P, Bjerve K, Skarra S, Basu S, Wiseth R. Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free Radic Res* 2005 Jun;39(6):629-636.
- (106) Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006 Mar 15;119(Pt 6):1043-1052.
- (107) Ishikawa M, Saito Y, Miyamoto Y, Harada M, Kuwahara K, Ogawa E, et al. A heart-specific increase in cardiotrophin-1 gene expression precedes the establishment of ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *J Hypertens* 1999 Jun;17(6):807-816.
- (108) Ghosh S, Ng LL, Talwar S, Squire IB, Galinanes M. Cardiotrophin-1 protects the human myocardium from ischemic injury. Comparison with the first and second window of protection by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000 Dec;48(3):440-447.
- (109) Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA, et al. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 2006 Mar 31;98(6):837-845.
- (110) Stejskal D, Ruzicka V. Cardiotrophin-1. Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008 Jun;152(1):9-19.
- (111) Takimoto Y, Aoyama T, Iwanaga Y, Izumi T, Kihara Y, Pennica D, et al. Increased expression of cardiotrophin-1 during ventricular remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Mar;282(3):H896-901.
- (112) Jin H, Yang R, Ko A, Pennica D, Wood WI, Paoni NF. Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine* 1998 Jan;10(1):19-25.
- (113) Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, Magaribuchi T, Kamitani S, Kuwahara K, et al. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Jul;279(1):H388-96.

- (114) Zhou D, Zheng X, Wang L, Stelmack G, Halayko AJ, Dorscheid D, et al. Expression and effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2003 Dec;140(7):1237-1244.
- (115) Zheng X, Zhou D, Seow CY, Bai TR. Cardiotrophin-1 alters airway smooth muscle structure and mechanical properties in airway explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 Dec;287(6):L1165-71.
- (116) Nomura N, Asano M, Saito T, Sasaki S, Suzuki H, Manabe T, et al. Cardiotrophin-1 is a prophylactic against the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Ann Thorac Surg* 2003 Jul;76(1):237-243.
- (117) Pulido EJ, Shames BD, Pennica D, O'leary RM, Bensard DD, Cain BS, et al. Cardiotrophin-1 attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *J Surg Res* 1999 Jun 15;84(2):240-246.
- (118) Robledo O, Guillet C, Chevalier S, Fourcin M, Froger J, Pouplard-Barthelaix A, et al. Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *Eur Cytokine Netw* 1997 Sep;8(3):245-252.
- (119) Iniguez M, Berasain C, Martinez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, et al. Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *J Exp Med* 2006 Dec 25;203(13):2809-2815.
- (120) Ho DW, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, To JY, Poon RT, et al. Therapeutic potential of cardiotrophin 1 in fulminant hepatic failure: dual roles in antiapoptosis and cell repair. *Arch Surg* 2006 Nov;141(11):1077-84; discussion 1084.
- (121) Aguilar-Melero P, Luque A, Machuca MM, Perez de Obanos MP, Navarrete R, Rodriguez-Garcia IC, et al. Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant. *J Surg Res* 2013 May;181(2):e83-91.
- (122) Mitsumoto H, Klinkosz B, Pioro EP, Tsuzaka K, Ishiyama T, O'Leary RM, et al. Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease. *Muscle Nerve* 2001 Jun;24(6):769-777.
- (123) Peng H, Sola A, Moore J, Wen T. Caspase inhibition by cardiotrophin-1 prevents neuronal death in vivo and in vitro. *J Neurosci Res* 2010 Apr;88(5):1041-1051.
- (124) Wen TC, Rogido MR, Moore JE, Genetta T, Peng H, Sola A. Cardiotrophin-1 protects cortical neuronal cells against free radical-induced injuries in vitro. *Neurosci Lett* 2005 Oct 14;387(1):38-42.

- (125) Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 1999 Nov;9(8):245-249.
- (126) Natal C, Fortuno MA, Restituto P, Bazan A, Colina I, Diez J, et al. Cardiotrophin-1 is expressed in adipose tissue and upregulated in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008 Jan;294(1):E52-60.
- (127) Lopez-Yoldi M, Fernandez-Galilea M, Laiglesia LM, Larequi E, Prieto J, Martinez JA, et al. Cardiotrophin-1 stimulates lipolysis through the regulation of main adipose tissue lipases. *J Lipid Res* 2014 Dec;55(12):2634-2643.
- (128) Quiros Y, Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Morales AI, Lopez-Novoa JM. Cardiotrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. *Toxicol Sci* 2013 Apr;132(2):493-501.
- (129) Bamba S, Andoh A, Ban H, Imaeda H, Aomatsu T, Kobori A, et al. The severity of dextran sodium sulfate-induced colitis can differ between dextran sodium sulfate preparations of the same molecular weight range. *Dig Dis Sci* 2012 Feb;57(2):327-334.
- (130) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990 Mar;98(3):694-702.
- (131) Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, et al. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001 Nov 5;194(9):1207-1218.
- (132) Krieglstein CF, Cerwinka WH, Sprague AG, Laroux FS, Grisham MB, Kotliansky VE, et al. Collagen-binding integrin alpha1beta1 regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Invest* 2002 Dec;110(12):1773-1782.
- (133) Oppenheim RW, Wiese S, Prevette D, Armanini M, Wang S, Houenou LJ, et al. Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci* 2001 Feb 15;21(4):1283-1291.
- (134) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993 Aug;69(2):238-249.

- (135) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 Jan 29;239(4839):487-491.
- (136) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
- (137) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4354.
- (138) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
- (139) Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? *Curr Mol Med* 2004 Nov;4(7):763-775.
- (140) Benigni F, Sacco S, Pennica D, Ghezzi P. Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells. *Am J Pathol* 1996 Dec;149(6):1847-1850.
- (141) Hamanaka I, Saito Y, Yasukawa H, Kishimoto I, Kuwahara K, Miyamoto Y, et al. Induction of JAB/SOCS-1/SSI-1 and CIS3/SOCS-3/SSI-3 is involved in gp130 resistance in cardiovascular system in rat treated with cardiotrophin-1 in vivo. *Circ Res* 2001 Apr 13;88(7):727-732.
- (142) Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest* 2001 Nov;108(10):1459-1467.
- (143) Tanimoto K, Saito Y, Hamanaka I, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, et al. SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiotrophin-1 against lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction in vivo. *Circ J* 2005 Nov;69(11):1412-1417.
- (144) Garcia-Criado FJ, Eleno N, Santos-Benito F, Valdunciel JJ, Reverte M, Lozano-Sanchez FS, et al. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation* 1998 Oct 27;66(8):982-990.
- (145) Garcia-Criado FJ, Rodriguez-Barca P, Garcia-Cenador MB, Rivas-Elena JV, Grande MT, Lopez-Marcos JF, et al. Protective effect of new nitrosothiols on the

early inflammatory response to kidney ischemia/reperfusion and transplantation in rats. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Aug;29(8):441-450.

(146) Nguyen P. **STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease?**. *J Interferon Cytokine Res* 2015 Mar 11.

(147) Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002 Oct;8(10):1089-1097.

(148) Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009 Feb 3;15(2):103-113.

(149) Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, et al. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003 May 9;278(19):16777-16781.

(150) Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, et al. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005 Jan;100(1):64-72.

(151) Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* 2010 Feb;59(2):227-235.

(152) Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999 Jan;10(1):39-49.

(153) Alonzi T, Newton IP, Bryce PJ, Di Carlo E, Lattanzio G, Tripodi M, et al. Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine* 2004 Apr 21;26(2):45-56.

(154) Liao XX, Li X, Ma ZF, Wang LC, Du ZM, Dong YG, et al. Role of nuclear factor-kappaB in endothelial injury in acute myocardial infarction. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2008 Jul;20(7):413-415.

(155) Moss NC, Tang RH, Willis M, Stansfield WE, Baldwin AS, Selzman CH. Inhibitory kappa B kinase-beta is a target for specific nuclear factor kappa B-mediated delayed cardioprotection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 Nov;136(5):1274-1279.

- (156) Rind HB, von Bartheld CS. Target-derived cardiotrophin-1 and insulin-like growth factor-I promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons. *Mol Cell Neurosci* 2002 Jan;19(1):58-71.
- (157) Toth G, Yang H, Anguelov RA, Vettraino J, Wang Y, Acsadi G. Gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 protects PC12 cells from injury: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Neurosci Res* 2002 Sep 1;69(5):622-632.
- (158) Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hoshijima M, Brown JH, Chien KR. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1997 Feb 28;272(9):5783-5791.
- (159) Ruixing Y, Dezhai Y, Jiaquan L. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction. *J Med Invest* 2004 Feb;51(1-2):29-37.
- (160) Ruixing Y, Jinzhen W, Dezhai Y, Jiaquan L. Cardioprotective role of cardiotrophin-1 gene transfer in a murine model of myocardial infarction. *Growth Factors* 2007 Aug;25(4):286-294.
- (161) Stephanou A, Brar B, Heads R, Knight RD, Marber MS, Pennica D, et al. Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Apr;30(4):849-855.
- (162) Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997 Jul;273(1 Pt 1):L1-9.