



VNiVERSIDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y
FARMACOLOGÍA**

**LA ADMINISTRACIÓN PREVENTIVA DE CARDIOTROFINA-1
DISMINUYE LA GRAVEDAD DE LA COLITIS ULCEROSA INDUCIDA
POR DEXTRANO SULFATO DE SODIO**

Memoria que presenta **Dña. Ana Isabel Sánchez Garrido** para optar al
Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Junio, 2015

**PROF. DRA. DÑA. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, CATEDRÁTICA DE FISIOLOGÍA Y
DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

CERTIFICA:

Que la memoria elaborada por Dña. Ana Isabel Sánchez Garrido, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título *“La administración preventiva de Cardiotrofina-1 disminuye la gravedad de la colitis ulcerosa inducida por Dextrano Sulfato de Sodio”*, ha sido realizada 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. Dra. Dña. María Jesús Monte Río

Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología

PROF. DR. D. ANTONIO RODRÍGUEZ PÉREZ. JEFE DEL SERVICIO DE APARATO DIGESTIVO. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA.

PROF. DR. D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA. CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada *“La administración preventiva de Cardiotrofina-1 disminuye la gravedad de la colitis ulcerosa inducida por Dextrano Sulfato de Sodio”*, realizado por Dña. Ana Isabel Sánchez Garrido, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido desarrollada 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 Salmantina para el estudio de la Enfermedades Hepáticas.

“Tanto por la ciencia como por el arte se llega al mismo sitio, a la verdad”.

Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

Son muchos los esfuerzos realizados durante estos años para llegar hasta aquí y muchas las personas implicadas que han hecho posible llegar al final. A todas y cada una de ellas quiero dar las gracias.

En primer lugar quiero manifestar mi gratitud a los Directores de esta Tesis Doctoral, por su absoluta disponibilidad y cercanía.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología, por los medios prestados para facilitarme la realización del trabajo y ponérmelo siempre muy fácil.

Al Departamento de Histología de la Universidad de Salamanca y al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, en concreto al Profesor Miguel Arévalo que ha colaborado en este trabajo de una manera muy especial.

A todas las personas de los laboratorios de Cirugía, sobre todo a Nacho, Daniel y Yaremi, y a Víctor especialmente, no solo por la ayuda inestimable para la realización de algunas de las técnicas usadas en el trabajo, sino sobre todo por su paciencia, su estímulo y motivación. Nunca les podré agradecer de forma suficiente su dedicación.

Al Departamento de Microbiología y de Estadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

A mi compañera y amiga Vanessa Prieto Vicente, que realizando su tesis de forma paralela, no me he sentido sola, ya que de otra forma hubiera abandonado. Gracias por tu compañerismo, por lo fácil que ha sido trabajar contigo y por tu apoyo en los momentos difíciles.

A todas las personas que forman parte del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca, y sobre todo gracias a Ana Mora y a Conchi Piñero.

También a mi familia, por su apoyo y por comprender mis ausencias, sin ellos no hubiera sido posible nada de esto. Y a mi compañero y amor de mi vida por quererme y respetarme.

Por tí y para tí, Nicolás...

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
1. LA COLITIS ULCEROSA. RESUMEN DE LA SITUACIÓN ACTUAL	7
i. Epidemiología	7
ii. Etiopatogenia	8
1. Factores genéticos implicados	8
2. Microbiota y enteropatógenos	13
3. Trastornos inmunológicos	17
iii. Diagnóstico	29
iv. Tratamientos actuales	39
v. Prevención de la recidiva	43
2. MODELOS EXPERIMENTALES DE COLITIS ULCEROSA	50
3. CARDIOTROFINA 1, CITOCINA ANTIINFLAMATORIA Y ANTIAPOPTÓTICA	55
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69
III. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	77
2. MATERIALES	77
i. Instalaciones	77
ii. Equipos empleados	79
3. MÉTODOS	80
i. Inducción de la colitis	80
ii. Grupos experimentales	80

iii. Monitorización de los signos clínicos de la colitis	81
iv. Sacrificio de los ratones y recogida de muestras	82
v. Estudio histológico	82
vi. Estudio microbiológico	84
vii. Otras técnicas empleadas en el estudio:	85
ELISA	85
PCR	87
Mieloperoxidasa colónica	91
Western Blot	91
4. ESTUDIO ESTADÍSTICO	96
IV. RESULTADOS	99
1. RESULTADOS CLÍNICOS	101
2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS Y DE INMUNOHISTOQUÍMICA	105
3. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	111
4. ESTUDIO DE CITOCINAS	112
5. ESTUDIO DE MACADORES DE INFLAMACIÓN	118
6. EXPRESIÓN DE CARDIOTROFINA-1	121
7. ESTUDIO DE INFILTRACIÓN NEUTROFÍLICA	124
V. DISCUSIÓN	125
VI. CONCLUSIONES	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	145

ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
APC	Antigen-presenter cell (células presentadoras de antígenos)
ASCA	Anticuerpos anti <i>Saccaromyces cerevisiae</i>
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
DPX	Medio de montaje Depex
DSS	Dextrano sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
gp130	Glioproteína 130
GWAS	Genome Wide association Studies
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INFg	Interferon gamma
INOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
JAK	Janus Kinasas
KO	Knock-out
LPS	Lipopolisacáridos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MIP	Proteína inflamatoria del macrófago
MMX	Multimatrix
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	Oxido nítrico
pANCA	Anticuerpo anticitoplasma de neutrófilos perinucleares atípicos
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction(reacción en cadena de la 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
TAD	Terminal de activación de la transcripción
TGF-B	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T helper
Thr	Treoninas
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Transmembrana
TNBS	Ácido trinitrobenceno sulfónico
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
UV	Ultravioleta
VSG	Velocidad de sedimentación globular
WB	Western Blot
WT	Wild type (fenotipo salvaje)

I.- INTRODUCCIÓN

1. LA COLITIS ULCEROSA. RESUMEN DE LA SITUACIÓN 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 CU es 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. 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-medio ambiente/inmunidad.

I. Epidemiología

La epidemiología nos ha demostrado que, en las últimas décadas, se ha producido un aumento de la incidencia de CU y 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). Se ha observado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad entre los niños que

migran a poblaciones más desarrolladas antes de los 15 años (2), 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 (3). Esta distribución es al contrario entre la población pediátrica, cambiando la balanza entre los 14 y los 17 años (4).

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 12.7 y 24.3 por 100.000 habitantes/año para la EC y CU, respectivamente (5).

Existe un gradiente norte-sur, pero se viene observando un aumento de la incidencia en países en los cuales era baja, así como en la población migratoria de países en vías de desarrollo a sociedades más avanzadas (6,7). Además, la incidencia en la EC parece estar aumentando de una forma más acelerada que en la CU (7).

En el caso concreto de España, existen publicaciones que parecen indicar un incremento de la incidencia y la prevalencia de la CU en las últimas décadas. La prevalencia actual ronda los 250.000 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 asocien 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.

II. Etiopatogenia

1. 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 CU, 30-35% en EC) (8).

¿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 relacionados 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, 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 (9).
- 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 candidatos que se encuentren allí. Esta 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 (10). 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, gracias a las células Treg (T reguladoras); segundo, en la resolución de las respuestas excesivas a infecciones (11). 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 (SNP como el cambio de C a T de la figura) 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 Inmunochip, 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 EC, 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 (10,12). Casi un 30% de los pacientes con EC 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 citocinas 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) (13).

La base genética de la EC y de la CU es diferente. Los datos de concordancia de gemelos univitelinos (10-15% en CU, 30-35% en EC) 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) y c) los diferentes efectos del ambiente (el tabaco protege de la CU mientras que agrava la EC).

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 figura 1, se resumen los factores ambientales y microbianos que, en interacción con los inmunitarios y genéticos, participan en la patogenia de la EII (14).

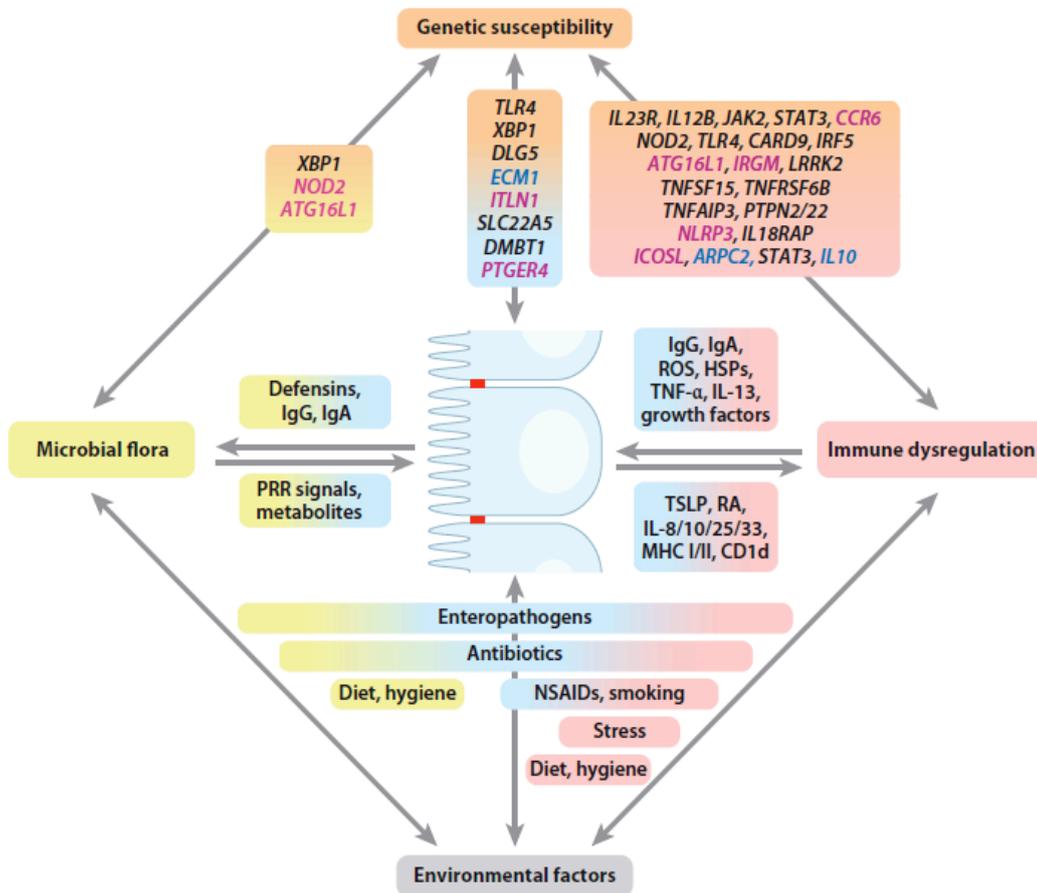


Figura 1. Patogenia de la EII. Obtenida de Kaser et al. Annu Rev Immuno. 2010

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 las causa de las variaciones, no solo fenotípicas, sino clínicas o evolutivas.

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 elementos ambientales. 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. El componente genético o ambiental puede tener un impacto mayor o menor en distintos individuos, 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.

2. 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} /mm³. 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 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 (15).

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 EII 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:

- Metabólica. 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 habrá disminución del papel atenuador de la activación del factor de transcripción NF- κ B, 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), y al sistema inmune adaptativo, el cual memoriza esta información y así 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 lleve a la cronificación del 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 gémenes que, aunque propios, se encuentran en exceso o defecto por causas no del todo conocidas (gastroenteritis, antibióticos, dieta, tabaco, contaminación, etc.). Figura 2.

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 (16).

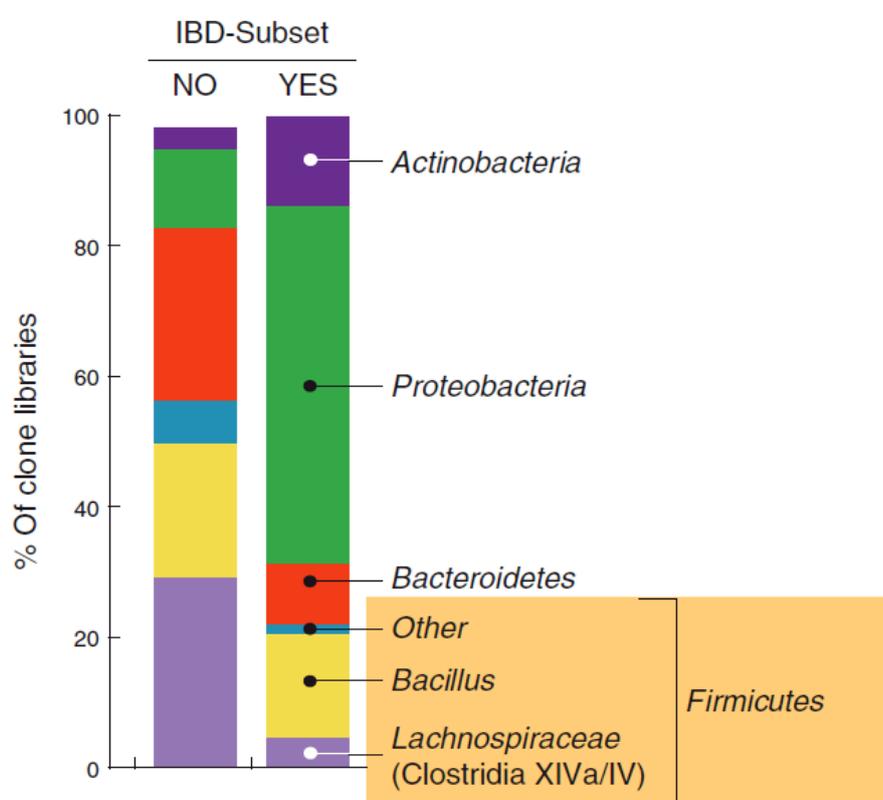


Figura 2. Disbiosis en la EII. Obtenida de Frank et al., Proc Natl Acad Sci USA 2007.

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 *Escherichia coli* en la patogenia de la EII. Se ha evidenciado que la *Escherichia coli* asociada a mucosa y la *Escherichia coli* intramucosa, así como las hemaglutininas que producen, son mucho más prevalentes en la EC (98% de las bacterias intramucosas eran *Escherichia coli*), que en la CU (45%) y que en la población sin EII (2%) (16).

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

Hay estudios que demuestran que los pacientes que han pasado una infección por *Yersinia enterocolítica*, una gastroenteritis por *Salmonella no-typhi* o por *Campylobacter* termofílico presentan incrementada la incidencia de la EII. Del mismo modo, de forma clásica se ha venido evaluando el probable papel del *Mycobacterium avium paratuberculosis*, por la similitud del cuadro de enterocolitis granulomatosa crónica que produce en animales, sin embargo, los esfuerzos han sido infructuosos y no se ha visto asociación de esta bacteria con las mutaciones NOD2. Tampoco ha mostrado ningún beneficio para la EC el tratamiento con triple terapia frente a micobacterias.

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. 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.

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.

3. Trastornos inmunológicos

En el proceso patogénico general de los síndromes que componen la que denominamos EII, 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 proinflamatorios (eicosanoides, radicales libres de oxígeno ROS), 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 (NK)) 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 , INF γ y citocinas 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 citocinas producidas por macrófagos: IL6, IL1 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 citocinas al sistema inmunitario.

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

Otras defensas adicionales contra la invasión bacteriana son las células epiteliales especializadas que 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 Th1 (T helper) (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 NK) y alteraciones de la barrera intestinal (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 (Treg) 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 del epitelio intestinal), TLR, que son la primera línea de reconocimiento de la estructura molecular de antígenos.
- Los receptores intracelulares (NOD y MyD88 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 translocan 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 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, sobre todo 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 (17).

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 (17). 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 (18). 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 (Figura 3). Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear BCL-3 (19). Los precursores p105 y p100, procesados por el proteosoma, dan lugar a las formas activas p50 y p52 respectivamente.

Proteínas I κ Bs

En células que no han sido activadas, el NF- κ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva debido a la asociación con las proteínas inhibitorias (I κ Bs)(18).

Las proteínas I κ Bs se caracterizan por tener secuencias repetidas de ankirina que son esenciales para su interacción con los dímeros de NF- κ B, y comprenden tres grupos funcionales:

- Las proteínas I κ B típicas I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ (19), que se encuentran en el citoplasma de células no estimuladas y bajo un estímulo se produce la degradación y resíntesis.
- Las proteínas precursoras p100 y p105 que pueden ser procesadas para formar los miembros de la familia NF- κ B, p52 y p50, respectivamente, o pueden ser degradadas.

- Y las proteínas atípicas I κ B ζ , BCL-3 y I κ BNS, que generalmente no se expresan en células no activadas, pero una vez activadas llevan a cabo sus efectos en el núcleo.

Las tres I κ Bs tienen distintas cinéticas en cuanto a la degradación por el proteosoma una vez estimuladas. I κ B- α , es degradada más rápidamente que I κ B- β e I κ B- ϵ , en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS y TNF- α y es resintetizada de manera NF- κ B dependiente para constituir un circuito de retroalimentación negativa en el cual se sintetiza nuevamente I κ B- α , entra en el núcleo para unirse al heterodímero RelA/p50 y vuelve al citoplasma de manera rápida y continua. Por lo tanto, la ausencia de I κ B- α deteriora la terminación de la actividad de NF- κ B seguida de la estimulación con LPS y TNF- α (20). En cuanto a I κ B- β e I κ B- ϵ tanto la resíntesis como la degradación se produce con una cinética menor. Las proteínas atípicas I κ B ζ , BCL-3 y I κ BNS tienen una regulación y funciones muy diferentes (19).

Proteínas IKKs

La familia de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs) está constituida por IKK α , IKK β e IKK γ también llamado [modulador esencial de NF- κ B (NEMO)]. Los inductores de NF- κ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación del complejo IKK. El mecanismo por el cual el complejo IKK es activado es muy complejo y es diferente dependiendo del tipo de estímulo que lo active (21)(Figura 3). Los homodímeros o heterodímeros de IKK α o IKK β fosforilan a las proteínas I κ B, induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca a núcleo (22).

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.

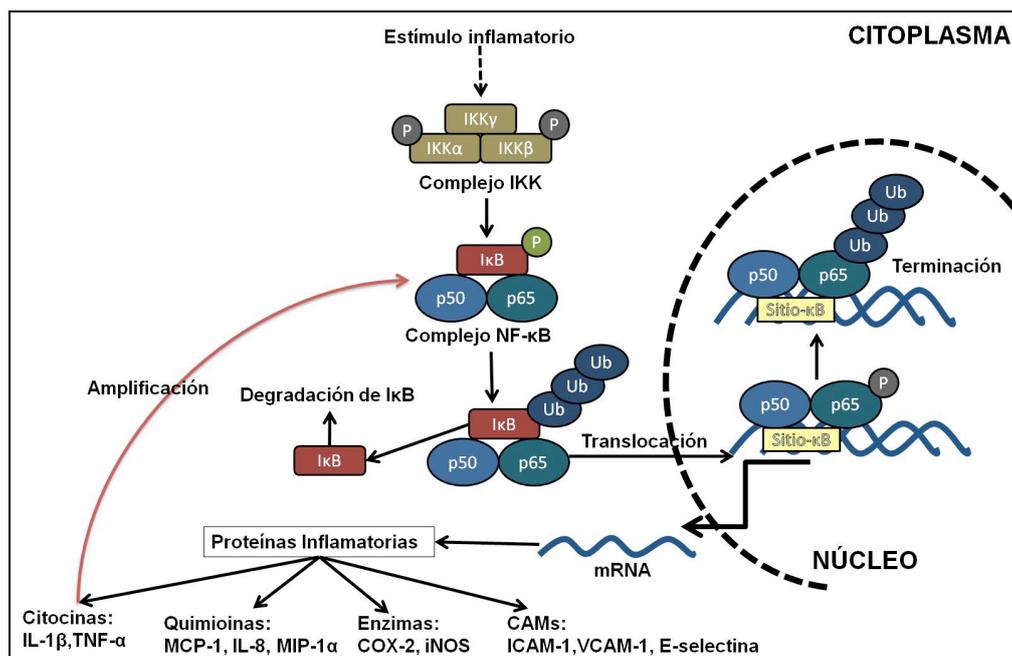


Figura 3. En condiciones normales, NF- κ B (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma, formando un complejo inactivo con la subunidad inhibitoria I κ B. Después de su activación, I κ B es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinizada. El fosfato verde significa fosforilación que tiene como 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 I κ B cinasa (IKK), complejo formado como ya hemos dicho de dos subunidades catalíticas (IKK- β , IKK- α) y una subunidad reguladora NEMO (21).

Una vez que el complejo IKK es activado, se fosforila la I κ B- 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- κ B (representada principalmente por los heterodímeros p65/p50) que se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción mediante la unión a secuencias de DNA conocidas como sitios κ B, para llevar a cabo la transcripción de genes específicos, entre ellos, genes de aproximadamente 27 citocinas y quimioquinas, moléculas de adhesión, receptores de citocinas, moléculas de histocompatibilidad y otras, incluyendo el de I κ B- α 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(18). 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 citocinas 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 (18).

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 (24). En un estudio *in vivo* 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 (25).

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 (26). 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 (26).

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 proinflamatorios, 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 (26).

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 b) 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 CD4+ 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 citocinas específicas y funciones reguladoras implicadas en patologías autoinmunes. Entre los distintos subgrupos descritos, cabe destacar los linfocitos Th17 y las células 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 el antígeno a través de las células presentadoras de antígenos (*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.

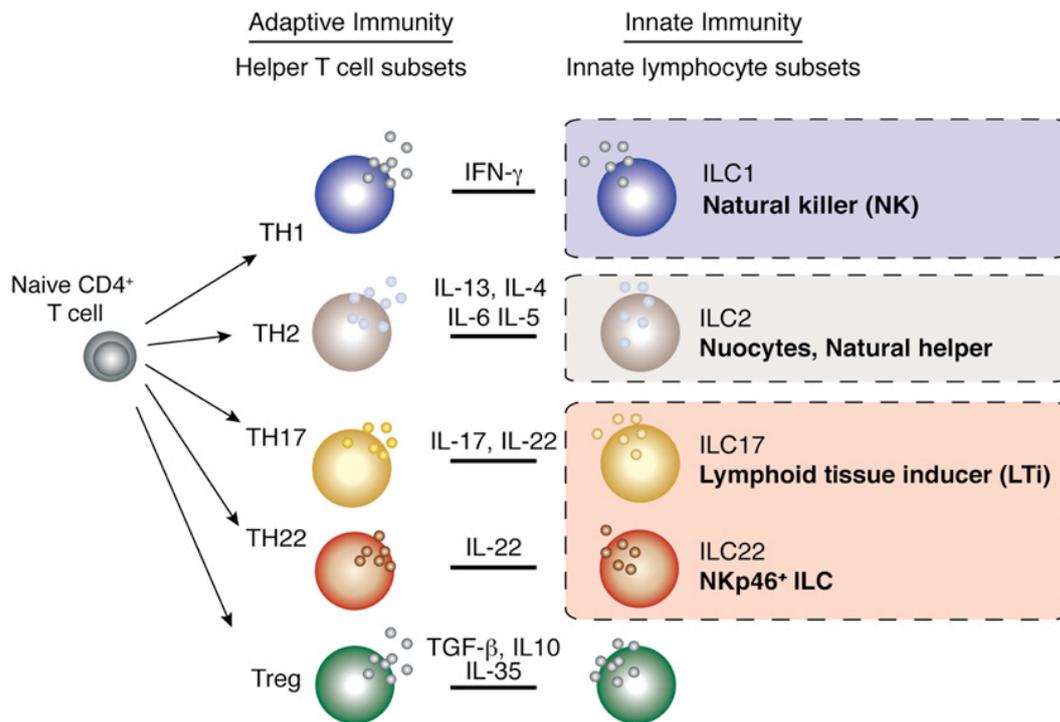


Figura 4. Paralelismo entre células linfoides innatas y linfocitos Th. Obtenido de Rankin et al. *Front. Immunol.* 2013.

La mucosa inflamada de la EII tiene una infiltración masiva de células Th17 que se ubican en la mucosa en el caso de la CU. 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 citocina 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 citocinas 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 citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- β). En situaciones de disbiosis la respuesta inmunitaria debe reconocer y responder a los patógenos produciéndose la inflamación. 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.

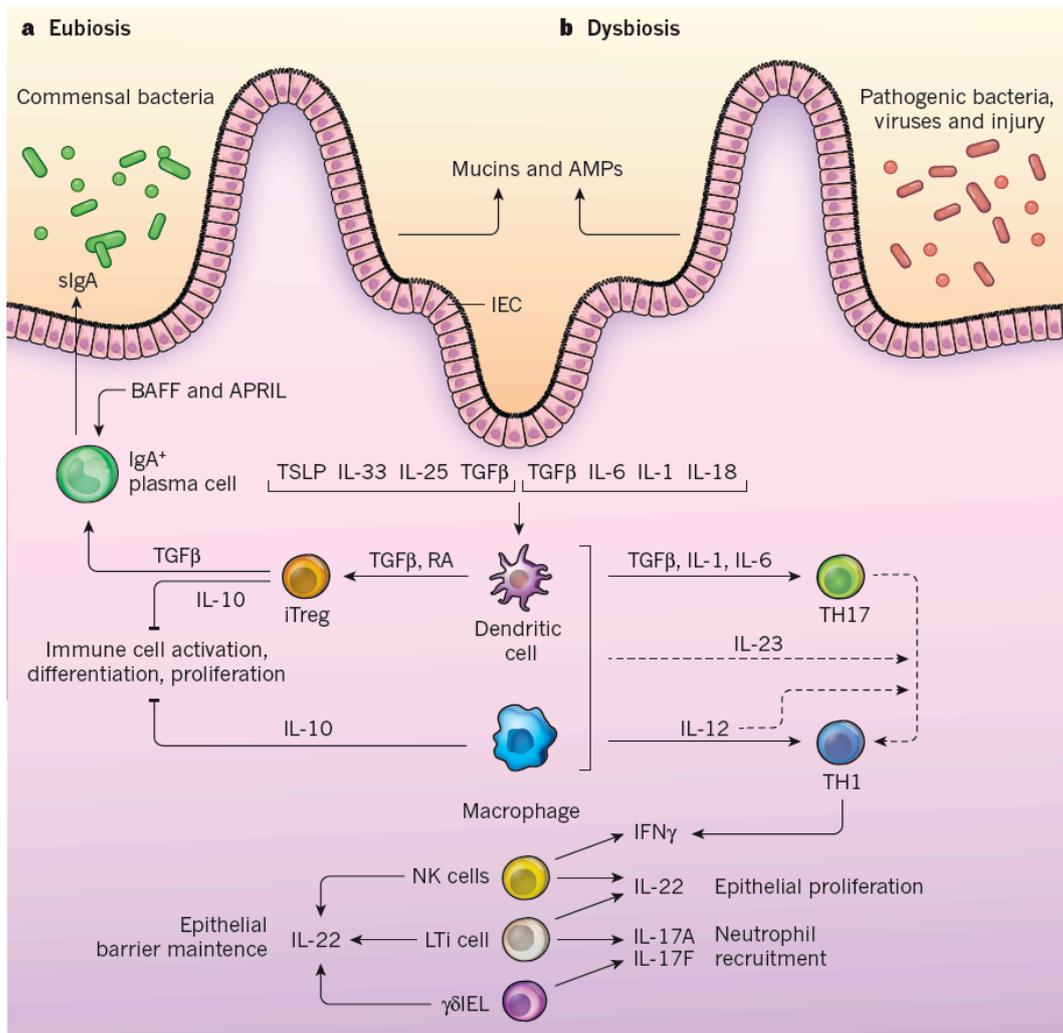


Figura 5. Respuesta inmunitaria a microorganismos patógenos en el intestino.

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.

La 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 citocinas, 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 Treg, 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.

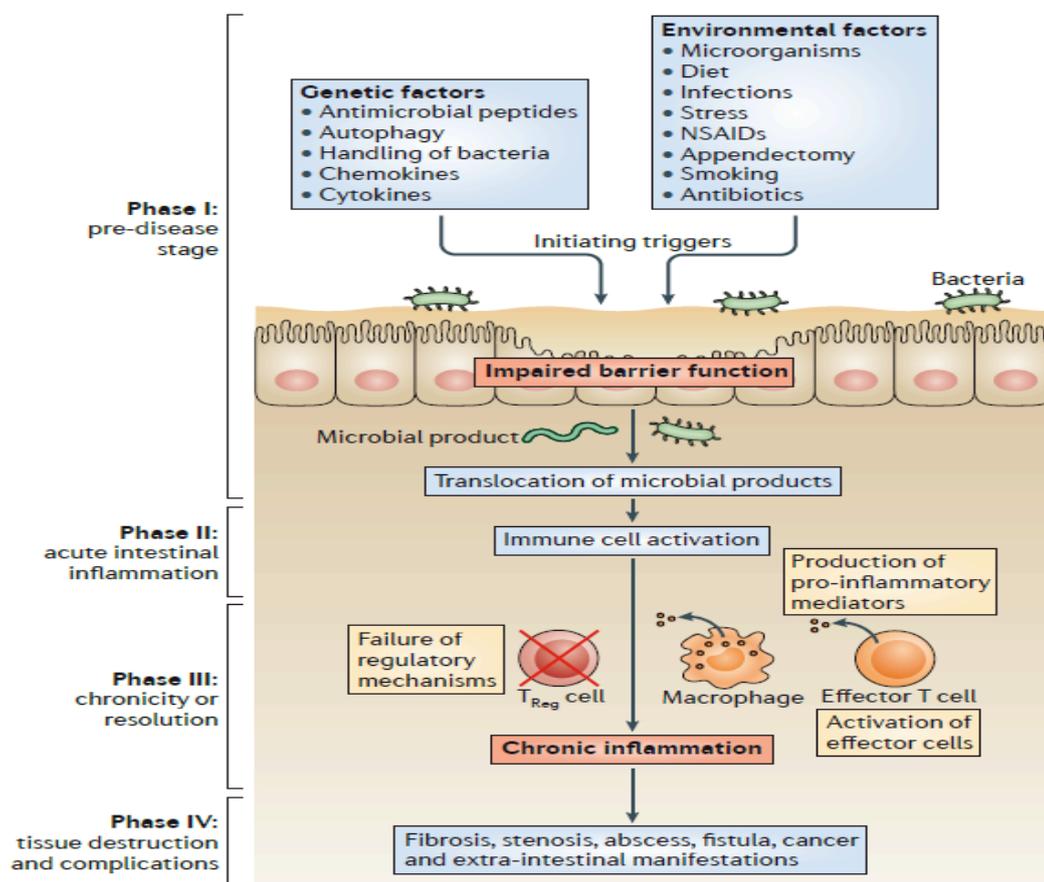


Figura 6. Resumen del desarrollo de la EII. Obtenido de Neurath. Nat. Rev. Immuno. 2014.

III. Diagnóstico

- **Aspectos clínicos**

La EII es un trastorno inflamatorio crónico del intestino que engloba dos entidades clínicas: la CU y la EC. 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 recaídas), cuya intensidad y gravedad es variable, y otros períodos de inactividad o remisión.

La CU se caracteriza por afectar exclusivamente al colon. A veces se afecta el íleon 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 viene dado por una combinación de criterios clínicos, endoscópicos, histológicos y radiológicos. Se deben descartar otras formas de colitis aguda o crónica, como: microscópica, infecciosas, pseudomembranosa, por fármacos, por agentes físicos, isquémica, eosinofílica, por causas metabólicas y hormonales, neoformaciones, enfermedades sistémicas, diverticulosis y colitis funcionales (27,28).

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 celiaca,

vasculitis, etc.).

En los años 80 se establecieron los criterios de Lennard-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 (29). (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de Lennard-Jones.

CRITERIOS CLÍNICOS	<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) (30).

- **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. En algunos casos hay alteración de la bioquímica hepática, lo que obliga a descartar la asociación de colangitis esclerosante primaria, entre otras entidades. La proteína C reactiva 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 (31).

- ✓ 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 (32).

- ✓ 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%) (33).

- ✓ 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*. Realizar *Mantoux con Booster* para despistaje de tuberculosis. 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 en la tinción hematoxilina eosina 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 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. 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 plasmocitosis 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 (34).

- **Clasificación de la Colitis Ulcerosa**

Una vez establecido el diagnóstico, la intensidad de los síntomas y la valoración del grado y extensión de la inflamación mediante los estudios descritos, facilitan el conocimiento de la afectación del colon y su repercusión en el paciente. De la extensión de las lesiones, de la actividad de la enfermedad (determinada por la intensidad del proceso inflamatorio) y de la gravedad (definida por el estado sintomático del paciente), van a depender la clínica, el curso evolutivo y el pronóstico de la CU.

En la clasificación de Montreal y en la guía de la *European Crohn's and Colitis Organization* (ECCO) se definen los criterios establecidos por consenso para la tipificación de la enfermedad (35,36).

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 (37).

Según la clasificación de Montreal, la CU se clasifica de la siguiente manera:

En cuanto a 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 de más de 90 l.p.m., hemoglobina menor de 10,5 g/dl, VSG mayor de 30 mm/h y signos de afectación sistémica grave.

La extensión de la enfermedad tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas, relacionándose también con un mayor riesgo de cáncer de colon.

- **Evaluación de la 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 primeros años del diagnóstico condicionará el curso evolutivo los siguientes años. La actividad y gravedad de la CU ha tratado de medirse con índices para valorar, de forma objetiva, la decisión de tratar, la vía de administración de medicación, la respuesta a diferentes tratamientos o la decisión de intervención quirúrgica.

Se han elaborado distintos índices de actividad, que en la mayoría de ellos incluyen condicionantes clínicos, analíticos y endoscópicos. En la CU, existe un paralelismo entre la

gravedad clínica y la actividad inflamatoria, sobre todo en las formas extensas de la enfermedad. Existen, por tanto índices específicos para la cuantificación de las lesiones endoscópicas e histológicas, y también índices mixtos.

-Índices de actividad clínica:

- Índice de Truelove-Witts: es el índice de actividad clínica más utilizado en el que se incluyen variables clínicas y de laboratorio (38) (Tabla 2). Distingue entre enfermedad en remisión y con actividad, diferenciándose entre actividad leve, moderado o grave. 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 Organization* (ECCO) y del *American College of Gastroenerology* (ACG):

Tabla 2. Índice de Truelove-Witts 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

Inactivo < 11; Brote leve 11-15; Brote moderado 16-20; Brote grave > 20.

- Índice de Actividad Clínica (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:

Permiten valorar y cuantificar la mejoría o la curación mucosa y son útiles para unificar criterios de interpretación. No se utilizan en la práctica clínica habitual, su mayor utilidad se adquiere en el contexto de ensayos clínicos. Entre ellos se encuentran el índice de Baron, el índice de Baron modificado, índice de Sutherland, índice de Sninsky, evaluación sigmoidoscópica de Powell-Tuck, y el índice endoscópico de Rachmilewitz. Hay dos validados para evaluar la actividad endoscópica, el UCEIS (*Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity*) y el UCCIS (*The Ulcerative Colitis Colonoscopic Index of Severity*).

-Índices mixtos:

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 (Tabla 3). El subíndice endoscópico es el más utilizado en la práctica clínica. El índice de Mayo predice la corticorrefractoriedad de un brote grave de CU en caso de no haber mejoría a los 3 y 5 días de inicio del tratamiento. Este índice no está validado. 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.

Tabla 3. Índice de Mayo.

VARIABLE		SCORE
Nº DEPOSICIONES	Normal	0
	1-2 deposiciones	1
	3-4 deposiciones	2
	> 4 deposiciones	3
SANGRE EN HECES	No se aprecia	0
	Deposiciones con hilos de sangre en menos de la mitad	1
	Deposiciones con sangrado visible en la mayoría	2
	Solo sangre	3
HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS	Normal o enfermedad inactiva	0
	Enfermedad leve (eritema, patrón vascular disminuido, friabilidad leve)	1
	Enfermedad moderada (eritema marcado, ausencia de patrón vascular, friabilidad, erosiones)	2
	Enfermedad grave (sangrado espontáneo, ulceración)	3
VALORACION MÉDICA	Normal	0
	Enfermedad leve	1
	Enfermedad moderada	2
	Enfermedad grave	3

-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.

IV. Tratamientos actuales

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, inmunomoduladores y los fármacos biológicos, reservándose el tratamiento quirúrgico 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, anticuerpos monoclonales dirigidos contra el 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 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 (39).

- **Salicilatos**

Los aminosalicilatos son el tratamiento de primera línea en la inducción y el mantenimiento de la colitis ulcerosa. Su 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 (40).

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 (41,42).

- **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 (43). Cuando el paciente presenta una enfermedad moderada-grave está indicado iniciar tratamiento con corticoides sistémicos (44).

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 (45).

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 (46) y es en este escenario, es donde los fármacos inmunosupresores van a desarrollar un importante papel: tanto en los pacientes con CU corticodependiente como en los corticorrefractarios. La corticodependencia (47) es 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 EC.

La corticorresistencia es aquella situación en la que la enfermedad se mantiene activa pese al tratamiento con dosis plenas de corticoides (47).

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 EII 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 tabla 4 los niveles de evidencia y grado de recomendación recogidos en el consenso elaborado por la ECCO (43).

Tabla 4. Fármacos inmunosupresores.

Fármaco	Indicación	Nivel de evidencia	Grado de recomendación
Azatioprina/	Inducción remisión moderado corticorrefractario	1b	B

Mercaptopurina	Mantenimiento corticodependiente	1a	A
	Mantenimiento tras inducción ciclosporina	1b	C
Metotrexato	No indicación		
Ciclosporina	Inducción remisión grave corticorrefractario	1b	C
Tacrolimus	Inducción remisión grave corticorrefractario	1b	C

- **Fármacos biológicos**

Las dificultades del tratamiento de la colitis ulcerosa ya fueron perfectamente resumidas en 1950 (48), 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 (49). Aunque en algunos centros se había empezado a utilizar la salazopirina, el cambio fundamental en el tratamiento derivó de la demostración de Sidney Truelove, de que la hidrocortisona era muy eficaz en el tratamiento de los brotes agudos (38).

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 (50). 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 la EII. 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 (51).

Por otra parte, aunque las posibilidades teóricas son muchas, desde un punto de vista clínica solo tienen interés aquellos biológicos que han alcanzado la fase II de investigación clínica (52,53).

Tabla 5. Fármacos biológicos

Diana	Sustancia	Laboratorio	Fase de desarrollo	Aprobación
TNFα	Infliximab	MSD	IV	FDA/EMA 2007
TNFα	Adalimumab	Abbvie	IV	2011
TNFα	Golimumab	MDS	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	Rituximab	Roche	III	No

V. Prevención de la recidiva

El medio ambiente juega un papel determinante en el desarrollo de esta enfermedad. Tiene una importante influencia en la microbiota intestinal y podría también influir en la respuesta inmune del huésped y en la integridad de la barrera epitelial. En la actualidad la enfermedad no tiene cura, y las estrategias de manejo van dirigidas hacia el uso de agentes farmacológicos, por una parte, para el tratamiento de la enfermedad activa y por otra, para el mantenimiento de la remisión clínica y así prevenir la aparición de la actividad inflamatoria.

Los factores medioambientales pueden influir en la aparición de la enfermedad de tal manera que la modificación, en la medida de lo posible, de los mismos, constituiría una estrategia de prevención.

FACTORES MEDIOAMBIENTALES

Los múltiples estudios realizados en Europa y el norte de América indican el aumento de la incidencia y prevalencia de la EII en las últimas cinco décadas. Por otra parte, las regiones del mundo que experimentan un reciente aumento de incidencia son muy distintos de las clásicas regiones de alto riesgo de Europa y el norte de América (54). Los inmigrantes de zonas de baja incidencia a zonas de alta incidencia, en una o dos generaciones adquieren el riesgo de la enfermedad del área donde residen. Las tasas de concordancia en gemelos homocigóticos son del 10-35% (55) y la herencia se explica en un tercio de los casos de la enfermedad. Todo ello sugiere que los factores medioambientales son significativos en el desarrollo de la enfermedad y demuestra no solo la importancia de estos factores en la patogénesis de la misma, si no que la modificación de los mismos, podría tener un papel en la prevención y en la mejoría de la historia natural de la enfermedad ya establecida (56).

Hasta ahora han sido muchos estos factores implicados, sin estar aclarado el mecanismo fisiopatológico de los mismos. De ellos, el tabaco, la apendicectomía y el uso de anticonceptivos han sido implicados. El tabaco ha demostrado ser un factor de riesgo para la EC y ser protector para la CU (57). La apendicectomía parece ser protectora en la CU si ocurre antes de los 20 años. Hay otros factores que han sido estudiados, como la higiene, la dieta, el uso de antibióticos, la lactancia materna, el estrés, pero los resultados no han sido concluyentes. Ninguno ha demostrado su asociación con la enfermedad de forma concluyente (58). Los factores implicados más representativos son:

- **Tabaco**

Es el factor de riesgo más establecido en la EII. En la CU el hecho de no fumar aumenta el riesgo de desarrollar una CU en un 1,7 frente a los fumadores. Y el exfumador tiene incluso un mayor riesgo que el no fumador, con más brotes, más diarrea y más ingresos hospitalarios, y este efecto puede durar 10 años después del cese del fumar (59).

El tabaco se comporta como factor protector en el desarrollo y posterior evolución clínica.

En la EC, ser fumador se ha identificado como factor de riesgo, asociado directamente con la aparición de la enfermedad, peor evolución clínica, mayor número de brotes, más ingresos hospitalarios, mayor necesidad de tratamiento inmunosupresor y mayor riesgo de recurrencia postquirúrgica, comparándolo con los no fumadores, o exfumadores (60). El mecanismo exacto de este efecto no está aclarado (61,62). Se podría explicar en parte por el efecto de los componentes del humo del tabaco en respuesta al estrés oxidativo en las células mononucleares, relevantes en la patogenia de esta enfermedad (63).

- **Apendicectomía**

Realizada antes de los 20 años, se comporta como factor protector para el debut de la CU, según demuestran múltiples estudios. El mecanismo por el que actúa como protector se debe a dos posibilidades. Por una parte, es posible que la apendicectomía provoca una alteración de la microbiota intestinal que protege de la CU. Y en segundo lugar, una microbiota distinta en el apéndice en el contexto de una apendicitis (64-66).

Esto sugiere que la composición de la microbiota predispone a la apendicitis, que podría proteger de la CU. En el seguimiento de la EII, se ha descrito mejor evolución clínica, menor riesgo de colectomía y una menor utilización de tratamientos esteroideos e inmunosupresores, en pacientes diagnosticados de CU tras apendicectomía. En la EC los resultados no son concluyentes.

- **Dieta**

Un mecanismo por el que la dieta puede influir en el riesgo de EC y CU es a través del efecto sobre la microbiota intestinal. Modificaciones dietéticas podrían cambiar la microbiota intestinal apoyando la hipótesis de que las alteraciones en la dieta podrían influir en la enfermedad (67,68).

La asociación entre la dieta y la EII sigue siendo una de las asociaciones más difíciles de estudiar debido a su variabilidad en el tiempo y a la dificultad en el seguimiento a través del curso de la infancia y de la vida adulta (69-71).

En el momento actual no hay suficiente evidencia científica para establecer una relación directa entre dieta y EII (72). Se sugiere que la dieta procesada está asociada con incremento del riesgo de EC y posiblemente de CU. Se han implicado en algunos estudios factores de riesgo dietéticos como:

- hipersensibilidad a las proteínas de la leche de vaca, especialmente en la CU.
- dieta rica en azúcares refinados. Aunque la asociación no está claramente establecida (70,71).
- dieta rica en fibra, sobre todo fruta, está asociado con descenso del riesgo de EC pero no de CU (73). La ingesta de fibra podría mantener la integridad de la barrera intestinal y reducir la translocación de bacterias potencialmente patógenas, como *E. Coli enteroinvasivo* (74).
- dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados se ha correlacionado con disminución del riesgo de CU, mientras que la dieta rica en ácidos grasos saturados está asociado con mayor incidencia de CU (75).
- ingesta de alta cantidad de proteínas sobre todo de origen animal está asociada con la EII (76).

- **Vitamina D**

Se ha atribuido a la vitamina D un papel inmunológico diferente al del metabolismo del calcio en relación con los huesos (77). Por una parte, la incidencia de la EII es más alta en latitudes norte y por otra existen variaciones geográficas en cuanto a la incidencia, siendo mayor en zonas de escasa exposición a radiaciones UV. Los niveles elevados de vitamina D en plasma, se han asociado con menor riesgo de EII (78). También los niveles elevados de vitamina D en la dieta están asociados con menor riesgo de EII. Pero la vitamina D no solo influye en la incidencia. Los niveles elevados en plasma están relacionados con un menor riesgo de cirugía y un menor número de hospitalizaciones tanto en EC como en CU (79), así como menor riesgo de recaída (80). El efecto no solo aparece restringido a la actividad inflamatoria, sino que está también demostrado que los niveles bajos de vitamina D en plasma podría incrementar el riesgo de cáncer, sobre todo cáncer colorrectal e infección por *Clostridium difficile* (81).

- **AINEs**

La disrupción de la barrera epitelial intestinal asociada con la aspirina y los AINEs, pueden afectar a la interacción entre la microbiota intestinal y las células del sistema inmune de la mucosa intestinal. Además alteran la agregación plaquetaria y liberan mediadores de la inflamación que son clave en la patogénesis de la EII. Existe evidencia que sugiere reactivaciones de la enfermedad en pacientes tratados con AINE, probablemente por una reacción de tipo idiosincrásico, pero los datos disponibles no son completamente concluyentes (82).

- **Anticonceptivos orales**

Numerosos estudios epidemiológicos han valorado la relación entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollar EC. Constituyen otra medicación que podría tener efecto en la disrupción de la barrera epitelial intestinal o en la respuesta inmune del huésped (83).

- **Factores psicológicos**

Existen estudios que demuestran asociación entre el estrés, la ansiedad, la depresión y riesgo de aparición de EII (84). También está asociado con el incremento del riesgo de recaída y de cirugía (85). El mecanismo de este efecto es desconocido. La respuesta inflamatoria al estrés, con incremento de los niveles de IL-6 podría estar aminorada en ratones mediante la administración de antibióticos, lo que sugiere que la influencia del estrés en la microbiota intestinal podría ser un mecanismo que lo explique (86,87). Es interesante la influencia del sueño en esta enfermedad. Se ha demostrado que la reducción de la calidad del sueño durante la remisión, está asociado con incremento del riesgo de recaída a los 6 meses en la EC. Y la reducción o el incremento de horas de sueño con un incremento del riesgo de CU (88).

- **Infecciones**

Algunas infecciones entéricas se han reconocido como desencadenantes claros de recaídas de la EII, en particular, la infección por *Clostridium difficile* (89,90).

Las infecciones por *Salmonella* y *Campylobacter* se han asociado a mayor riesgo de EII (91,92).

- **Microbiota**

La teoría de la mejora de la higiene debida a una menor exposición a microorganismos patógenos o no patógenos en los niños, con la consecuente disminución de infecciones ha sido implicada como una posible causa de la EII (93). Es conocido que las interacciones bacteria-mucosa intestinal desempeñan un papel importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune. Si esta interacción no es adecuada, la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar. Las bacterias comensales del tracto entérico constituyen la diana a la que se enfrenta el sistema inmune y, por tanto, el estímulo que desencadena y perpetúa los fenómenos inflamatorios que destruyen la mucosa. Aunque se han estudiado múltiples gérmenes en la etiopatogenia de la EII, ninguno de ellos ha logrado demostrar su papel patogénico en la misma (93). Los cambios en la microbiota intestinal que ocurren en la EII, podrían ser resumidos en tres puntos:

-Existe una disminución de la diversidad de la microbiota que ocurre antes del diagnóstico por lo que no es consecuencia de los tratamientos usados en el manejo de la enfermedad (94-96).

-Hay fenotipos de enfermedad, como EC ileal que están asociados con incremento de la aparición de bacterias patógenas con *E. coli enteroinvasiva* (97).

-Hay una reducción de grupos de bacterias con efecto antiinflamatorio, como *Faecalibacterium prausnitzii* (98,99).

La reducción de estas bacterias está asociada con incremento del riesgo de recurrencia endoscópica después de una resección en la EC.

Una herramienta para la prevención de la enfermedad podría ser la manipulación de la microbiota en respuesta a agentes externos.

FÁRMACOS

Los fármacos empleados para la prevención de la recidiva de la enfermedad ya existente tienen como objetivo el mantenimiento de la remisión de la misma. En un estudio realizado con

1575 pacientes con CU, el 13% no tenían recaídas, el 74% tenían 2 recaídas y el 13% tenían recaídas a los 5 años después del diagnóstico (100).

Mesalazina oral es el tratamiento de primera línea para el mantenimiento de la remisión, reduciendo el riesgo de recaída en un 50% (101,102).

El mantenimiento con mesalazina podría tener un beneficio en quimioprevención con un 50% de reducción de cáncer colorrectal (103).

Otros estudios no han confirmado este valor o solo muestran una tendencia a la reducción del riesgo de cáncer quizá porque el cumplimiento de la terapia varía (104).

El mantenimiento en pacientes que recaen con mesalazina, podría realizarse con tiopurinas. Sin embargo, Infiximab parece ser más eficaz en pacientes con tratamiento refractario (105).

No está claro si la combinación de tratamiento de azatioprina e infliximab es mejor que la monoterapia en pacientes con CU, pero no hay razón por la cual los resultados deberían ser diferentes a la EC.

Se recomienda el tratamiento con azatioprina y mercaptopurina en los pacientes que sufren frecuentes o precoces recaídas mientras están recibiendo tratamiento con mesalazina a las dosis correctas o a aquellos que no toleran este fármaco, en los pacientes corticodependientes, en los que se ha logrado la remisión con ciclosporina, tacrólimus y corticoides intravenosos.

En los pacientes que hayan alcanzado remisión con infliximab, se recomienda continuar con este tratamiento de mantenimiento. En los que eran naïve a azatioprina cuando se inició el tratamiento con infliximab para inducir la remisión, el mantenimiento con azatioprina puede ser una alternativa al tratamiento de mantenimiento con infliximab. Se recomienda combinar infliximab con un inmunosupresor durante al menos 6 meses para disminuir la inmunogenicidad.

Los probióticos pueden ser una alternativa a mesalazina para el mantenimiento de la remisión.

En cuanto a la duración del tratamiento de la remisión, en el caso de los inmunosupresores o de infliximab, no se puede establecer ninguna recomendación por falta de

evidencia científica. Se plantea la administración prolongada si fuera necesario.

En el caso de mesalazina se recomienda el tratamiento a largo plazo puesto que puede reducir el riesgo de aparición de cáncer colorrectal.

2. MODELOS EXPERIMENTALES DE COLITIS ULCEROSA

La gravedad y la prevalencia de la EII 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 etiopatogenia 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

Actualmente 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 (106). 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:

1. Inducción química.

Esta clase de modelos, gracias a su sencillez y su demostrada eficacia y eficiencia, han sido los más ampliamente utilizados (107).

- **Colitis inducida por Dextrano sulfato sódico (DSS)**

Este modelo experimental, descrito inicialmente por Okayasu et al, es uno de los más comúnmente empleados (106).

El DSS ha demostrado inducir una colitis autolimitada en varias especies de roedores como ratas, hámsters, 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 (107).

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 (108). 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 C57BL/6 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 (107).
- 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 (107).

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 (107,109).

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.

Adicionalmente, es importante mencionar que la administración a largo plazo de DSS induce la aparición de cáncer colorrectal siguiendo una secuencia displasia-carcinoma similar a la que acontece en la tumorigénesis del cáncer colorrectal en pacientes con CU.

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 colon 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 nos han impulsado a su elección como modelo a emplear en nuestro estudio.

- **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 TBNS disuelto en etanol al 50 % observaron que se producía una inflamación y ulceración del colon 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 colon con aparición parcheada de úlceras con infiltración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, mastocitos, fibroblastos y formación de granulomas. Se induce una respuesta inflamatoria de tipo principalmente Th1 (y quizás Th2) (110).

- **Colitis inducida por ácido acético**

MacPherson y Pfeiffer 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 (111).

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 han favorecido su uso en multitud de experimentos (112).

- **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 sulfhidrúlicos 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 sulfhidrilo de forma separada, yodoacetamida y N-etilmaleiamida. 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 colon y un daño inflamatorio con un patrón histológico similar a la CU en el humano (113).

- **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 (114).

2. **Colitis en ratones knock out (KO)**

Este subgrupo engloba a más de una treintena de modelos. 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 -/- (106).

3. **Modelos espontáneos de colitis**

En 1994 Sundberg et al. desarrollaron una nueva subcepa de ratón en la que, de forma espontánea, aparecía una colitis (115). 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 (116).

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 (112).

4. **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 (112).

5. **Modelos de transferencia adoptiva**

CD 45 es un glicoproteína transmembrana con actividad tirosinfosfatasa presente en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas. 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 y pérdida de peso en un plazo de 5-8 semanas (117).

6. **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 7 (118).

7. **Modelos Knock in (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 K (106).

3. CARDIOTROFINA 1, CITOCINA 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 (119). 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) (120) 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 citocinas gp130 por presentar en su complejo de receptores, una subunidad común, la glicoproteína 130 (gp130), encargada de transducir 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 (121) en el organismo y están involucradas en una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo respuesta inmune, inflamación,

desarrollo neuronal y hematopoyesis (122). 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. (123).

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 asociado a fibrosis cardiaca, renal y vascular, con daño estructural y funcional en el corazón, aorta y riñón (124).

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 citocinas 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 (125).

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 (126).

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 ó gp80R, es la subunidad α específica de la citocina, 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

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.

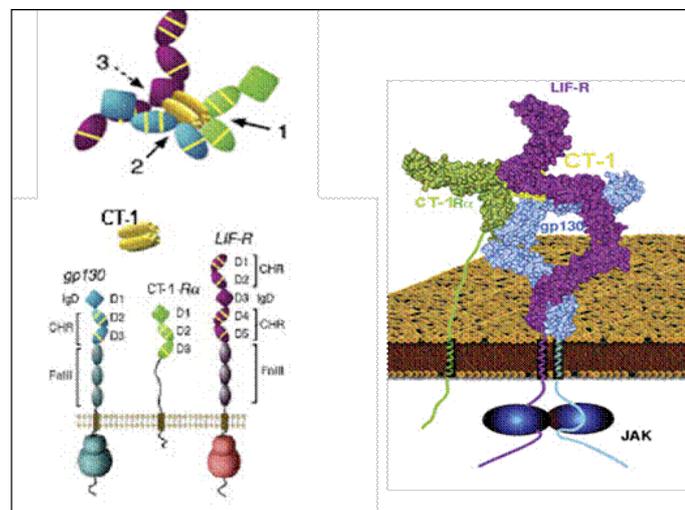


Figura 7. La CT-1 se une a un complejo trimérico de receptores para activar la cascada de señalización, formado por los receptores: gp130, CT-1R α , LIFR β .

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 (127).

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.

VÍAS 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 los STATs induce el reclutamiento del factor de transcripción STAT3 (128).

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

El reclutamiento de un único grupo de STAT para cada familia de receptores de citocinas supone un hecho crítico para definir la especificidad de la respuesta biológica. Algunos receptores de citocinas 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 (129).

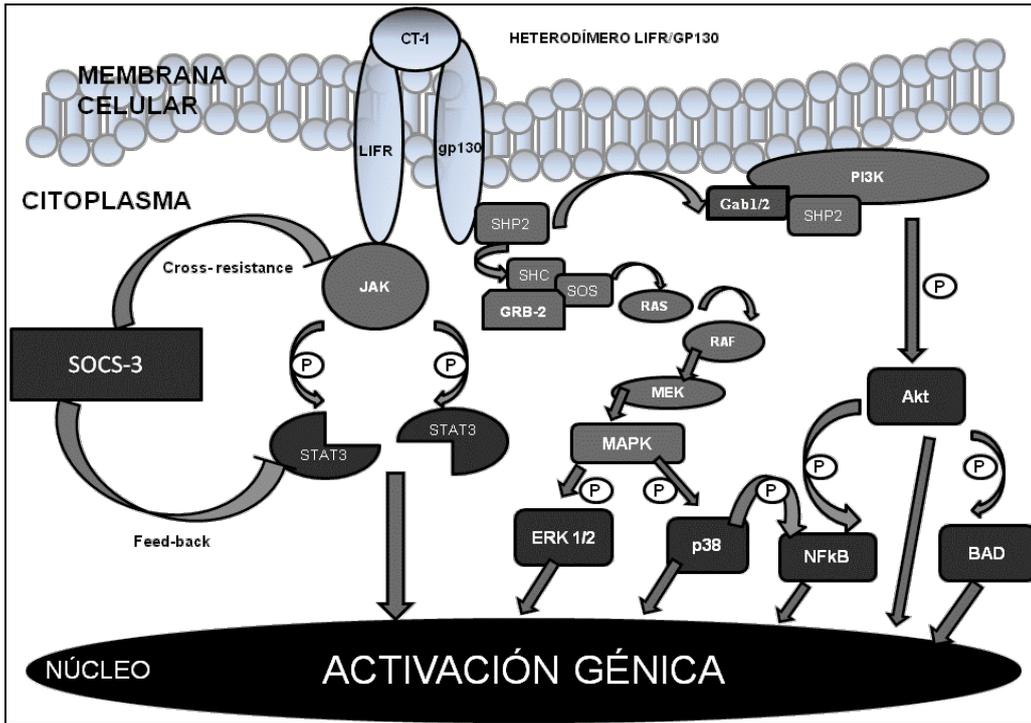


Figura 8. Receptor de CT-1, compuesto por heterodímero LIFR/gp130 y las vías intracelulares activadas por CT-1.

Cuando STAT1 ó STAT3 se une a los receptores (LIFβ 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. Una vez defosforilados en el núcleo, se inactivan y vuelven al citoplasma (130). Figura 9.

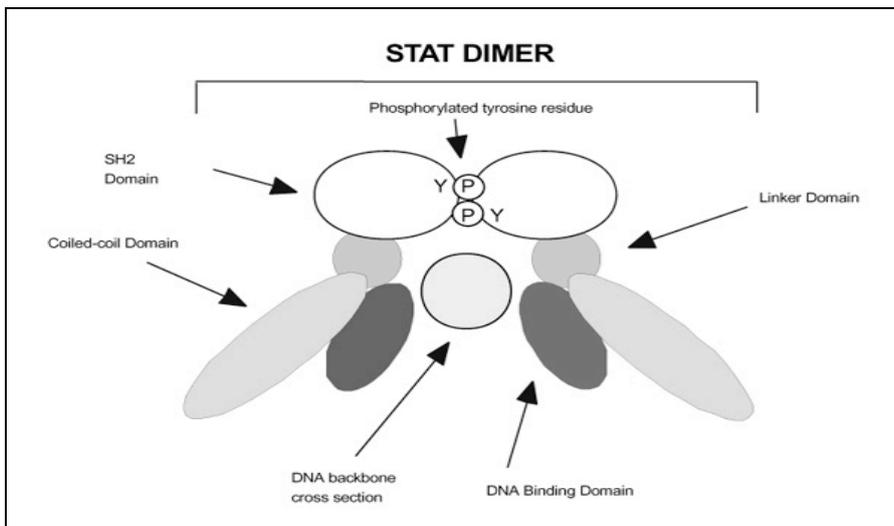


Figura 9. Interacción del dímero con el ADN

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 (131).

Existen 3 familias principales 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).

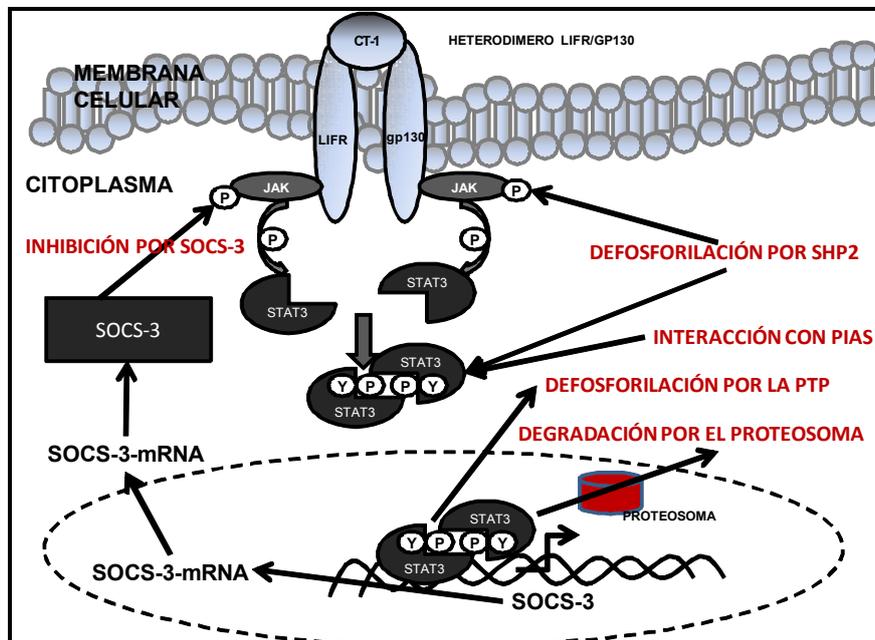


Figura 10. Regulación negativa de la vía JAK/STAT. Representación esquemática de algunas de las vías de regulación de la vía JAK/STAT. Las JAK cinasas pueden ser reguladas a distintos niveles: proteínas SOCS, PTP (proteínas tirosinas fosfatasas) y mediante degradación mediada por conjugación con ubiquitininas.

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 (132). 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-IL-6 (factor nuclear IL-6), un factor involucrado en la señal de traducción de citocinas (133).

PI3K-Akt

Otra de las vías de señalización activada por la CT-1 es la PI3K-Akt (fosfatidil inositol 3 cinasa/proteína cinasa (134).

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 (135) y fibrosis renal (136). También está involucrada en crecimiento celular, proliferación y apoptosis.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU IMPLICACIÓN

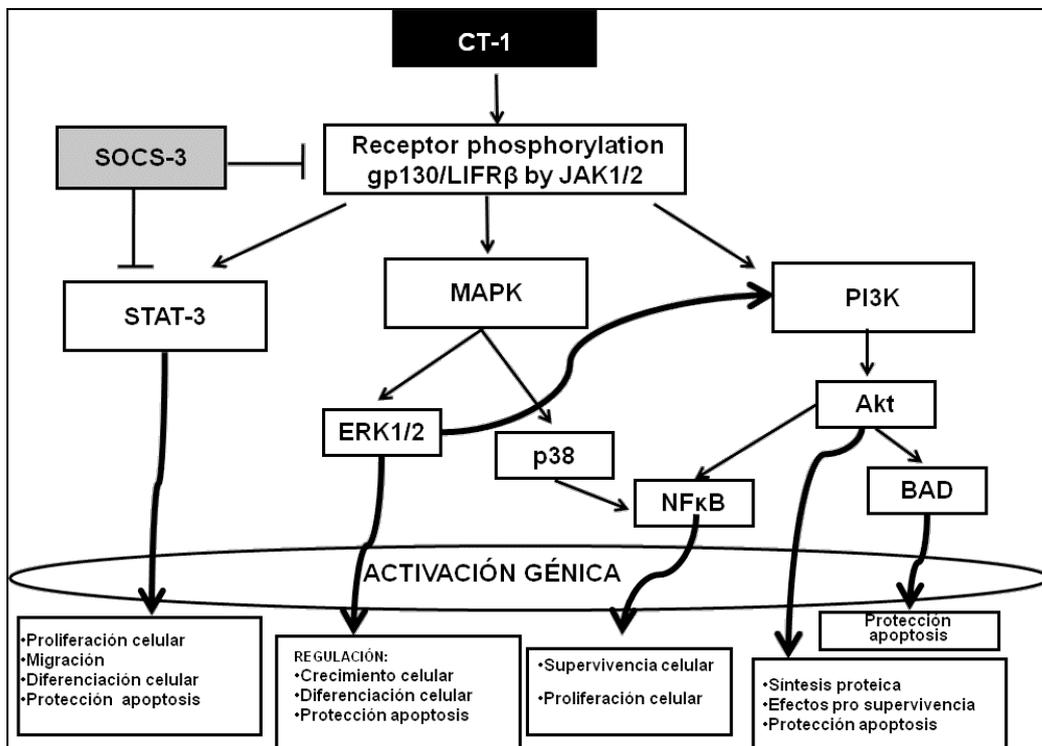


Figura 11. Vías de señalización activadas por la CT-1.

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 (106,137-143). Figura 11.

La vía JAK/STAT transduce señales de protección contra la respuesta inflamatoria (144), protege de la isquemia (145) y del estrés oxidativo (146).

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 (147,148).

También, se ha demostrado que CT-1 activa NF- κ B en cardiomiocitos (149), hepatocitos (150), células endoteliales de la vena umbilical (151), células epiteliales renales y neuronas sensoriales (152).

MECANISMOS DEL EFECTO PROTECTOR CELULAR DE LA CT-1

El efecto protector de CT-1 en los tejidos dañados por isquemia o por daño no isquémico 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 (153).

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 (154). Esta citocina también podría tener efecto protector en el daño celular por isquemia (155). La acción protectora de la CT-1 sobre la apoptosis depende de la activación de NF- κ B y de la expresión de genes antiapoptóticos.

En el hígado el efecto protector de la CT-1 después de una hepatectomía está asociado con la activación de NF- κ B. La inhibición de NF- κ B por IL10 disminuye el daño hepático por isquemia.

La traslocación de p65 NF- κ B al núcleo, induce la expresión de genes pro y anti-apoptóticos. La inhibición de la activación del NF- κ B reduce la liberación de TNF- α y la apoptosis (156,157).

- ✓ Metabolismo energético: CT-1 estimula el metabolismo mediante la vía de la activación de la protein cinasa dependiente de monofosfato de adenosina (AMPK) (158).
- ✓ 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. Además produce proliferación de miocitos cardíacos. 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.

EFFECTOS DE LA CT-1 SOBRE LOS ÓRGANOS

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

Efectos en el corazón

En el corazón, la CT-1 es sintetizada fundamentalmente por los cardiomiocitos y secretada hacia la circulación periférica (159).

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 (160), y la administración crónica de la CT-1 incrementa el peso del corazón y el ventricular (161,162).

Efectos cardioprotectores:

- Hipoxia del miocardio:

Se ha demostrado un aumento de la expresión de CT-1 en diversas situaciones fisiopatológicas de hipoxia cardíaca, como angina de pecho, infarto cardíaco e insuficiencia cardíaca y parece proteger del mismo (161).

Durante el infarto de miocardio aumenta la producción de RLO (163) 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 (164).

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- κ B, 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* (165).

En modelos de ratas con isquemia de miocardio, la CT-1 juega un papel muy importante en la reparación del tejido y su cicatrización (166).

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 (167).

-Hipertrofia cardíaca:

La CT-1 se aisló en 1995 basada en su capacidad de causar hipertrofia en cultivos de miocitos cardíacos (119). 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 (168-172).

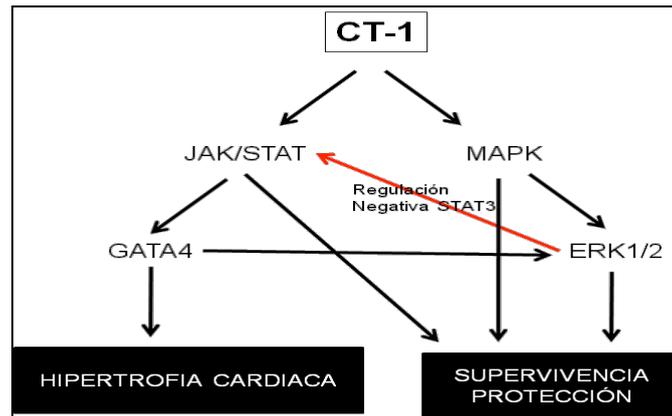


Figura 12. Vías de señalización por las que CT-1 ejerce sus efectos sobre la hipertrofia y supervivencia cardíacas.

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 (173).

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 cardíaco asociado con un incremento concomitante en la frecuencia cardíaca.

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 (174).

Efectos 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, tanto en humano adulto como en feto (175).

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 músculo liso en daño de la vía respiratoria (176).

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 (177).

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 (178).

Efectos 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 (179).

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 (140).

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 (1.4 g/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 (180).

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 (150).

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 (180,181).

Efectos 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 , IL1 β , INF γ , la menor activación de NF-k β y la reducción de la apoptosis. Esto indica que CT-1 podría usarse como estrategia terapéutica para proteger al riñón de la isquemia/reperfusión (182).

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 (183).

Efectos 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 relacionado con los elevados niveles de CT-1 en plasma en pacientes con síndrome metabólico (184).

Un grupo de investigadores observó que los animales que carecían de CT-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 CT-1 refuerza la acción de la insulina, lo que facilita la entrada de glucosa en las células y hace descender la glucosa en sangre (185).

Efectos en el tejido neural y sistema neuromuscular

CT-1 es la única citocina 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 cefalorraquídeo. 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 (186).

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 (187,188).

Efectos 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 (189).

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La CT-1 tiene un efecto modulador de la respuesta inflamatoria en la CU. Por lo tanto, la administración de CT-1 en un modelo murino de colitis inducida por la administración de DSS, prevendría el daño funcional, estructural y la inflamación que se asocia a este modelo experimental de colitis.

OBJETIVOS

- El objetivo general de este estudio es analizar si la CT-1 puede servir como terapia para prevenir 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 preventiva de CT-1 (antes de inducir la colitis) en:
 - a) la clínica de la enfermedad: diarrea, sangrado, pérdida de peso, etc.
 - b) 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.
 - c) las alteraciones en la translocación bacteriana inducidas por la enfermedad.
 - c) la reacción inflamatoria que se produce en el colon: niveles plasmáticos y expresión en tejido colónico de citocinas (TNF α , INF- γ , IL-6, IL-10 e IL-17), marcadores de inflamación (activación de NF- κ B, iNOS, pSTAT3, mieloperoxidasa, etc.) y expresión de CT-1.

III.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS

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.

2. MATERIALES

I. INSTALACIONES

- Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, que proporcionó los animales de experimentación empleados en este estudio y donde permanecieron durante el mismo.
- 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:

o Laboratorio 1 para trabajo con animales de experimentación, dotado de instalación fija de aire acondicionado y renovación del mismo, zonas de estabulación, mobiliario y elementos necesarios para la realización de modelos experimentales quirúrgicos desarrollados en la Tesis Doctoral.

o 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 e instrumentos necesarios para la realización de los estudios de: Wester Blot, PCRs y ELISAs.

o Seminario para mantener reuniones de trabajo, dotado de sistema informático y de proyección, fijos, y mobiliario adecuado para tales fines.

o 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.

II. 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/ 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	
Termodesinfector	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	Miniprotein/ Protean-xi cell
Termodesinfector	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

3. MÉTODOS

I. 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 CU de los humanos.

Se realizó con la administración oral de DSS (Affymetrix 40.000-50.000 KDa Ref. Cas 9011-18-1) (190). La concentración de DSS utilizada fue del 5%, de acuerdo a:

- Resultados de la bibliografía existente (143,191,192).
- 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 cual es 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 la 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 de la inducción de la colitis, que fue de entre 3 y 6 ml por día, a los que se añade una concentración de DSS al 5% (193).

II. GRUPOS EXPERIMENTALES

GRUPO EXPERIMENTAL PREVENTIVO:

La muestra de ratones empleada para el modelo preventivo fue de 25. Se distribuyeron en los siguientes grupos:

- **Grupo Simulado Sham** (n=5): ratones que tienen acceso *ad libitum* al agua de bebida y a los que se les inyectó suero salino por vía I.V. en los días 1, 3 y 5.

- **Grupo Control DSS** (n=10): ratones que tendrán acceso *ad libitum* al agua con una solución de DSS al 5% y a los que se les inyectó suero salino por vía I.V. en los días 1 (dos horas antes de la administración de DSS) y en los días 3 y 5 tras iniciar la administración de DSS.
- **Grupo preventivo DSS-CT-1** (n=10): ratones que tendrán acceso *ad libitum* al agua con una solución de DSS al 5% y a los que se les inyectó CT-1 (200 µg/kg) por vía I.V. en el día 1 (dos horas antes de iniciar la administración de DSS) y en los días 3 y 5 tras iniciar la administración de DSS.

GRUPO DE RATONES KNOCK OUT (KO) PARA CT-1:

Además del modelo preventivo, se realizó también un estudio en ratones KO para CT-1, con 8 ratones de la estirpe C57BL/6, 4 KO para CT-1 y 4 controles (WT), que se han descrito previamente (194), distribuidos en 2 grupos:

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

III. 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.
 - ✓ 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(195).
- La supervivencia y el peso: los animales fueron 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.

IV. 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. Para el estudio microbiológico se recogieron en condiciones de asepsia, ganglios linfáticos, pulmón y bazo de 5 ratones del grupo control y preventivo y 2 del grupo simulado.

V. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las piezas de colon fueron mantenidas en el fijador durante 24 horas como máximo. Tras ese periodo, fueron lavadas con agua corriente y sumergidas en alcohol al 70% durante toda la noche. Posteriormente, fueron procesadas 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 inmunohistoquímica, 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 100% 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 3µm 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:

AntiCD68, 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.

VI. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Con el estudio microbiológico se pretende conocer la existencia de translocación bacteriana como reflejo del proceso inflamatorio que ocurre en el colon de los ratones del modelo de colitis. Se realiza en 5 ratones del grupo control, 5 del grupo preventivo y 2 del simulado. Esto permitió analizar la translocación bacteriana. Se entiende por translocación bacteriana al paso de bacterias desde el intestino a la sangre, y desde allí a diferentes órganos.

Procesamiento microbiológico:

Se recogieron muestras de ganglios linfáticos, pulmón y bazo de los doce ratones. Estas fueron recogidas en condiciones de esterilidad. El transporte de las mismas al laboratorio de Microbiología y su procesamiento, 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 μ l (0,1 ml) en placas de agar sangre, agar chocolate, agar manitol y agar McConkey, y las placas se incubaron durante 24 h a 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 microorganismos aislados 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.

VII. OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO:

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 de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-citocina adherido en cada uno de ellos para capturar la citocina 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 una 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 cataliza 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 del anticuerpo de captura diluído. 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 del 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 están listas para añadir la muestra. Añadimos 100 µl de muestra o Standards o 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 de anticuerpo de detección, diluído en reactivo de dilución. Cubrimos con una nueva tira adhesiva e incubamos 2 horas a temperatura ambiente. Repetimos el proceso de aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 µl 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 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz directa. Añadimos 50 µl de solución de parada a cada pocillo y movemos la placa con mucho cuidado para que se mezcle bien. Determinamos la densidad óptica midiendo la absorbancia a 450 nm λ . La absorbancia obtenida es proporcional a las cantidades de citocina de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Los kits utilizados para medir la concentración de citocinas en plasma fueron los que aparecen indicados en la tabla 6.

Tabla 6. Kits de ELISA.

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(196).

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 agentes 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. El 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, 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 Scientifics 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).

2 µg de ARN de cada muestra se llevaron 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 Spectrophotometer (Thermo Scientifics 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 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.

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 (Tm, Tabla 7), durante 1 minuto); (iv) una fase de extensión de la hebra por la Taq polimerasa (a 72 °C durante 1 minuto); y (v) una última fase de extensión final que permitía a la enzima sintetizar las hebras inacabadas (72°C durante 5 minutos). Las fases de la ii a la iv se repitieron un cierto número de ciclos (Tabla 7) 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 (Tabla 7).

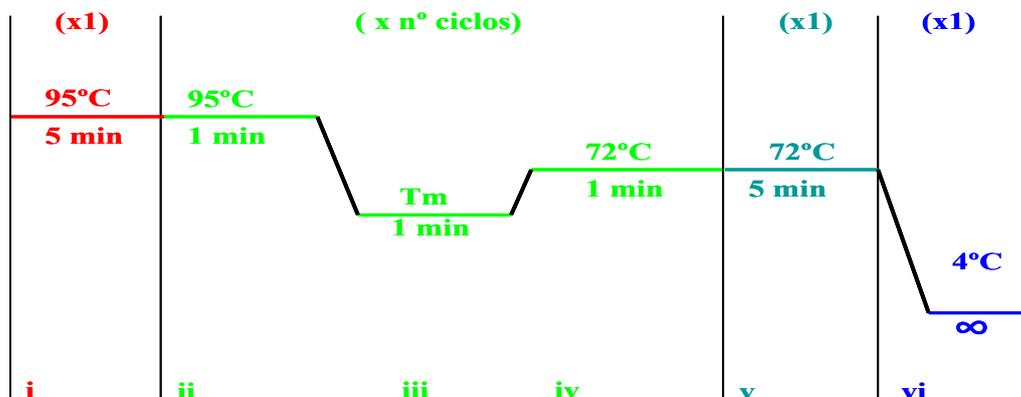


Figura 13.- Esquema de las fases de la amplificación por PCR.

Tabla 7. 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)
TNFα	<i>Fw</i>	AGCACAGAAAGCATGATCCG	212	60
	<i>Rv</i>	CTGATGAGAGGGAGGCCATT		
IFNγ	<i>Fw</i>	TACACACTGCATCTTGGCTTG	128	57,5
	<i>Rv</i>	CTCCACATCTATGCCACTTGAG		
IL-6	<i>Fw</i>	TCCTACCCCAACTCCAATGCTC	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		

Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez realizada la PCR, se cargaron 20 μ L 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 μ g/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 μ L 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 geles en un *transiluminador* (ImageQuant RT ECL imager, General Electric Healthcare).

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

ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA COLÓNICA (MPO)

La presencia de mieloperoxidasa, una enzima específica de los neutrófilos utilizada como índice para valorar la infiltración neutrofílica en el colon, fue analizada en las muestras de colon mediante el método de Bradley (197), modificado por Mullane (198).

Las muestras de tejido colónico congeladas se homogeneizan en una solución compuesta por un tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio y 0,146% de EDTA a un pH de 6,0 y en la proporción de un gramo de tejido por 10 ml de solución de homogeneizado. A continuación son homogeneizadas y sometidas a un proceso de sonicación entre hielo 10 veces y cinco segundos cada vez, para de esta forma romper las células, entre ellas los neutrófilos y dejar la mieloperoxidasa libre en la solución. Este homogeneizado se centrifuga durante 30 minutos a 15.000 g manteniendo la temperatura en el interior de la centrifuga entre 3 y 4º C. El sobrenadante se decanta y se incuba durante 2 horas a 50º C para eliminar otro tipo de peroxidasa y otros compuestos que interfiriesen en la determinación de la mieloperoxidasa. Se prepara el tampón para el ensayo compuesto por tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,167 mg/ml de hidrocloreuro de O-dianisodina y 0,005% de peróxido de hidrógeno a un pH de 6,0. La curva estándar se preparó con cantidades conocidas de MPO a contra un blanco con el tampón de ensayo y se midió la absorbancia en un espectrodotómetro 460 nm de longitud de onda (λ) y a 25º C. Los valores de cantidad de peroxidasa se obtuvieron por interpolación en la curva estándar. Se define la unidad (U) de actividad de la mieloperoxidasa a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de H₂O₂ / minuto a 25º C.

Tabla 8. Kit de ELISA para MPO

Producto	Referencia
Kit ELISA mouse MPO	Hycult Biotech ref. #HK210-02

WESTERN BLOT

Extracción de proteínas de mucosa de colon para *Western Blot*:

Las muestra de colon congeladas se trocean y se toman aproximadamente 100 mg de tejido, a los que se añaden 1000 μ L de tampón de lisis, para la homogenización en Tampón de lisis conteniendo magnesio: MLB (Magnesium-containing Lysis Buffer) 5X (Upstate Biotechnology #20-168)

Tras preparar el tampón de lisis MLB en hielo: MLB 5x (μL), Agua ultrapura (μL), NaCl 150 mM, glicerol 10%, NaF 25 mM, Na_2VO_4 1 mM, PMSF 100 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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. 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(199)

La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Microtest™ 96, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) utilizando 5 μL 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 μL del reactivo A (suplementado con 20 μL del reactivo S por cada mL reactivo A, ya que las muestras contenían detergente: IGEPAL CA-630), posteriormente se añadieron 200 μL 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*:

Fundamento

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(200).

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 la enzima peroxidasa de rábano picante (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(201).

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.

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.

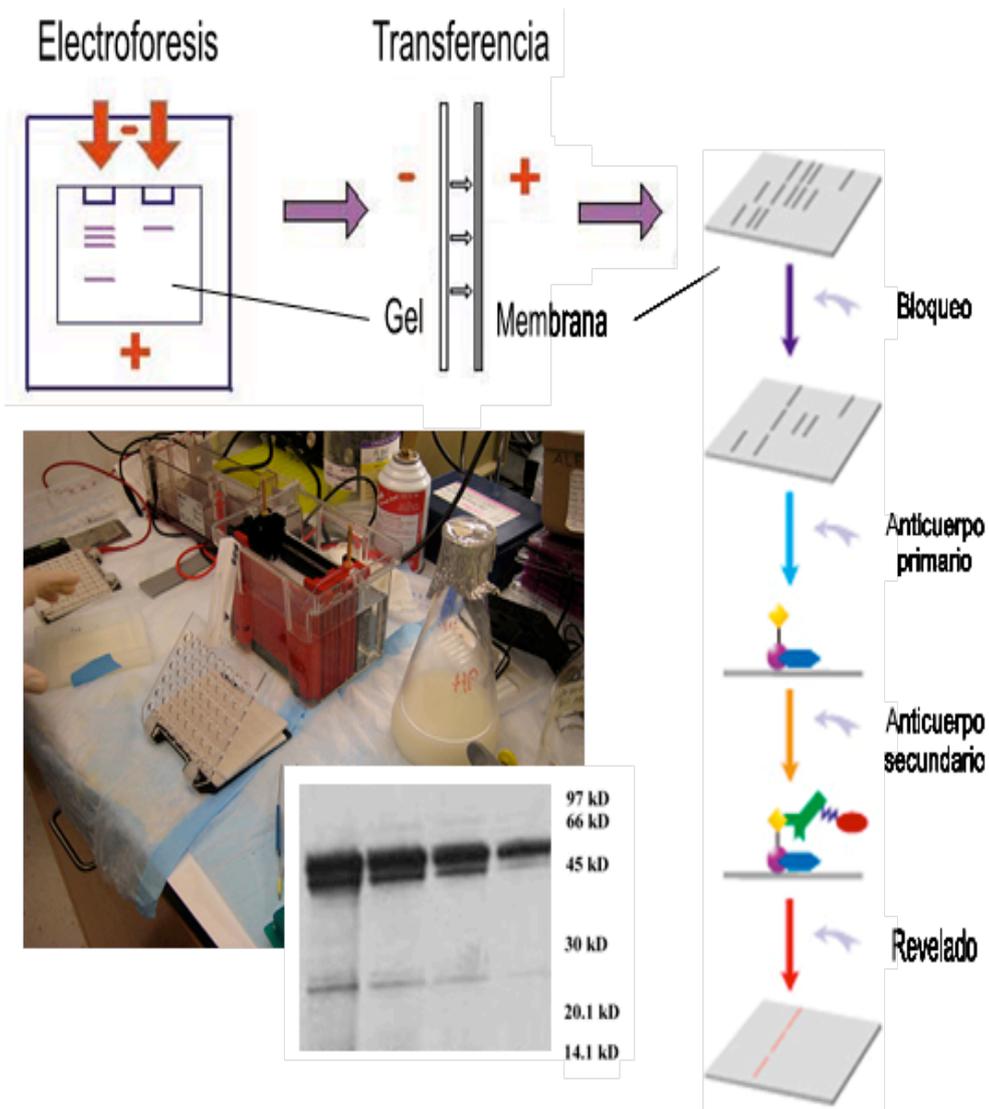


Figura 14. Representación esquemática del sistema de electroforesis.

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° 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 Western Blot de las distintas proteínas a analizar se detallan a continuación (Tabla 9).

Tabla 9. Anticuerpos primarios y secundarios usados en el Western Blot.

ANTICUERPO	PM (kDa)	INCUBACIÓN										CASA COMERCIAL	REFERENCIA
		BLOQUEO		PRIMARIO				SECUNDARIO					
		tiempo	Tª	Dil.	Dvte.	Especie	tiempo	Tª	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

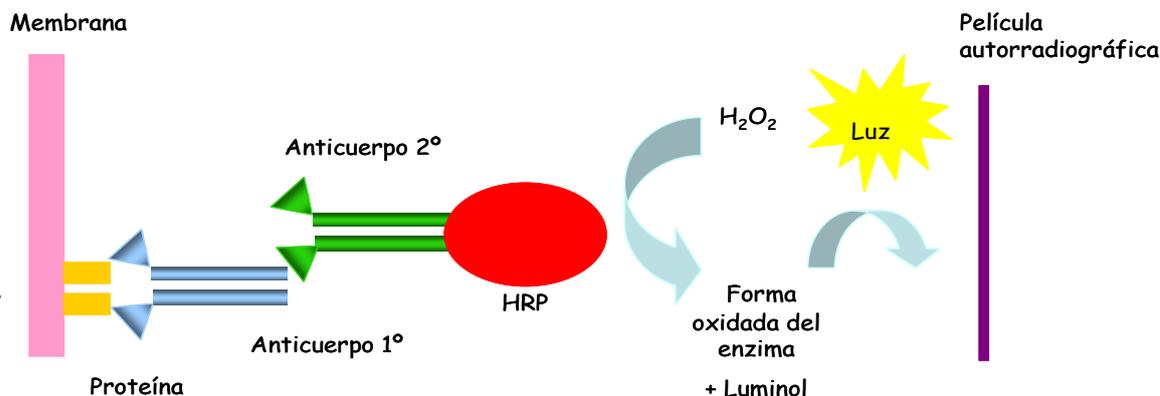


Figura 15. Principio del sistema de detección en el “Western blot”. El anticuerpo primario reconoce a la proteína y se une a ella. El anticuerpo secundario reconoce al primario, y lleva asociada la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produce luz 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

4. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el análisis de las variables clínicas (diarrea 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 (inmunohistoquímica), 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 estudio de las variables moleculares: 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.

IV.- RESULTADOS

1. RESULTADOS CLÍNICOS

El desarrollo de la colitis y su gravedad se evaluaron mediante los siguientes parámetros:

- **Consistencia de la heces:**

En el grupo control, a partir del segundo día de la ingesta de DSS, pero sobre todo a partir del cuarto día, comenzó a verse disminución de la consistencia de las heces en el 60% de los ratones, con heces de consistencia blanda. El día 7, último día del estudio, el 90% tenían diarrea líquida.

En el grupo preventivo, se produjeron cambios menores en la consistencia de las heces, a partir del cuarto día, con deposiciones normales o blandas. El último día del estudio no había ningún ratón en este grupo con heces líquidas.

El grupo simulado no sufrió cambios en la consistencia de las heces. Figura 16.

El estudio estadístico demostró que las diferencias entre los grupos se hacen mayores según pasan los días. En los 4 primeros días no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Los días 5, 6 y 7 se encuentran diferencias significativas entre los grupos (día 5: p-valor= 0,02; día 6: p-valor=0,002; día 7: p-valor <0,0001).

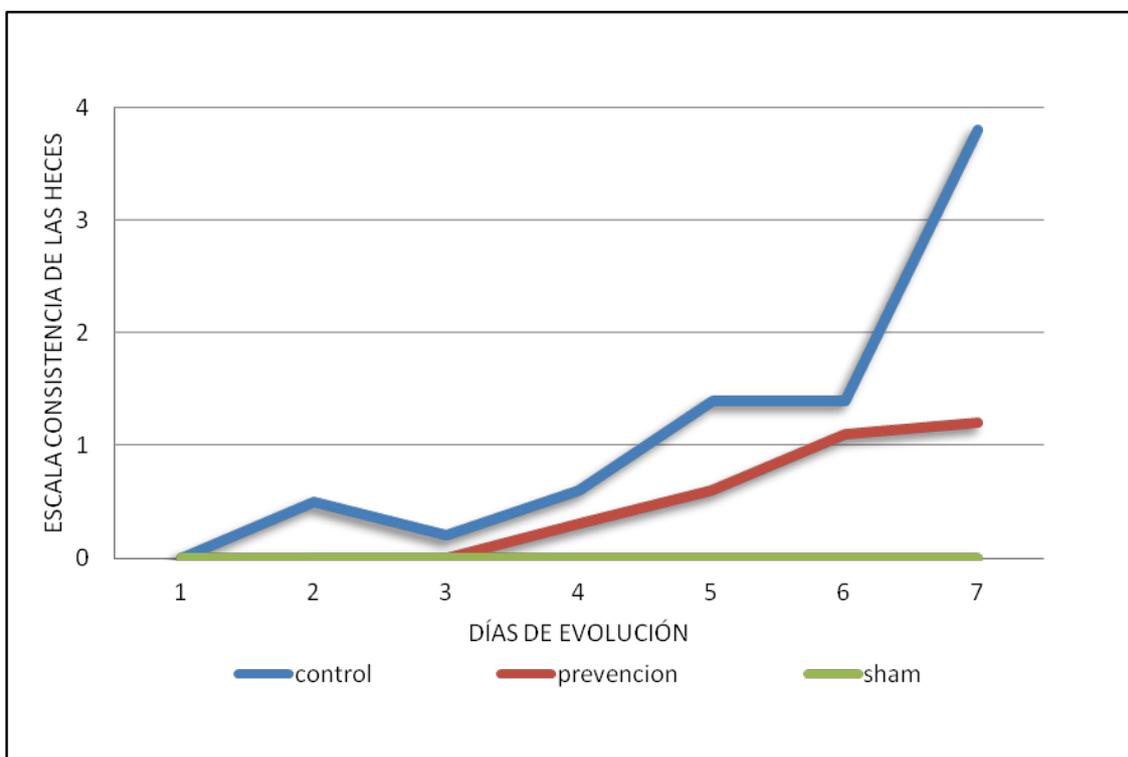


Figura 16. Cambio en las características de las deposiciones a lo largo de los 7 días del estudio.

- **Sangre en las heces:**

En los ratones del grupo control comenzó 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 incrementó durante la monitorización, con sangre abundante el último día del seguimiento en el 90%. Al realizar el sacrificio de los ratones observamos gran cantidad de sangre y heces melénicas en el colon. En el grupo preventivo solo presentó sangrado leve a partir del cuarto día, en el 40% de los ratones. El último día, solo un 20% presentó sangrado importante. El grupo simulado no presentó sangre durante los días del seguimiento. Figura 17.

Hasta el día 4 no se han encontrado diferencias significativas entre los grupos experimentales. Las diferencias significativas al igual que en la diarrea empezaron en el día 5 (p-valor=0,002) y se mantienen el día 6 (p-valor=0,002) y el día 7 (p-valor<0,0006). Si analizamos entre los grupos hay diferencias para estos tres días, se observa que las diferencias están entre el control con respecto a los otros dos grupos.

Se han detectado diferencias altamente significativas entre los diferentes tiempos del grupo control (p-valor< 0,0001). Se observa que dichas diferencias significativas aumentan con el paso del tiempo. Las diferencias aparecen en el día 5 con respecto a los primeros tres días. En el grupo preventivo, las diferencias significativas entre los tiempos aparecieron en el último día.

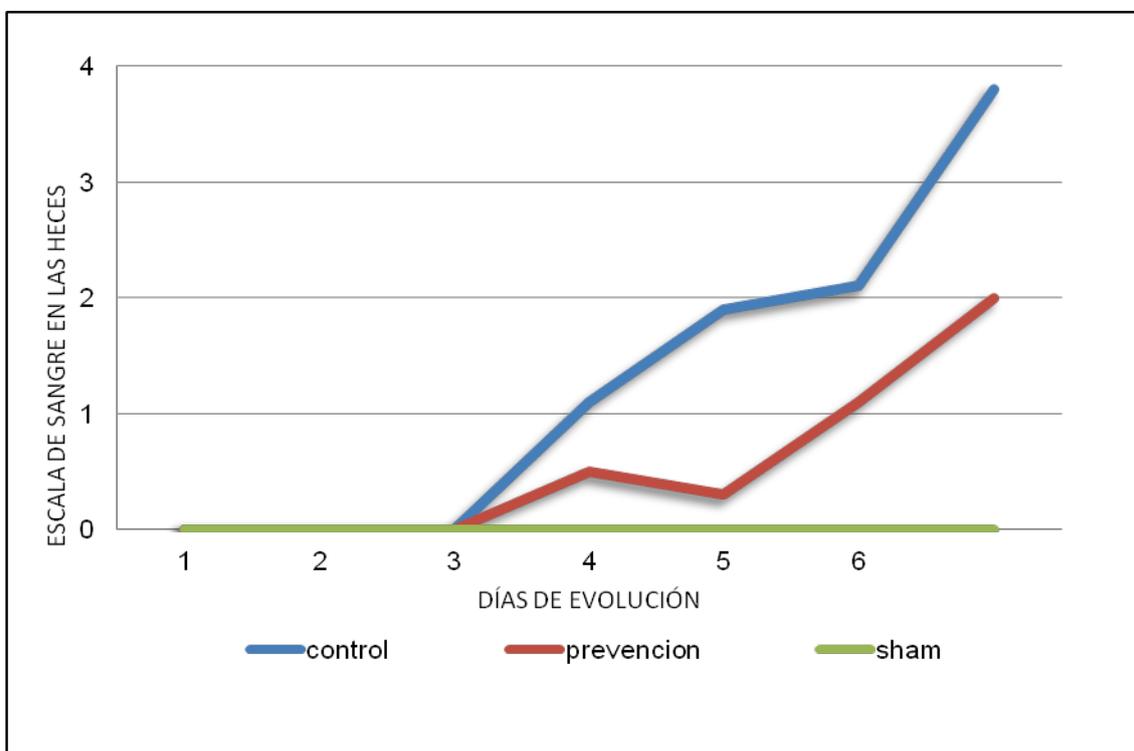


Figura 17. Evolución de la presencia de sangre en las deposiciones a lo largo de los 7 días del estudio.

- **Peso:**

La pérdida de peso que han sufrido de los ratones durante el seguimiento ha sido muy discreta, en torno a un 2% en todos los grupos, incluyendo el simulado. Si analizamos las diferencias entre los grupos experimentales para cada uno de los días no se ha detectado significación estadística. Si analizamos las diferencias entre los días para cada uno de los grupos experimentales, en los tres grupos se detectaron diferencias significativas de la media en el día 7 con respecto al resto de los días. Sin embargo, los tamaños muestrales son muy bajos y por lo tanto, estos resultados deben interpretarse con cautela. Figura 18.

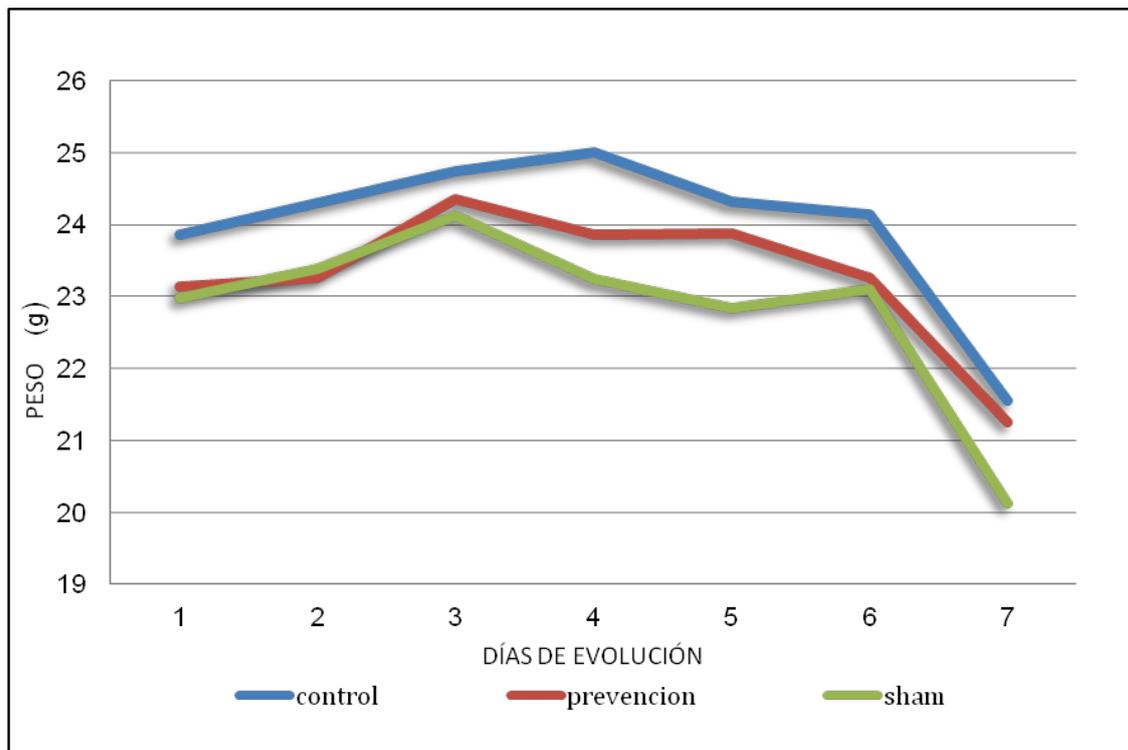


Figura 18. Evolución del peso a lo largo de los 7 días del estudio.

- **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. Esto no fue observado en los grupos preventivo y simulado.

- **Acortamiento del colon:**

No existen diferencias en la longitud del colon entre los distintos grupos. En los animales del grupo control sí observamos una marcada dilatación del colon con presencia de abundante contenido hemático, no viéndose en los del grupo preventivo y simulado.

- **Mortalidad:**

No se produjo la muerte de ninguno de los ratones durante el seguimiento, aunque el último día del estudio se observó una clara diferencia en el estado de los ratones, apareciendo en los del grupo control una importante diarrea líquida con gran cantidad de sangre, postración y ausencia de respuesta a estímulos, mientras que los del grupo preventivo tenían un aspecto y comportamiento normal.

- **Grupo de ratones KO:**

Se estudiaron 4 ratones con inactivación del gen productor de CT-1, de los cuales 2 murieron durante el seguimiento al quinto día de iniciar la ingesta de DSS en el agua de bebida. Los otros 2 ratones de este grupo presentaron diarrea líquida y hemorragia grave desde el día 4, con claras diferencias clínicas con respecto al resto de los ratones.

2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

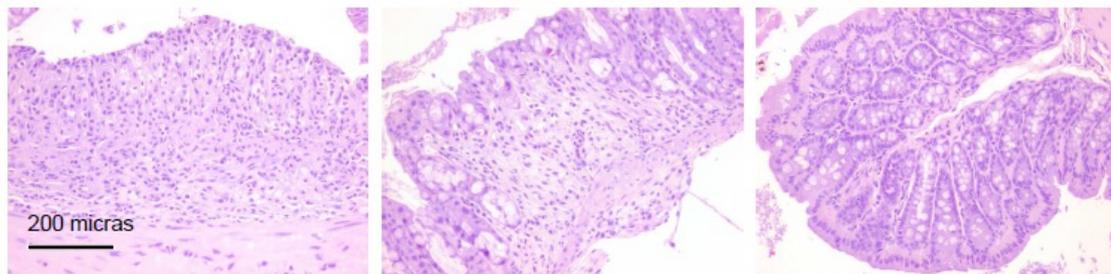
TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

Al observar las muestras histológicas de los animales pertenecientes a los tres grupos de estudio teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina, se observó que:

Los ratones del grupo control desarrollaron un proceso de colitis caracterizado por úlceras focalmente repartidas por la superficie interna del colon que ocupaban todo el espesor de la mucosa, llegando a la lámina propia. En las zonas ulceradas desaparecieron totalmente las criptas y no se conservó prácticamente nada del epitelio ni de las células caliciformes, sustituyéndose por un denso infiltrado inflamatorio y tejido de granulación. En las zonas ulceradas es posible apreciar, igualmente, infiltrado inflamatorio en la lámina propia que llegó hasta las capas musculares. Fuera de las zonas ulceradas, la pared del colon conservó su arquitectura normal sin alteraciones (Figura 19A).

En los animales del grupo preventivo, tratados con CT-1, aunque se apreciaron zonas ulceradas, éstas son mucho menores, tanto en número como en extensión. En muchos casos el epitelio estaba parcialmente respetado y se conservaron zonas de las criptas, así como células caliciformes. El infiltrado inflamatorio fue menor y escaso en la lámina propia. La mayor parte del colon no tenía alteraciones estructurales (Figura 19B).

Los animales del grupo simulado no presentaron alteraciones estructurales, siendo el colon totalmente normal (Figura 19C).



Control (DSS). Figura 19A. Preventivo (DSS+CT-1). Figura 19B. Simulado. Figura 19C.

Figura 19A, B, C. Fotografías representativas de secciones de colon teñidas con la técnica hematoxilina-eosina en los tres grupos estudiados.

Al analizar las muestras de colon de los 2 ratones KO para CT-1 que sobrevivieron, se observaron ulceraciones focales en el colon proximal de uno de los animales, y en el colon distal de los dos ratones, lesiones difusas de todas las secciones efectuadas, ocupando casi toda la circunferencia de la pared, con muy pocas zonas de mucosa conservada. Las lesiones eran claramente más graves que las del grupo control. Figura 20.

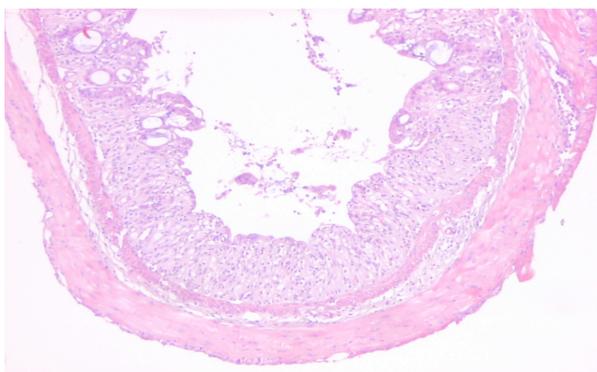


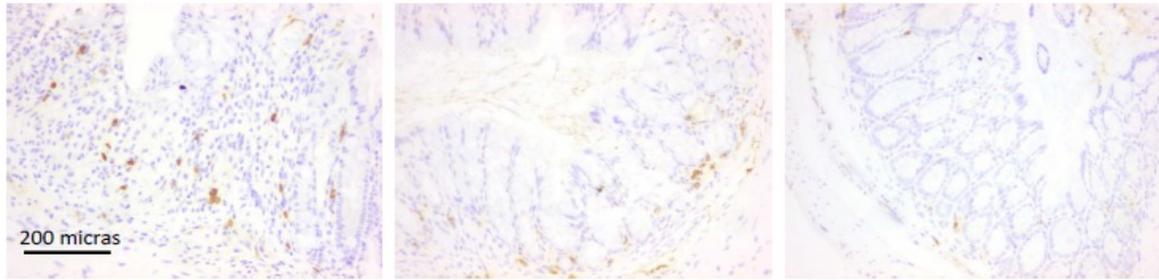
Figura 20. Fotografía representativa de sección de colon distal del grupo de ratones KO teñidas con la técnica hematoxilina-eosina.

INMNOHISTOQUÍMICA

CD68

El análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-CD68 permite conocer la densidad y el patrón de distribución de la población de macrófagos en la mucosa del colon. Los macrófagos participan en la respuesta inmunológica de la inmunidad innata que se encuentra alterada en la colitis ulcerosa. Durante la actividad inflamatoria de la EII existe una pronunciada infiltración de células de la inmunidad innata en la mucosa intestinal.

En los animales del grupo control, que recibieron DSS sin CT-1, se observaron células que expresan CD68 localizadas a cualquier nivel de las zonas ulceradas. En la pared normal también fue posible observar células con expresión de CD68, aunque en menor número. Las células positivas para CD68 se localizan en los espacios intersticiales entre las criptas y en la lámina propia (Figura 21A). Los animales del grupo preventivo, a los que se administró CT-1, presentaron menor número de células positivas para CD68, incluso en las zonas en las que había úlceras, pero la localización fue similar a la descrita para el grupo control (Figura 21B). En los animales del grupo simulado solo fue posible observar de forma aislada células con expresión de CD68, fundamentalmente en la lámina propia, aunque también había algunas células positivas entre las células epiteliales de la mucosa (Figura 21C)



Control (DSS). Figura 21A.

Preventivo (DSS+CT-1). Figura 21C.

Simulado. Figura 21C.

Figura 21A, B, C. Fotografías representativas de secciones de colon teñidas con el anticuerpo anti-CD68 en los tres grupos estudiados.

Cuando se realiza la cuantificación de las células positivas para CD68, se observa que ésta es claramente más alta en el caso de los animales del grupo control, que resulta ser significativa con respecto a los otros dos grupos del estudio (p -valor $<0,0001$). En el caso de los animales tratados con CT-1, si bien se observa un mayor número de células positivas para CD68 con respecto al grupo simulado, ésta no es significativa. (Figura 21D).

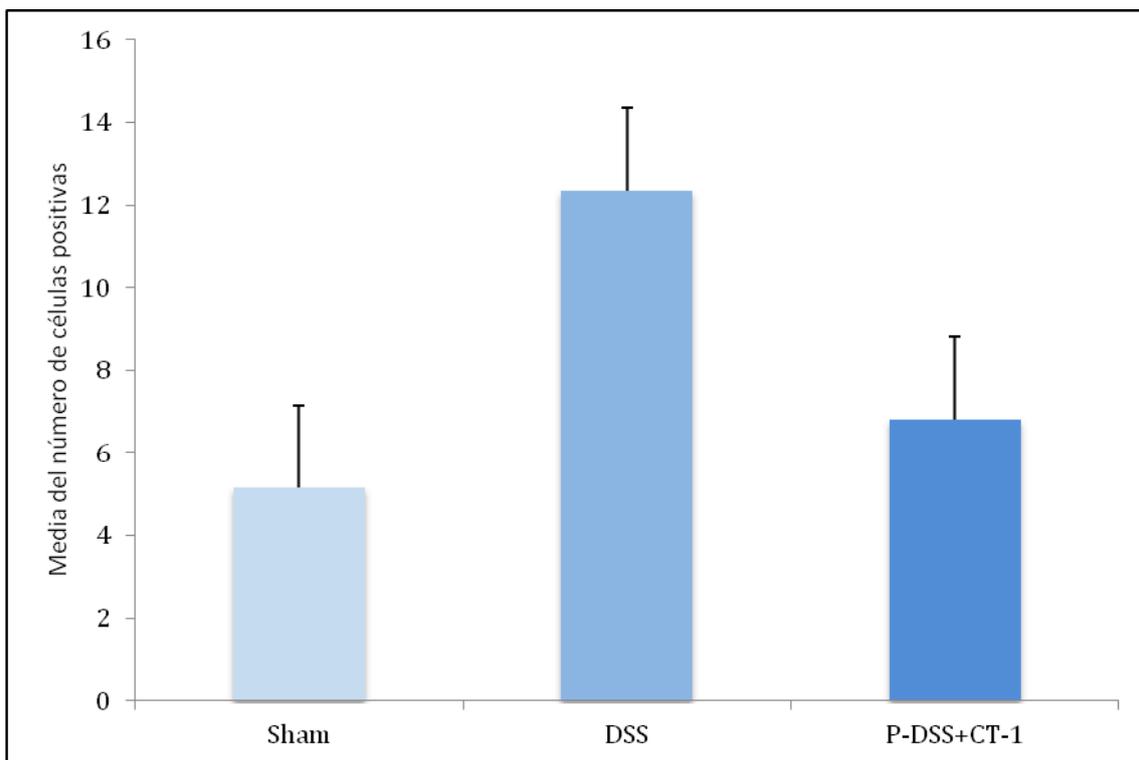
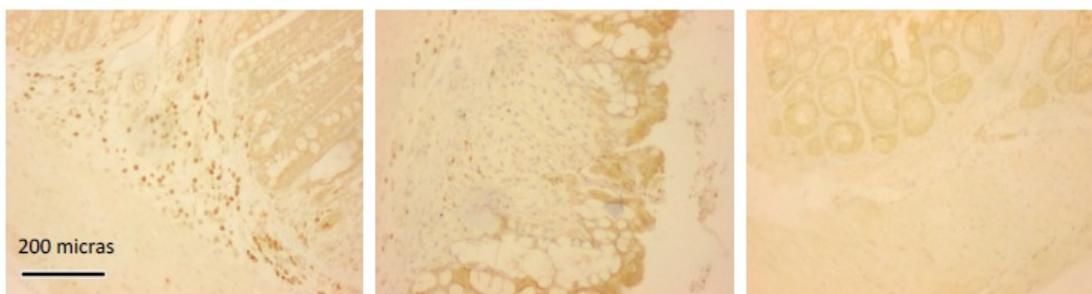


Figura 21D. Inmunohistoquímica. Cuantificación CD68. Los datos son media \pm error estándar de la media.

Caspasa-3

La proteína Caspasa-3 activada se utiliza como un marcador temprano de apoptosis. Es un miembro de la familia de las proteasas que desempeña un papel importante en la fase de ejecución de la apoptosis celular. Las caspasas existen como proenzimas inactivos que se activan mediante un procesamiento proteolítico.

En el grupo control se observó una abundante cantidad de células que expresan Caspasa-3 activada en la lámina propia de las zonas ulceradas. En el epitelio conservado estas células fueron muy escasas (Figura 22A). En los animales del grupo preventivo, la cantidad de células que expresaron Caspasa-3 activada fue mucho menor, pero donde aparece lo hacían en las mismas zonas descritas que en el grupo control (Figura 22B). Los animales del grupo simulado prácticamente no presentaron células que expresan Caspasa-3 activada (Figura 22C).



Control (DSS). Figura 22A. Preventivo (DSS+CT-1).Figura 22B. Simulado. Figura 22C.

Figura 22A, B, C. Fotografías representativas de secciones de colon teñidas con el anticuerpo anti-Caspasa-3 en los tres grupos estudiados.

Al realizar la cuantificación del número de células positivas para Caspasa-3, ésta refleja claramente un número significativamente mayor de células positivas en el grupo control que el grupo preventivo, y mucho más que el grupo simulado (p -valor $<0,0001$). (Figura 22D).

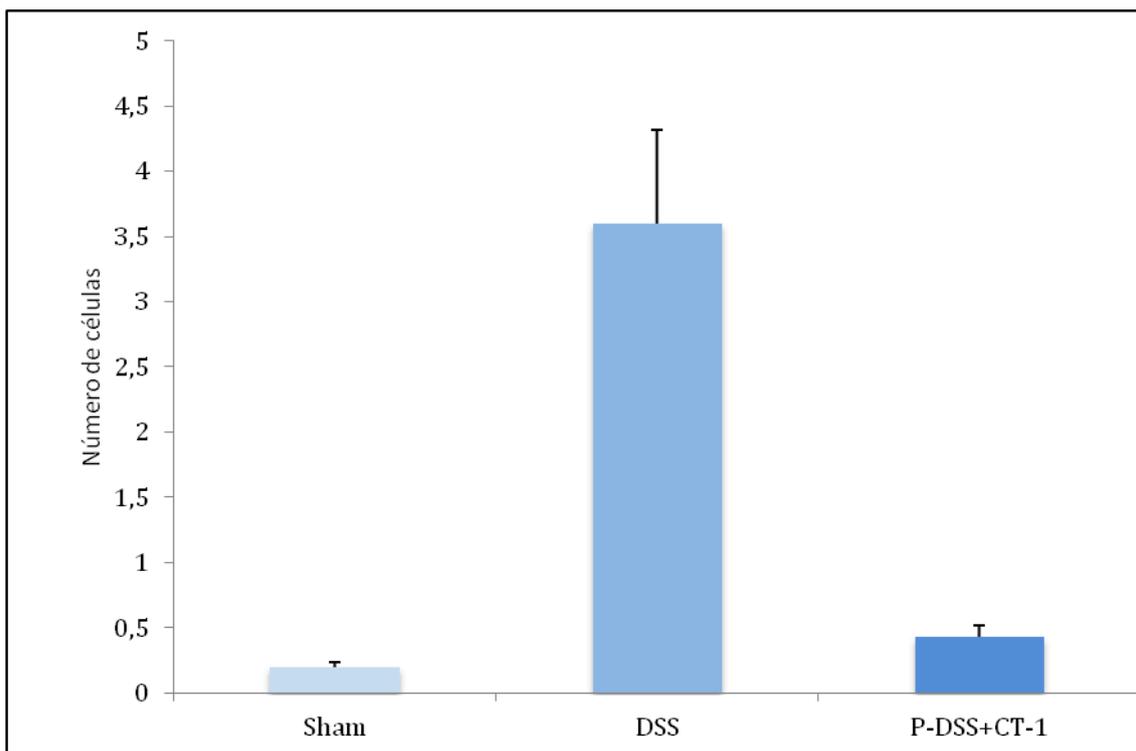
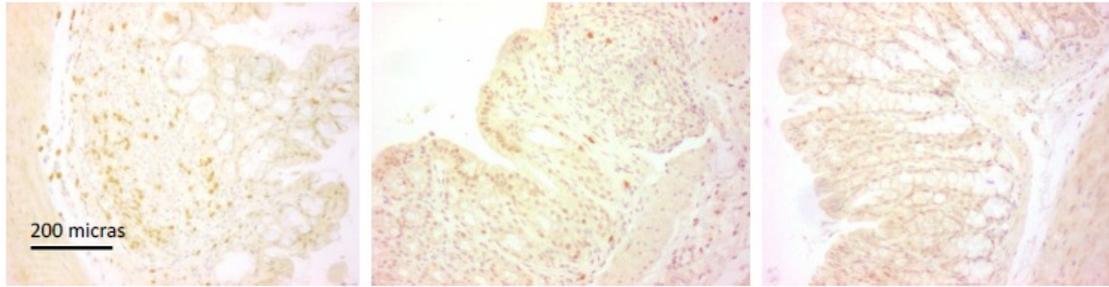


Figura 22D. Inmunohistoquímica. Cuantificación Caspasa-3. Los datos son media \pm error estándar de la media.

iNOS

iNOS es una enzima inducible producida por macrófagos y otras células en condiciones de inflamación. Produce grandes cantidades de NO, que juega un papel importante en el daño celular por inflamación.

Las células que expresan iNOS en el grupo control solamente fueron abundantes en las zonas ulceradas y en menor proporción en la lámina propia subyacente. Aunque existían células que expresan iNOS en la lámina propia de zonas sin úlceras, eran mucho menores. Igualmente, fue posible ver estas células en áreas epiteliales conservadas, en las áreas adyacentes a las úlceras (Figura 23A). La cantidad de células que expresaron iNOS fue mucho menor en los animales del grupo preventivo, incluso en las zonas en las que aún existen úlceras (Figura 23B). Los animales del grupo simulado presentaron una pequeña cantidad de células que expresan iNOS localizadas fundamentalmente entre el epitelio (Figura 23C).



Control. Figura 23A.

Preventivo (DSS+CT-1). Figura 23B.

Simulado. Figura 23C.

Figura 23A, B, C. Fotografías representativas de secciones de colon teñidas con el anticuerpo anti-iNOS en los tres grupos estudiados.

La cuantificación del número de células positivas para iNOS, revela un aumento significativo de expresión del anticuerpo en el grupo control, que es significativamente mayor con respecto a los otros dos grupos de estudio (p -valor $<0,0001$), sin que haya diferencias significativas entre el grupo tratado con CT-1 y el grupo simulado (Figura 23D).

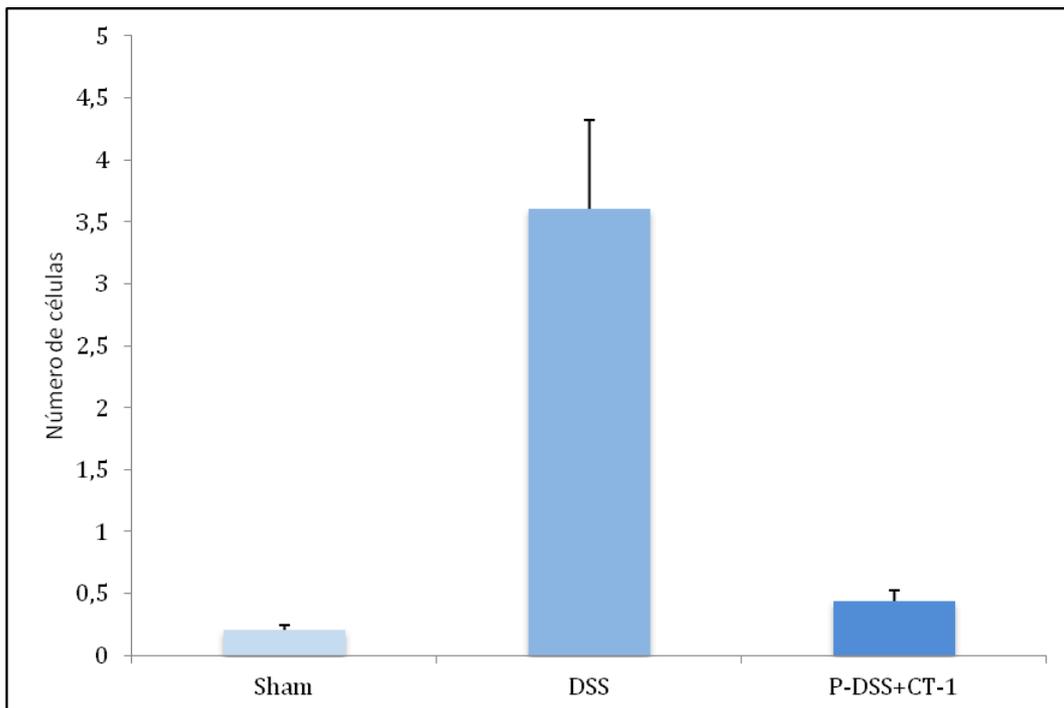


Figura 23D. Inmunohistoquímica. Cuantificación iNOS. Los datos son media \pm error estándar de la media.

3. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

El estudio de translocación bacteriana se realizó en 5 ratones del grupo control, 5 del grupo prevención y 2 del simulado, encontrándose los siguientes hallazgos:

- En los animales del grupo simulado no se aislaron gérmenes en ningún órgano estudiado.
- En el grupo control, en el ratón 1 se aisló *E. coli* en pulmón y bazo, en el 2 *E. cloacae* en pulmón, en el 3 *E. cloacae* en pulmón y bazo, en el animal 4 *E. cloacae* en pulmón y en el 5 *E. cloacae* en pulmón y bazo.
- En el grupo preventivo, no se aislaron bacterias en las muestras obtenidas en ninguno de los 5 animales.

Por tanto, en los 12 animales ensayados, fueron negativas todas las muestras en 7 animales, que corresponden a los del grupo preventivo y simulado. En el grupo control, en 2 se detectó aislamiento en la muestra pulmonar y en 3 en pulmón y bazo. No hubo evidencias de este aislamiento en las muestras de ganglios linfáticos mesentéricos. En todos estos casos los aislamientos se correspondieron con enterobacterias oportunistas (*E. coli* y/o *E. cloacae*).

5. ESTUDIO DE CITOCINAS

TNF α

Determinamos los niveles de TNF α en plasma por ELISA y la expresión génica por PCR en tejido colónico, encontrando que:

Se produce una elevación significativa de los niveles en plasma de TNF α en el grupo control (DSS) con respecto al grupo simulado (Sham). Mientras que los valores de esta citocina en el grupo preventivo (P-DSS+CT-1) son significativamente inferiores a las del grupo control, pero superiores a las del grupo simulado. Figura 24.

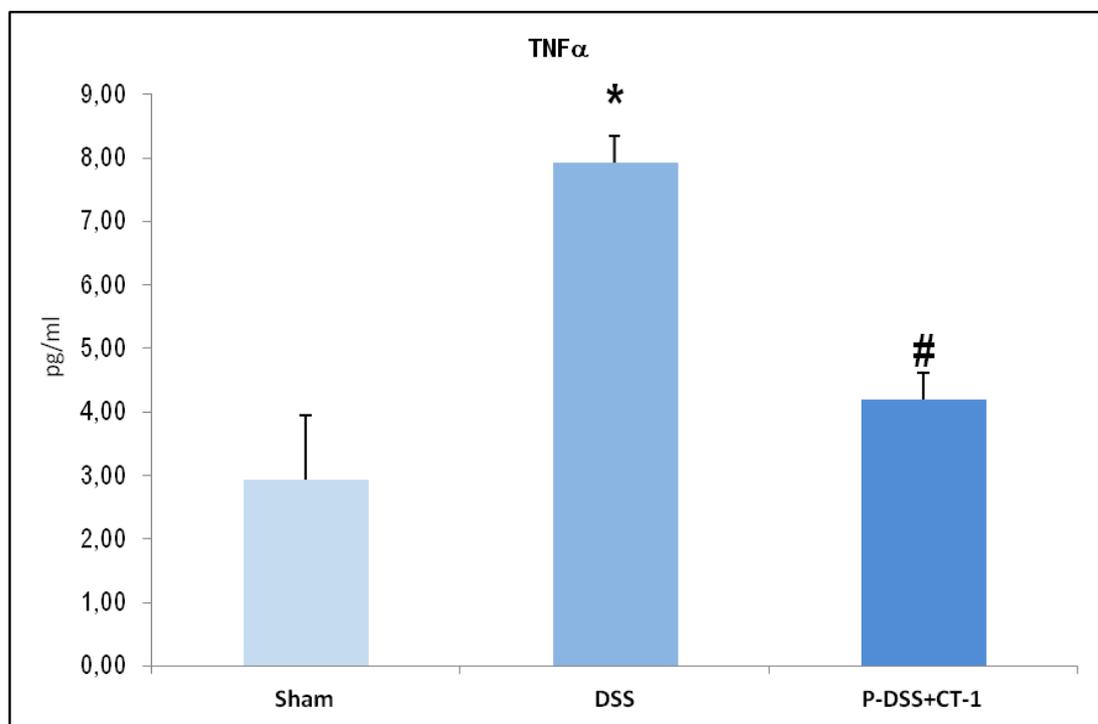


Figura 24. Niveles de TNF α en el plasma en pg/ml de grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. *p>0,005 vs. Sham; # p>0,005 vs. DSS.

De la misma forma, en los ratones del grupo control se produce una elevación de la expresión de TNF α en tejido colónico de forma significativa en relación con el grupo simulado. La expresión de TNF α en los ratones del grupo preventivo están más bajos que en el grupo DSS pero más elevados de forma significativa en relación al grupo simulado. Figura 25.

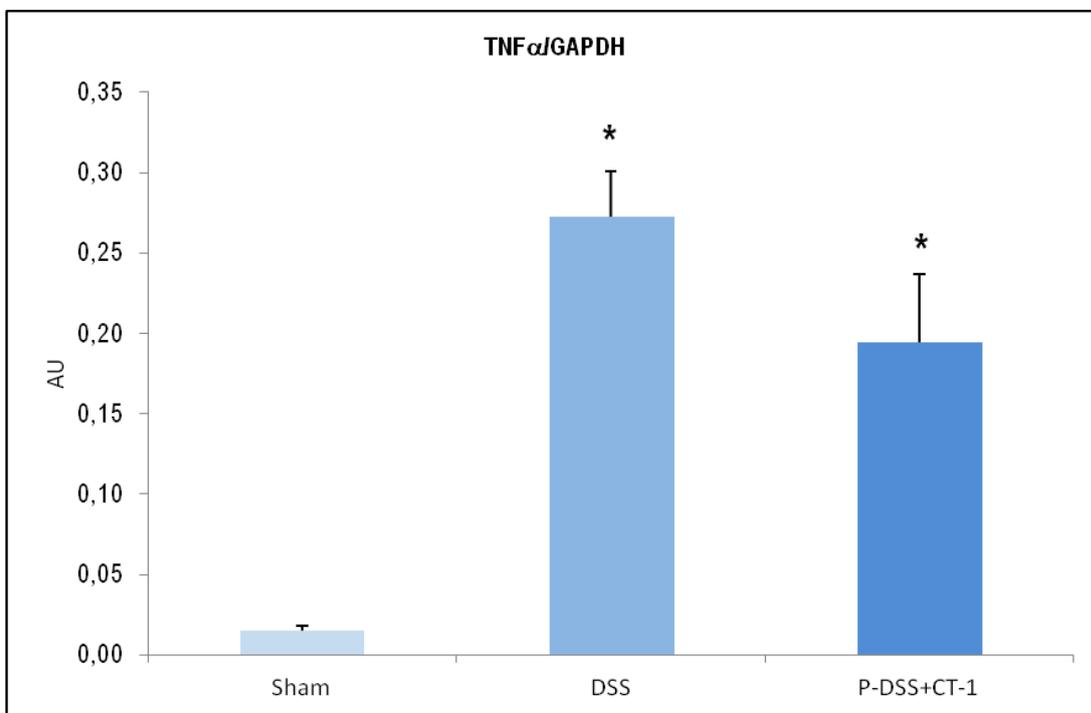
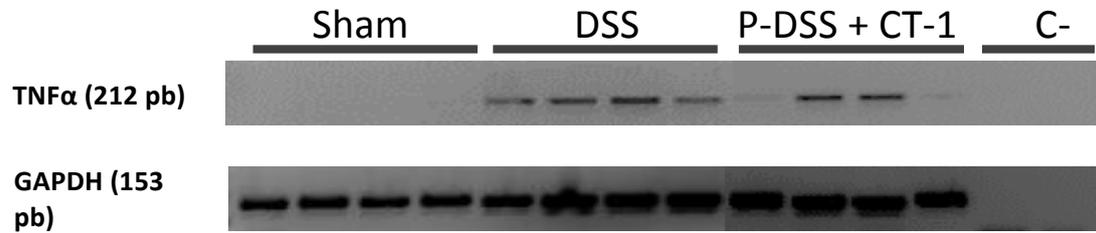


Figura 25. Expresión génica de TNF α por PCR en colon de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. *Z>1.96 vs. Sham; # Z>1.96 vs. DSS.

Expresión génica de INF γ

Estudiamos la expresión génica de INF γ mediante PCR, y encontramos que en el tejido colónico en el grupo control era mucho mayor que en el grupo simulado con diferencias estadísticamente significativas. No existiendo estas diferencias entre el grupo control y el preventivo. Figura 26.

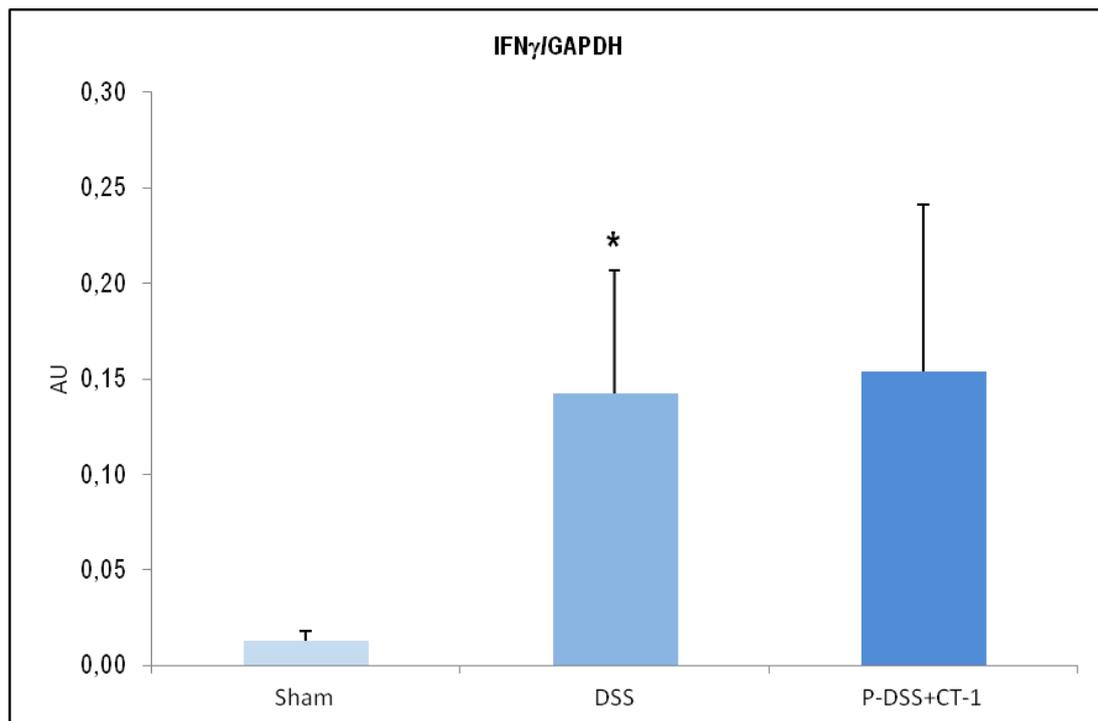
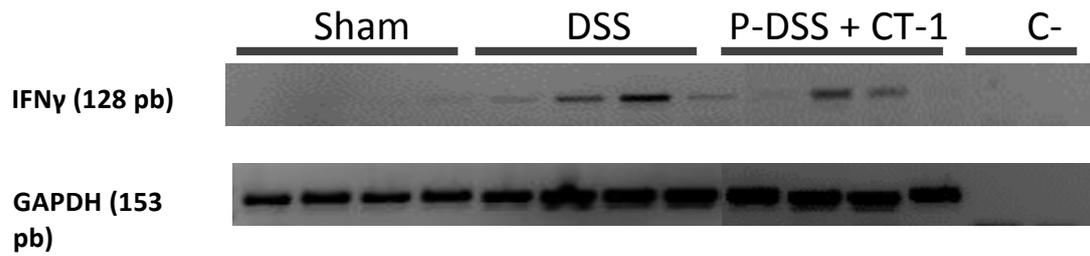


Figura 26. Expresión génica de INF γ en colon de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7.*Z>1.96 vs. Sham; # Z>1.96 vs. DSS.

Expresión génica de IL – 10

La expresión de esta citocina en el grupo control está más elevada que en el grupo simulado de forma significativa. Mientras que es inferior en el grupo preventivo pero de forma no significativa. Figura 27.

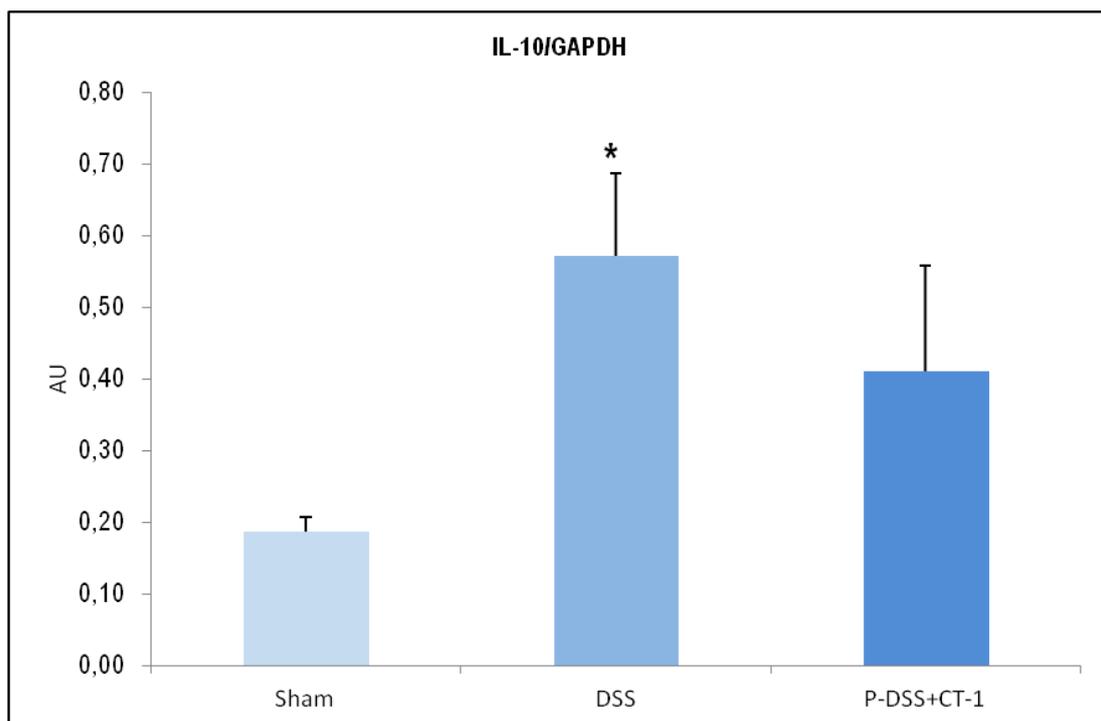
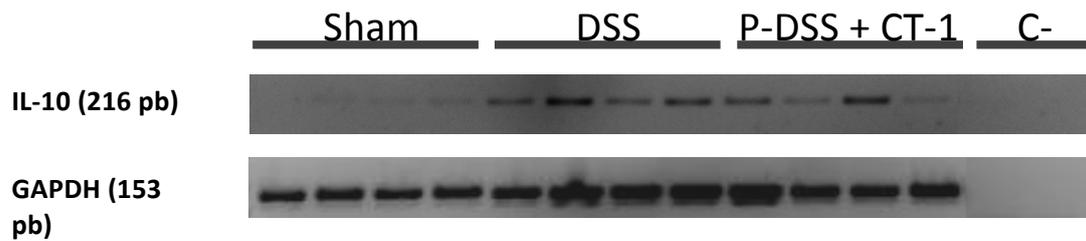


Figura 27. Expresión génica de IL-10 en colon de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. *Z>1.96 vs. Sham; # Z>1.96 vs. DSS.

Expresión de IL – 17

La expresión de IL-17 se encuentran significativamente más elevada en el grupo control que en el simulado. En el grupo preventivo es significativamente inferior con respecto al grupo control, sin existir diferencias con el simulado. Figura 28.

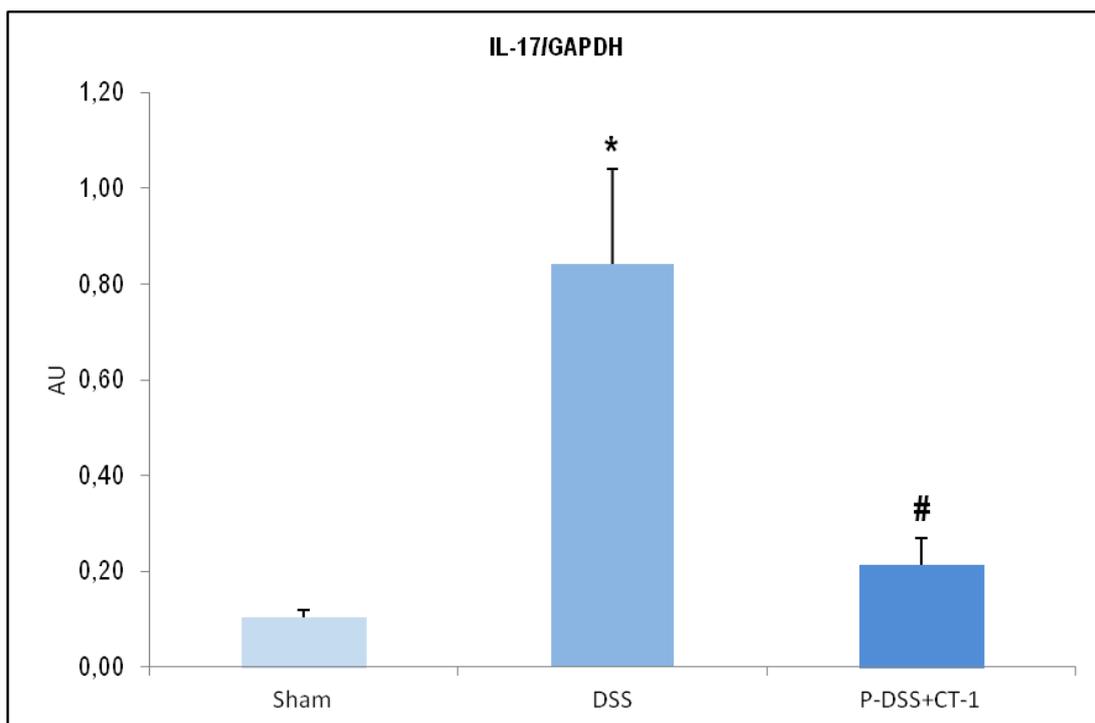
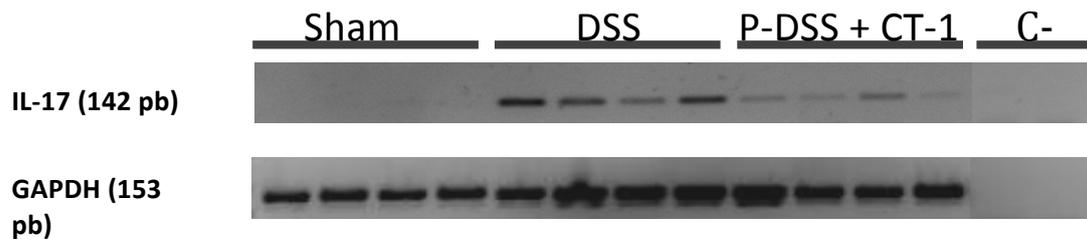


Figura 28. Expresión génica de IL-17 en colon de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7.*Z>1.96 vs. Sham; # Z>1.96 vs. DSS.

Expresión de IL – 6

La IL-6 no se comporta como las demás variables estudiadas. La expresión en tejido colónico de IL-6 en el día 7 del estudio, era menor en el grupo control, sin existir diferencias estadísticamente significativas. Fue similar en el grupo preventivo y grupo simulado entre ellos y mayor que en el grupo control, sin diferencias estadísticamente significativas. Figura 29.

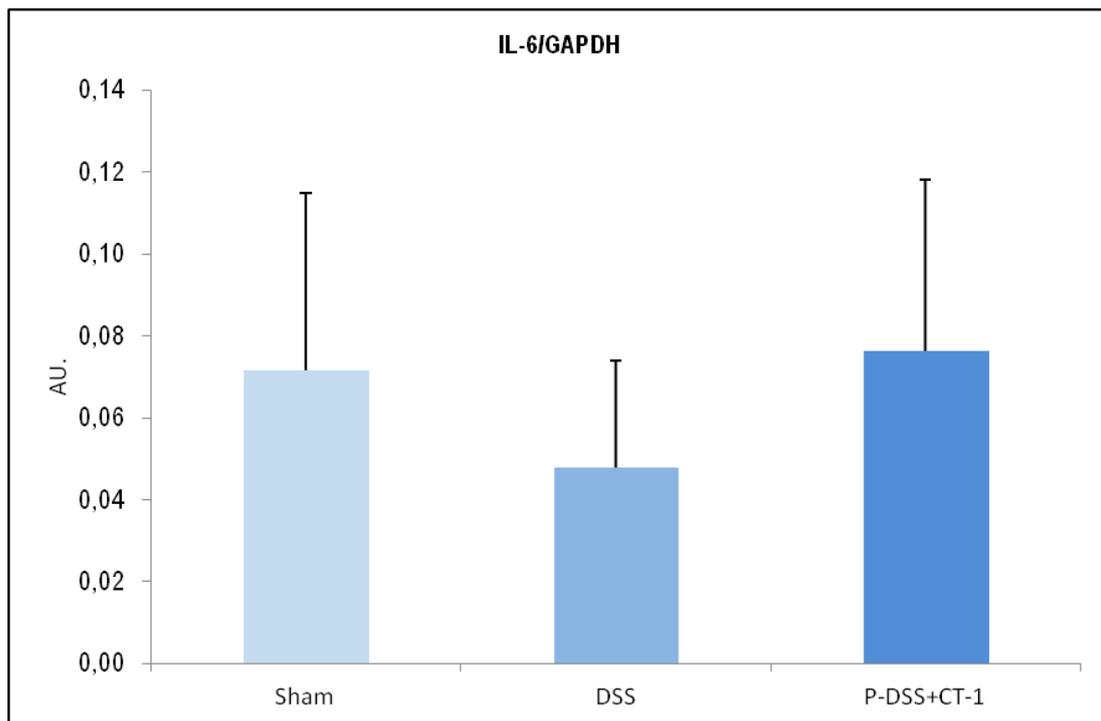
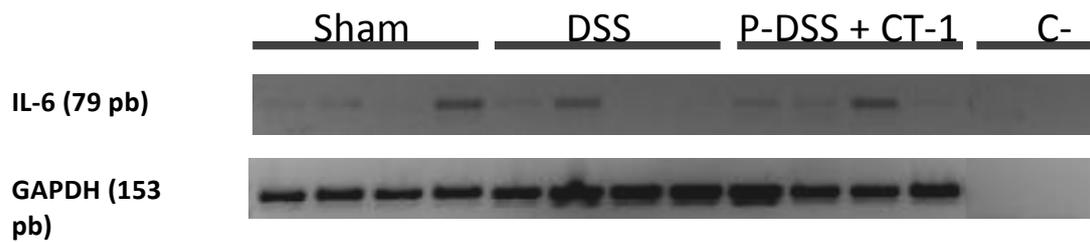


Figura 29. Expresión génica de IL-6 en colon de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $Z > 1.96$ vs. Sham; # $Z > 1.96$ vs. DSS.

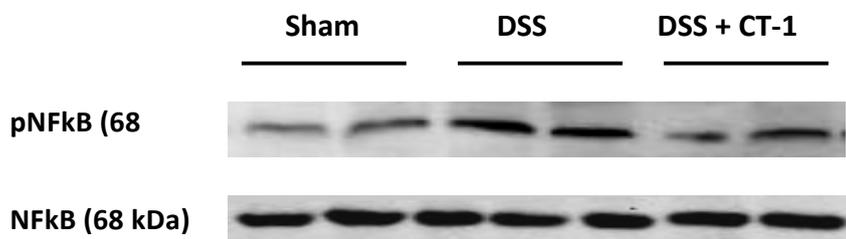
6. ESTUDIO DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN

ACTIVACIÓN DE NF- κ B por WB

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

La cantidad de pNF- κ B en el tejido colónico del grupo preventivo es significativamente inferior a las del grupo control y simulado, sin existir diferencias entre estos dos grupos. Figura 30.

A



B

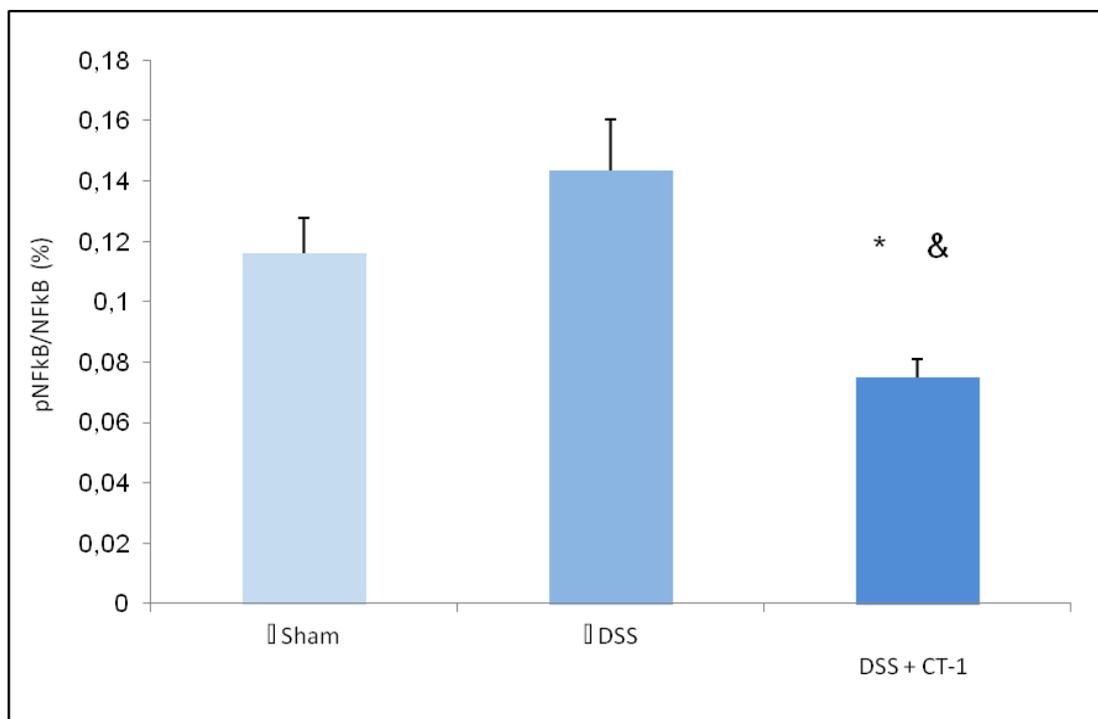
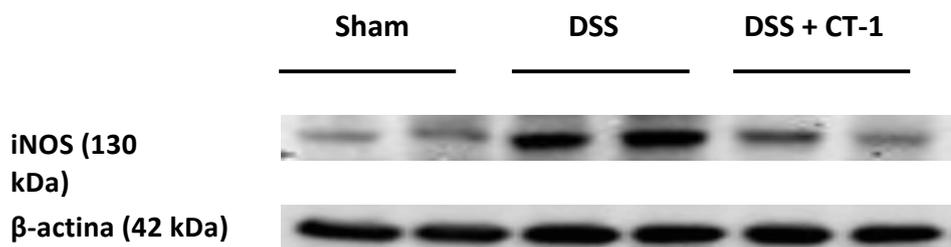


Figura 30. A. Western blot representativo de pNF- κ B y NF- κ B. B. Cuantificación del cociente pNF- κ B/NF- κ B. de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. *p<0,05 vs. Sham; &p<0,05 vs. DSS.

iNOS/ β -actina por WB

Existe una cantidad mayor de iNOS en el grupo control en relación con el grupo simulado, y estas diferencias fueron significativas. Cuando se compara con el grupo preventivo, se vió que en este era significativamente inferior a la del control pero sin diferencias significativas con el grupo simulado. Figura 31.

A



B

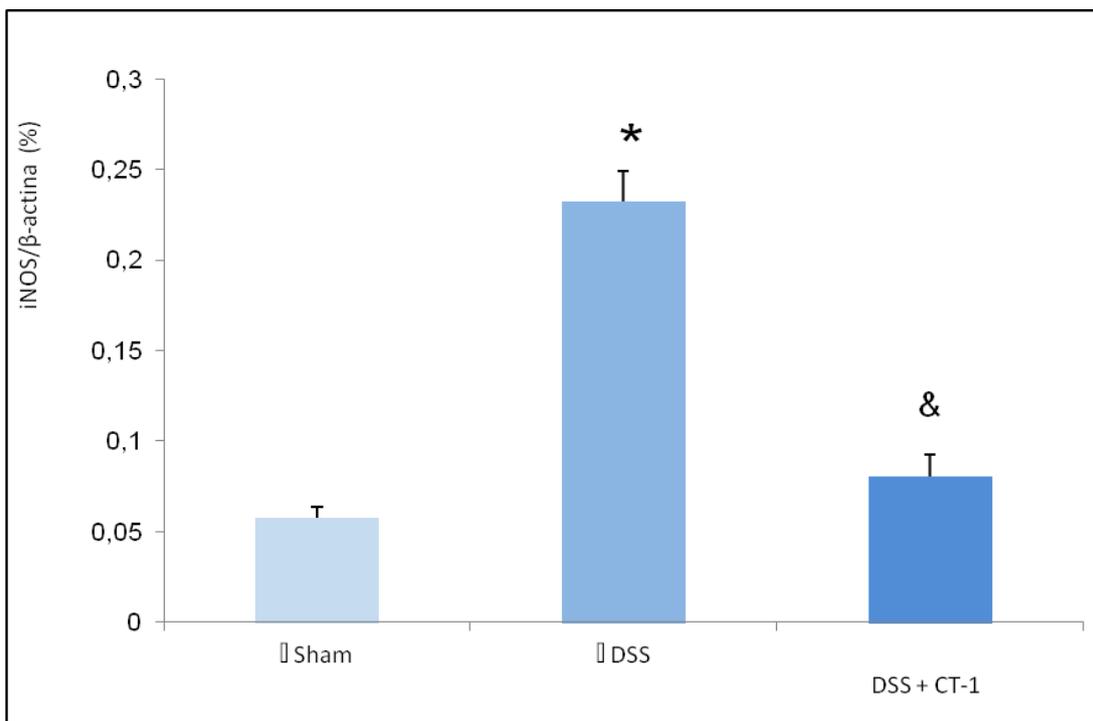
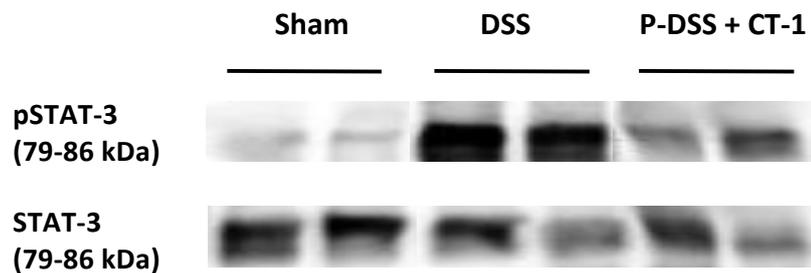


Figura 31. A. Western blot representativo de iNOS y B-actina. B. Cuantificación del cociente iNOS/ β -actina de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $p < 0,05$ vs. Sham; & $p < 0,05$ vs. DSS.

ACTIVACIÓN DE STAT-3 por WB

Al séptimo día del estudio, los niveles de pSTAT-3 se encuentran más elevados en el grupo control que en el grupo preventivo y en el simulado con diferencia significativa con el último. La elevación en el grupo control y en el preventivo con respecto al simulado sí es significativa. Figura 32.

A



B

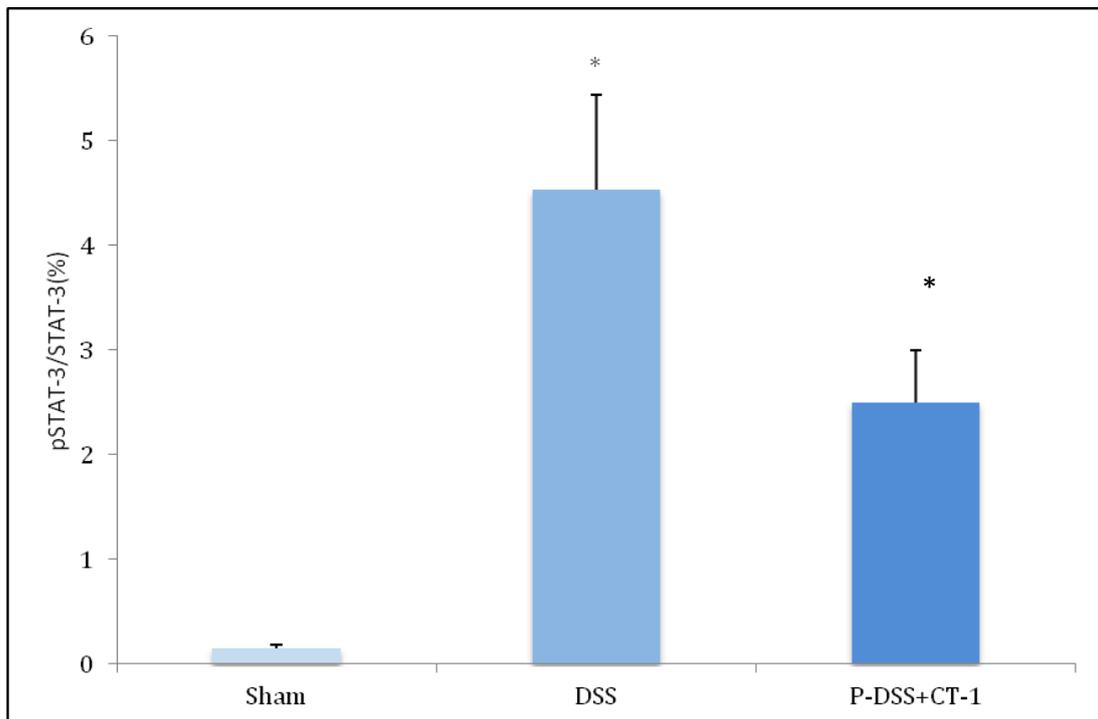


Figura 32. A. Western blot representativo de pSTAT-3 y STAT-3. B. Cuantificación del cociente pSTAT-3/STAT-3 de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $p < 0,05$ vs. Sham; & $p < 0,05$ vs. DSS.

7. EXPRESIÓN DE CT-1

Estudiamos los niveles plasmáticos de CT-1 mediante ELISA, la expresión génica en tejido colónico mediante PCR y cantidad en tejido colónico mediante WB.

Los niveles de CT-1 en sangre en el grupo preventivo están más elevados en relación con el grupo simulado y el grupo control, siendo estadísticamente significativo en relación con el grupo simulado. Figura 33.

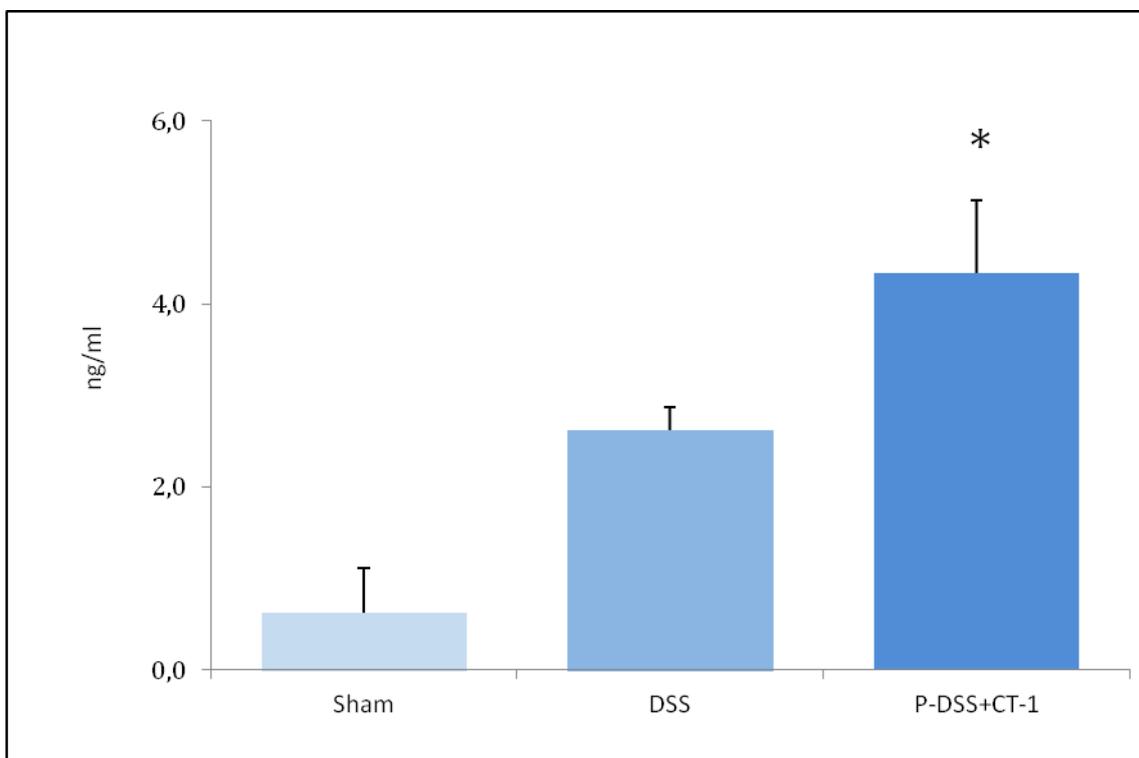


Figura 33. Niveles de CT-1 en plasma en ng/ml por ELISA de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. DSS.

La expresión de CT-1 en tejido colónico medida por PCR en el grupo preventivo es mayor que en el grupo control y simulado, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo simulado. No hay diferencia significativa entre el grupo control y simulado. Figura 34.

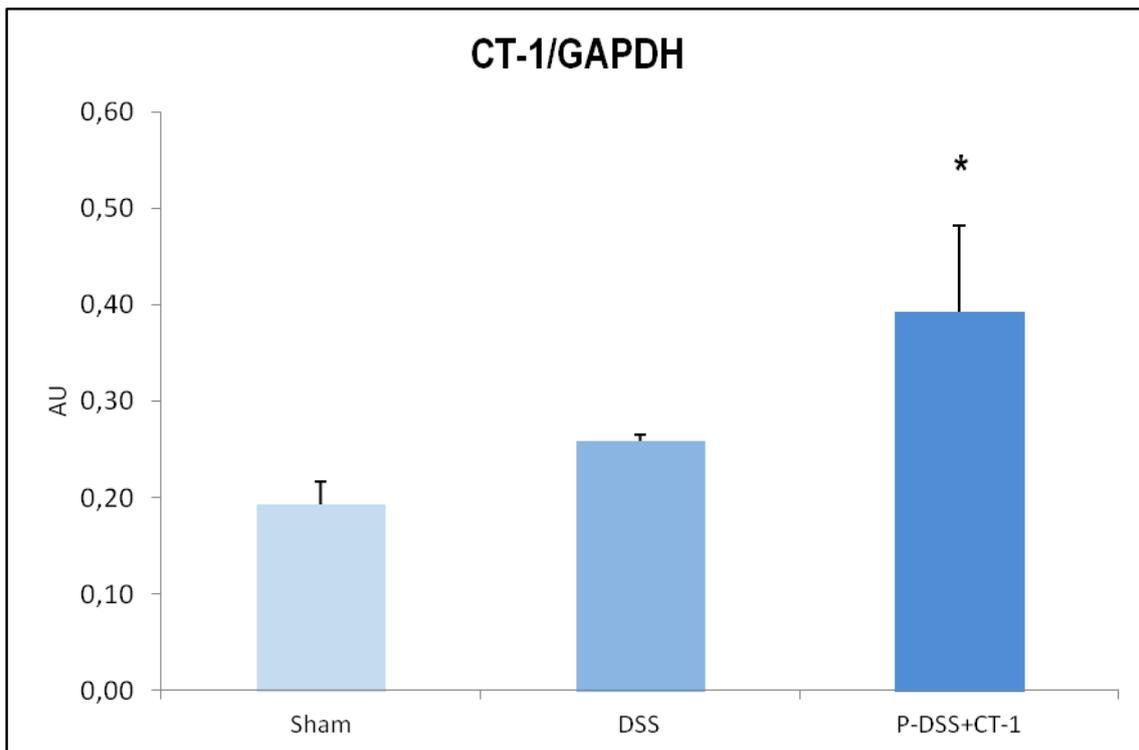
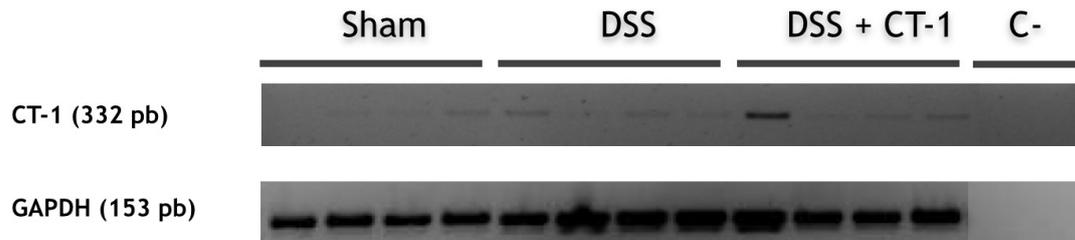
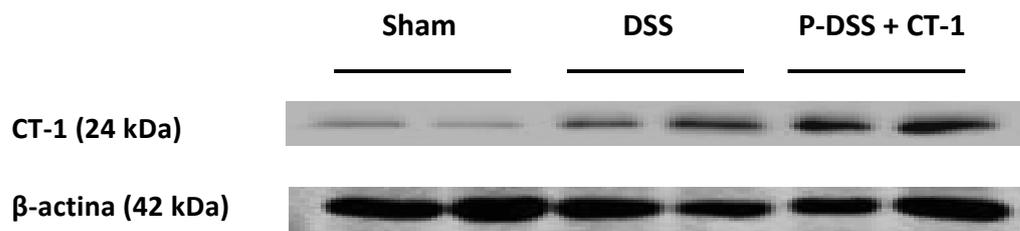


Figura 34. Expresión génica de CT-1 en tejido colónico de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. *Z>1.96 vs. Sham; # Z>1.96 vs. DSS.

El estudio de la cantidad de CT-1 en tejido colónico medida por WB en el grupo preventivo es mayor que en el grupo control y que en el simulado, solo siendo significativo en relación con el grupo simulado. No hay diferencia significativa entre el grupo control y el simulado. Figura 35.

A



B

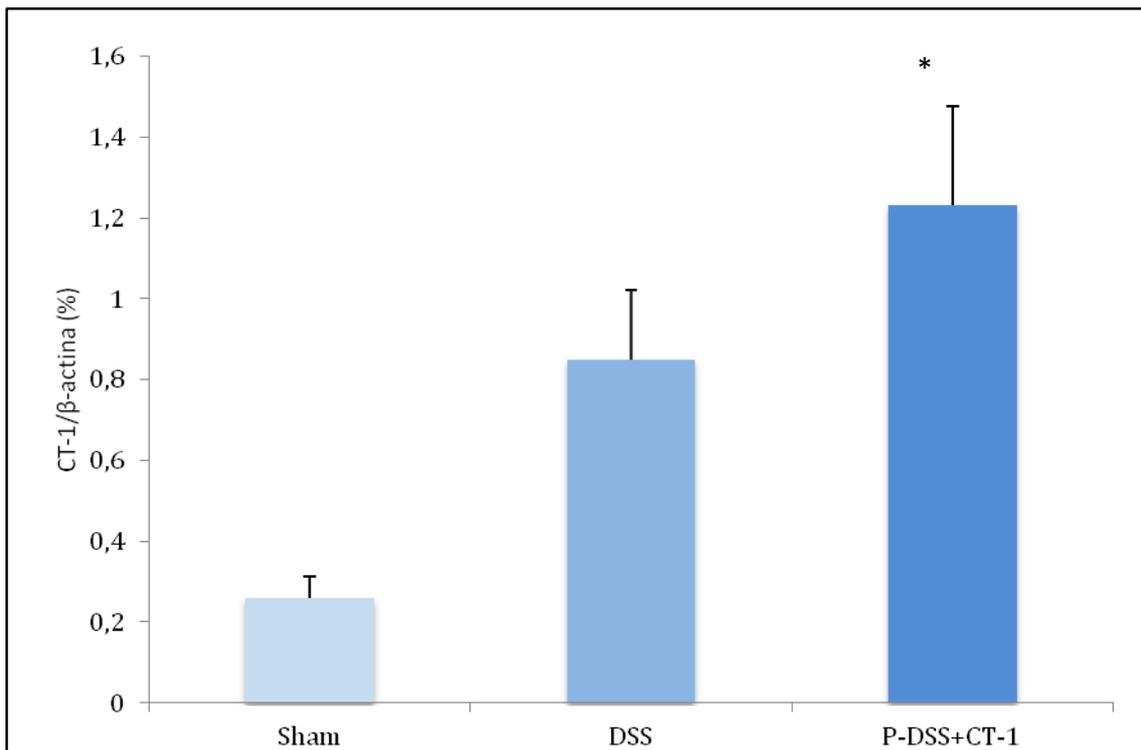


Figura 35. A. Western blot representativo de CT-1 y β -actina. B. Cuantificación del cociente CT-1/ β -actina de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $p < 0,05$ vs. Sham.

8. ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO)

La infiltración neutrofílica medida por la actividad de la mieloperoxidasa fue en el día 7 del estudio menor en el grupo preventivo que en el grupo control y simulado sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. Figura 36.

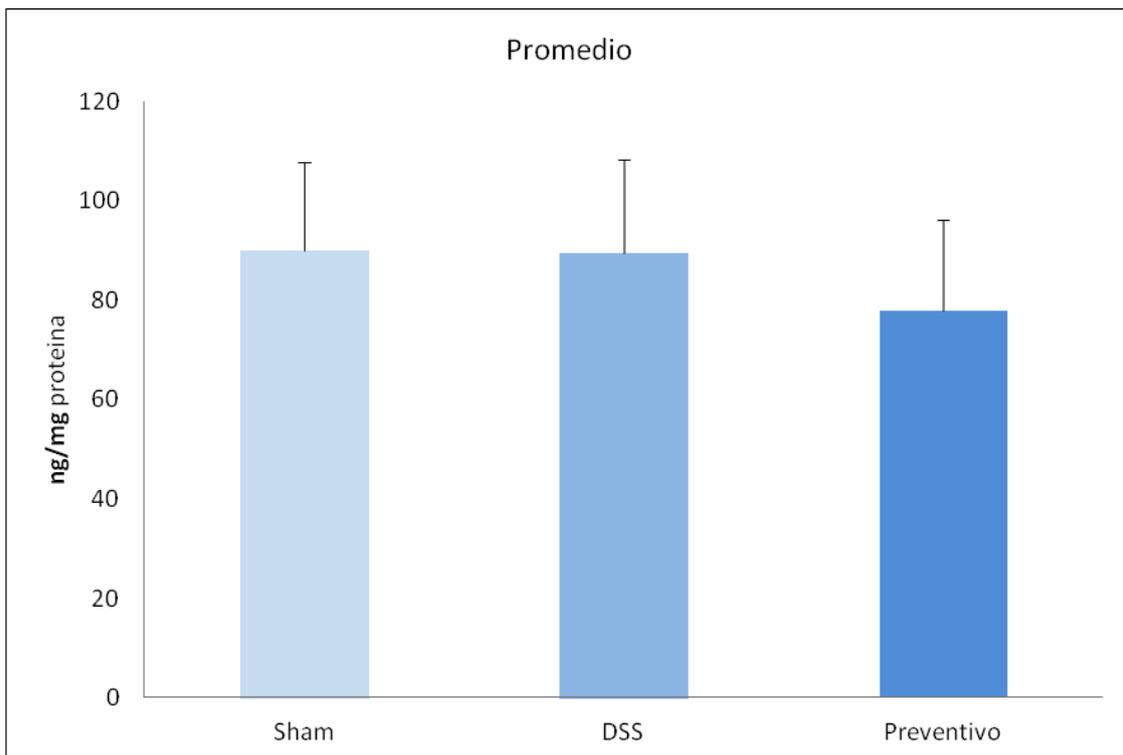


Figura 36. Niveles de MPO en colon en ng/ml de los grupos simulado (Sham), control (DSS) y preventivo (P-DSS+CT-1) a día 7. * $p > 0,05$ vs sham # $p > 0,05$ vs DSS.

V.- DISCUSIÓN

No disponemos hasta la actualidad de tratamientos farmacológicos o quirúrgicos curativos para la CU. Los múltiples fármacos empleados para su tratamiento, aunque no siempre, consiguen la remisión de la fase activa y consiguen mantener la enfermedad sin actividad. Pero existe un 10-20% de pacientes que durante un brote grave de CU precisan colectomía, por riesgo vital, por fracaso de los medicamentos disponibles. Ya que la característica principal en la CU es la inflamación, son necesarias nuevas terapias que limiten y controlen el alcance de dicho proceso inflamatorio, bien para proceder a colectomía con el paciente en relativamente buen estado, o para, una vez frenada la fase aguda, mantener la actividad. Serían necesarios nuevos fármacos que cumplan las características que debe cumplir un fármaco para ser ideal, como son: eficacia, facilidad de administración, escasez de efectos secundarios, que vaya dirigido a varios factores etiopatogénicos y que tenga un bajo coste.

En la EII se ha identificado varias moléculas que juegan un papel crítico en el control de la inflamación a través de la modulación de diferentes rutas de señalización, como son las que dependen de NF- κ B y de citocinas. Así, una activación persistente de NF- κ B, ha llevado a sugerir que la inhibición de la activación de NF- κ B podría ser una estrategia antiinflamatoria en la enfermedad. Muchos de los medicamentos actualmente utilizados en el tratamiento de estas enfermedades actúan, por lo menos en parte, a través de la inhibición de la activación de NF- κ B.

Uno de los principales moduladores de la actividad de NF- κ B es la CT-1, un fármaco de nueva generación en fase experimental. Por este efecto, podría tener un papel regulador de la respuesta inflamatoria por esta vía. La CT-1 es una citocina de la superfamilia de IL-6, que ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias en una amplia variedad de modelos experimentales de enfermedad (123).

El efecto de la CT-1 ha sido estudiado en patologías con componente inflamatorio que afectan al riñón, pulmón o corazón, en situaciones de hipoxia y en obesidad. Ha demostrado poseer ciertas características interesantes como promover el crecimiento y la supervivencia celular en numerosos tejidos, incluidos tejidos hepáticos, cardíacos, renales y del sistema nervioso. Sin embargo, su efecto no ha sido estudiado hasta la actualidad en el epitelio del tracto digestivo y mucho menos en la EII, ni en humanos ni en modelos experimentales. Los estudios anteriores llevados a cabo en el laboratorio de Cirugía de la Facultad de Medicina, podrían sugerir un posible efecto protector de la CT-1, en la CU (123,182).

Una ventaja adicional del uso de CT-1 para esta indicación es que esta molécula ya ha pasado la FASE 1 de validación como fármaco y su uso ya ha sido autorizado en un ensayo clínico para proteger al riñón por isquemia tras trasplante renal.

Este estudio se planteó con el objetivo de conocer si CT-1, dadas sus propiedades, podría emplearse de forma eficaz para el control de la fase aguda de la CU.

Como procede, para el estudio de eficacia de un fármaco en determinadas circunstancias, antes de utilizarlo como curativo, es conveniente comprobar su eficacia en prevenir la enfermedad cuando se desencadena de manera artificial.

Para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la enfermedad, y para el análisis de las posibles alternativas terapéuticas, se han desarrollado diversos modelos experimentales de EII. De entre ellos, la administración de DSS en ratones, ha sido ampliamente aceptada como un modelo adecuado para la traslación a la CU humana y para la identificación de nuevas terapias y es uno de los más empleados. Ha demostrado inducir una colitis autolimitada en varias especies de roedores. Altera la barrera epitelial causando síntomas clínicos agudos (diarrea y hemorragia intestinal), 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 enfermedad. Su reproducibilidad, accesibilidad, su similitud con el cuadro clínico e histológico de la CU en el humano, han sido los determinantes que han impulsado su elección como modelo a emplear.

Por ello, en el modelo experimental que se ha desarrollado en el presente trabajo, hemos estudiado la colitis inducida químicamente por DSS. Se han analizado variables clínicas, histológicas, moleculares, la translocación bacteriana que se produce, y sus cambios en relación con la administración profiláctica de CT-1, comparando un grupo simulado, sin DSS, un grupo control, con DSS sin aporte de CT-1 y un grupo preventivo, con DSS y aporte de CT-1 exógena. Además del estudio clínico, histológico y molecular del proceso inflamatorio, hemos analizado los posibles mecanismos de acción de CT-1 sobre la colitis experimental que puedan poner las bases de su utilización terapéutica para la prevención de la CU.

La elección del peso molecular y concentración de DSS, se realizó según los datos de la bibliografía existente (143,191,192). También realizamos previamente al estudio, una puesta a punto del modelo, empleando DSS a diferentes concentraciones, con la finalidad de elegir la

más adecuada para nuestro modelo. Observamos que la concentración del 5% era la que mejor se ajustaba a nuestro interés, en cuanto a los síntomas que provocaba. Concentraciones más elevadas llevaban a la muerte de los ratones y concentraciones más bajas a un cuadro de colitis muy leve.

Elegimos un periodo de 7 días de duración de la inducción de la colitis hasta el sacrificio de los animales, tras un ensayo previo en el cual comprobamos que era suficiente para el desarrollo clínico de la enfermedad y porque si lo alargábamos, el deterioro era tal que impediría el correcto estudio histológico. En algunos protocolos usados en los estudios existentes, la colitis aguda se consigue tras 2 semanas de administración de DSS, pero en nuestro caso la duración fue menor porque la clínica que presentaba el grupo de ratones no tratados impedía prolongarla, por el alto riesgo de muerte. Por otro lado, una duración mayor y a otras concentraciones supone la aparición de una colitis crónica, que se encuentra fuera del objetivo del estudio; como ya hemos indicado previamente, CT-1 no parece ser una molécula adecuada para la administración crónica por los efectos secundarios ya conocidos, fundamentalmente cardiológicos.

Una vez analizadas las propiedades ya conocidas de CT-1 y su vida media, se eligieron los días 1, 3 y 5 de evolución tras el inicio de DSS, para su administración. Estos datos proceden de ensayos llevados a cabo en el laboratorio de Cirugía de la Facultad de Medicina, sobre todo en isquemia renal, en los que se demostraron que CT-1 protege al riñón de la inflamación inducida por isquemia.

Tras conseguir provocar el cuadro de colitis en los ratones, estos se sacrificaron para la obtención de muestras. No se preservaron ratones para el estudio de la evolución de la enfermedad.

En nuestro estudio experimental, hemos demostrado que la administración intravenosa de CT-1 con finalidad preventiva reduce de forma muy importante el daño producido por DSS en el colon, que se objetiva por una mejoría de la clínica de la CU que se induce y de las lesiones estructurales del colon del grupo de animales que recibían CT-1 en comparación con los animales que no lo recibían. Estos datos están de acuerdo con los estudios publicados en modelos experimentales de inflamación en otros órganos en los que la CT-1 presenta efectos protectores frente a la inflamación (157). A continuación pasamos a discutir detalladamente estos resultados.

El grupo de ratones que recibieron CT-1, presentaban síntomas de colitis leve o incluso se encontraban asintomáticos al final del período de inducción de la colitis. A diferencia de lo

que ocurrió en los animales del grupo control, que a día 7 del estudio, el 90% presentaban diarrea líquida, sangrado masivo y deterioro del estado general con disminución importante de la movilidad y de la respuesta a estímulos. No se produjo la muerte de ninguno de los animales durante la fase de la colitis. No obtuvimos datos de mortalidad porque todos los ratones fueron sacrificados el mismo día.

Con estos resultados podemos demostrar un claro efecto clínico protector de la CT-1 en los síntomas principales de la CU como son la diarrea, el sangrado en las heces y el estado general.

Estos resultados clínicos obtenidos están de acuerdo con los hallazgos histológicos que demuestran que la administración de CT-1 reduce el infiltrado inflamatorio de la mucosa del colon, evitando la aparición de úlceras y manteniendo la mayor parte del epitelio conservado. Así mismo, mediante las técnicas de inmunohistoquímica se demuestra menor inflamación por el menor infiltrado de macrófagos en la lámina propia del colon (menor número de células que expresan CD68) en los animales que recibieron CT-1 de forma preventiva, en comparación con la abundante cantidad de estas células en las zonas ulceradas del grupo control. Los macrófagos son células involucradas en la respuesta inmune innata, muy abundantes durante la fase de actividad inflamatoria de la CU. También existe una menor expresión de iNOS en el epitelio de los ratones del grupo preventivo, a diferencia de lo que ocurre en el grupo control. iNOS es una citocina proinflamatoria producida por macrófagos que interviene en el proceso de inflamación. TNF α causa la activación de iNOS que a su vez aumenta la producción de NO. La elevada producción de NO por iNOS estimulada durante la inflamación contribuye al daño local del tejido que ocurre en los procesos inflamatorios (202).

El estudio microbiológico permitió conocer la translocación bacteriana que ocurre tras la administración de DSS como una parte del proceso inflamatorio, y el efecto de CT-1 sobre este proceso. La translocación bacteriana consiste en el paso de bacterias desde la luz intestinal, sin rotura de la integridad de la mucosa intestinal, a órganos extraintestinales, como ganglios linfáticos, pulmón o bazo. Los mecanismos necesarios para que se produzca la translocación bacteriana son fundamentalmente las alteraciones en el normal equilibrio de la flora intestinal, concretamente el sobrecrecimiento bacteriano, las alteraciones de la barrera intestinal con el consiguiente incremento de la permeabilidad intestinal a las bacterias y las alteraciones de los mecanismos de defensa inmunitario. La consecuencia más previsible de la translocación bacteriana es su contribución al desarrollo de infecciones. Su aparición supone una pérdida de la función barrera del epitelio intestinal frente a la propia flora intestinal.

En nuestro estudio, solo se aislaron bacterias en los órganos extra-colónicos en los animales del grupo que recibe solo DSS, mientras que no se aislaron microorganismos en ninguno de los ratones del grupo simulado ni en los ratones que reciben DSS y CT-1 de forma preventiva. Los microorganismos detectados se corresponden con los descritos en la literatura sobre translocación bacteriana en el colon, donde las Enterobacterias oportunistas (*E. coli*, *E. cloacae*, etc.), Lactobacilos y Enterococos juegan un papel determinante en este tipo de cuadros. Mientras que el aislamiento de anaerobios del género *Bacteroides* es menos frecuente (203-206). En el grupo control, la translocación bacteriana se ha detectado en el pulmón y bazo, sin producirse en ganglios linfáticos. Este sugiere que ha tenido lugar por vía hematológica y no linfática. En el grupo preventivo y simulado no se produjo translocación. Podemos concluir que los animales del grupo control, presentaron una alteración de la barrera epitelial, con aumento de la permeabilidad intestinal a las bacterias de la luz, de la misma forma que ocurre en pacientes con CU, favoreciendo la translocación bacteriana. Esto no ocurrió en los que recibieron CT-1 de forma preventiva.

Determinamos la activación del factor de transcripción NF- κ B midiendo la cantidad de pNF- κ B, que es la forma activa del factor de transcripción NF- κ B. NF- κ B controla la expresión de múltiples genes involucrados en la inflamación, entre ellos, genes que codifican citocinas proinflamatorias como (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α), quimiocinas, moléculas de adhesión (iCAM), enzimas inducibles (COX-2, iNOS), factores de crecimiento y algunas proteínas de fase aguda, todos ellos implicados en la mayoría de procesos inflamatorios (207). En presencia de CT-1, NF- κ B se activa, entra en el núcleo celular y se transforma en factor de transcripción. Este inhibe los genes que codifican proteínas inflamatorias, disminuyendo estas.

Nuestros datos demuestran que en los animales que reciben DSS se produce una activación muy importante de NF- κ B comparado con los animales del grupo simulado, mientras que NF- κ B está menos activada en el colon de los animales que reciben también CT-1 de forma preventiva. 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. También se ha descrito que CT-1 activa NF- κ B en células endoteliales (151) o monocitos (154,208). Por otro lado, se ha descrito que los efectos citoprotectores de CT-1 en cardiomiocitos en cultivo ocurren a través de la

activación de NF- κ B (149). Por lo tanto, parece que, dependiendo de las circunstancias, CT-1 induce o inhibe la activación de NF- κ B. La opinión de nuestro grupo de investigación es que CT-1 disminuye la activación de NF- κ B cuando este factor de transcripción está activado, y la inhibe cuando está en condiciones basales (123).

En los últimos años, las terapias biológicas que se han centrado en la inhibición de TNF- α , consiguen la remisión en un alto porcentaje de pacientes, aunque hay evidencias de que otras vías de la inflamación están activas. Hemos buscado la relación de CT-1 y TNF- α . Como era esperable en nuestros ratones con colitis inducida por DSS se produce un aumento de los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-17. El incremento de las citocinas proinflamatorias como TNF- α en el plasma de ratones con colitis inducida por DSS es significativamente mayor que en el grupo tratado preventivamente con CT-1. Es decir que nuestros datos demuestran que en los ratones con colitis que recibieron CT-1 los niveles plasmáticos de TNF- α son menores que en los ratones que no recibieron CT-1. Nuestros datos también demuestran que la administración de DSS produce un aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias, TNF- α , IL-17 en tejido colónico. La administración preventiva de CT-1 se asocia a una menor expresión de citocinas proinflamatorias, TNF- α , IL-17 en tejido colónico comparado con los de los ratones del grupo control. Benigni et al han demostrado que la administración de CT-1 a ratones que han recibido 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 (209). De este modo, CT-1 previene del daño pulmonar agudo producido por endotoxinas a través de la inhibición de la producción de TNF- α o de otras citocinas proinflamatorias (178). La CT-1 administrada exógenamente va a inducir sobreactivación del receptor gp130 lo que conlleva un incremento en la fosforilación de STAT-3 y STAT-1 en el riñón que conduciría a incrementar la activación de SOCS-3 y SOCS-1 lo que a su vez, inhibe la síntesis de algunas citocinas proinflamatorias (210). La inyección intravenosa de CT-1 a ratas Wistar inducen en el corazón un aumento rápido de la expresión de mRNA de SOCS-1. Además se ha demostrado que SOCS-1 tiene un efecto dominante sobre el receptor del INF- γ (INF- γ R), inhibiendo los efectos proinflamatorios de este.

Por lo tanto, el mecanismo principal del descenso en el grupo preventivo de los niveles de TNF- α por la CT-1 pudiera estar basado tanto en la menor activación del factor transcripcional NF- κ B como en la vía de activación STAT-3-SOCS-3 antes descrita.

IL-17, producida por la vía Th17, tiene funciones ambiguas. IL-17A proporciona una función protectora durante la inflamación de la mucosa, quizás por inhibición de INF γ , pero IL-

17F podría conducir a la inflamación intestinal a través de la activación de INF γ . La expresión de IL-17 está elevada en la EII. En nuestro estudio obtenemos niveles de IL-17 más elevados en el grupo control que en el grupo simulado, y niveles más bajos en el grupo de animales que recibieron CT-1 comparado con el control. Estos datos parecen confirmar otra forma de control de la inflamación por parte de la CT-1 en la CU.

De estos datos podemos concluir que la administración de CT-1, disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias y la activación de NF- κ B, lo que demuestra el papel protector de la CT-1 en la inflamación del colon de ratones a los que se les administró DSS.

Nuestros resultados también demuestran que, como habíamos visto en estudios anteriores, la colitis inducida por DSS se asocia a una disminución de los niveles circulantes de IL-6, citocina con efecto predominantemente antiinflamatorio. En los ratones a los que se administra CT-1, los niveles circulantes de IL-6 son mayores que los del grupo control y simulado. Esto está de acuerdo con el hecho de que la CT-1 induce la síntesis de IL-6 *in vivo* y se ha demostrado que este efecto es a través de NF- κ B, ya que en la región promotora del gen IL-6, se encuentra un sitio de unión para NF- κ B. El mecanismo exacto de como la activación de JAK2/STAT-3 participa en la expresión de IL-6 inducida por CT-1 no está claro. Una activación directa del gen IL-6 parece poco probable, porque no hay ningún sitio de unión para STAT3 en el gen promotor de IL-6 (211).

IL-6 puede provocar *in vivo* tanto efectos antiinflamatorios como proinflamatorios dependiendo de las circunstancias (212). Se ha descrito que la pérdida de la expresión de IL-6 se asocia a un aumento del daño epitelial e inflamación inducida por DSS, colitis más graves y mayor mortalidad. Así, la administración de anticuerpos neutralizantes de esta citocina provoca mayor daño epitelial. Esto se demuestra en ratones IL-6, IL-11 e IL-22 KO, que presentan mayor daño epitelial (211).

Recientemente se ha publicado una revisión sobre las citocinas dependientes de la activación de STAT3, que son IL-6, IL-11 e IL-22 (211). Estas citocinas se encuentran elevadas en pacientes con EII y en modelos de EII en ratón. STAT3 activado está involucrado en el mantenimiento de la barrera epitelial y juega un papel importante en la EII, donde se encuentra activado en varios tipos celulares (213). Un déficit de STAT3 en las células epiteliales aumenta la susceptibilidad a la aparición de lesiones epiteliales tras la administración de DSS (214). Por tanto, podría ser un factor protector en la mucosa gastrointestinal. Ratones con una delección de STAT3 en las células hematopoyéticas, particularmente en los macrófagos, desarrollan una EII espontánea (215-217). Por el contrario, ratones en los que se ha

delecionado la actividad de STAT3 específicamente en las células T, están protegidos de diversos tipos de enfermedad inflamatoria, lo que sugiere que esta activación es proinflamatoria (218). Por lo tanto, parece que el efecto pro o antiinflamatorio de la activación de STAT3 es dependiente del tipo celular. Como apoyo de esto está el hecho de que la expresión de citocinas como IL-6 que induce la activación de STAT3 se encuentra elevada en biopsias de pacientes con EII y en nuestros ratones con CU inducida por DSS (219). Además, IL-6 y otras citocinas similares juegan un papel clave en la regulación de procesos inflamatorios en el intestino (220). Sin embargo, la activación epitelial de STAT3 en el modelo de CU por DSS parece ser más dependiente de IL-22 que de IL-6. En la CU activa, los niveles de STAT3 activados están elevados, teniendo correlación con la gravedad.

Los niveles de IL-11 hasta el momento no se han investigado en los pacientes con EII. Y las contribuciones de esta citocina a la patogénesis de la EII son menos conocidas. Sin embargo, el tratamiento con IL-11 recombinante en ratas y ratones, disminuye la inflamación intestinal y el daño de la mucosa en varios modelos de EII (211).

La activación de estas citocinas en el epitelio por su efecto protector, podría suponer una oportunidad terapéutica para la prevención y el tratamiento de la CU. Sin olvidar la posibilidad de estas citocinas de intervenir en la formación de tumores.

De estos datos se puede deducir que en el grupo al que se administró CT-1 de forma preventiva, la respuesta inflamatoria tras la administración de DSS está más controlada, y que el efecto protector de CT-1 es debido, entre otros mecanismos, a sus efectos en el incremento de las citocinas IL-6 y al decremento de TNF- α , fenómenos vinculados a un efecto antiinflamatorio (211).

Se ha demostrado que cuando SOCS-3 está ausente, la activación de STAT-3 mediada por IL-6 vía gp130 induce respuestas antiinflamatorias idénticas a las de IL10R. La IL-10 es una citocina producida por macrófagos, con efecto predominantemente antiinflamatorio. Su activación depende también de STAT3. En pacientes con EII las concentraciones séricas de IL-10 se incrementaron, encontrándose correlación entre la gravedad de la enfermedad y la producción de IL-10 por las células T de la lámina propia de pacientes con CU activa. Pero la IL-10 amortigua la respuesta inflamatoria que se produce tras la lesión. Esto se demostró en ratones IL10 KO, que desarrollaron colitis espontánea (211).

También se ha demostrado que IL-10, a través de la activación de la vía de supervivencia celular ERK1/2 bloquea la activación de NF- κ B inducida por TNF- α . Por lo tanto si la CT-1 aumenta la síntesis de IL-10, ésta, aumenta la activación de ERK1/2 y por lo tanto la

inhibición de NF- κ B. Esto no se ha observado en nuestros ratones, ya que los del grupo control, que recibieron DSS pero no recibieron CT-1, presentan niveles más elevados de IL-10 que los que recibieron CT-1. Consideramos que esta elevación puede deberse a un mecanismo de compensación de la inflamación. Probablemente los niveles de IL-10 en el grupo prevención son más bajos porque se ha frenado la inflamación por la propia administración de CT-1. Como ya sabemos, IL-10 requiere de la activación de STAT-3 para ejercer sus efectos antiinflamatorios, IL-10 induce rápidamente SOCS-3 de forma dependiente de STAT-3 e IL-10 utiliza SOCS-3 de manera temprana para limitar la producción de TNF- α e iNOS (221). Por lo tanto IL-10 utiliza diferentes mecanismos de acción a través de la proteína SOCS-3 sobre diferentes vías, activadas por el mismo estímulo.

Nuestros resultados también corroboran que la colitis aumenta la expresión de iNOS, mientras que la administración de CT-1 disminuye dicha expresión. En otros escenarios se ha descrito que la administración de CT-1 disminuye los mediadores de la respuesta inflamatoria y entre ellos iNOS (150), lo que apoya también nuestras observaciones. Sin embargo, cuando se administra la CT-1 intravenosa en ratas causa hipotensión sistémica de manera dosis dependiente, demostrándose que la hipotensión es causada por vasodilatación y este efecto es debido a la activación de iNOS. Se ha demostrado que la CT-1 tiene efectos hemodinámicos aparentemente contradictorios con esta observación, pero hay que destacar que no sólo iNOS es el responsable de la hipotensión en este proceso.

La unión de STAT y NF- κ B a las secuencias del promotor que presenta iNOS son necesarias para la activación de iNOS. La activación de p65, juega un importante papel en la expresión de iNOS. En estudios de sepsis *in vivo*, hay activación de NF- κ B, y aumento de la expresión de iNOS, y ambos fenómenos se inhiben totalmente en las ratas tratadas con CT-1 (222). Es posible que el efecto de CT-1 sobre iNOS esté mediado por la menor activación de NF- κ B.

Otra posibilidad de explicación de la menor cantidad de iNOS en el colon de los animales con CU tratados con CT-1 en comparación con los no tratados, es la menor cantidad de macrófagos que se observa en los animales tratados, ya que los macrófagos son una fuente importante de iNOS tisular (223).

Otro punto importante en la inflamación es la acumulación en el tejido de células inflamatorias. En nuestros resultados, la cantidad de macrófagos (células positivas para CD68) era mucho menor en los animales con CU tratados con CT-1 que en los no tratados. Sin embargo, no hemos obtenido diferencias entre los grupos en la actividad de la enzima

mieloperoxidasa. Obtenemos niveles más bajos en el grupo preventivo, pero sin diferencias con los grupos control y simulado. La enzima mieloperoxidasa está presente en los fagosomas de los neutrófilos y de los monocitos fundamentalmente activados. Es responsable de la actividad micromicida contra un amplio espectro de organismos. En la CU, los neutrófilos no juegan un papel determinante como hacen en otro tipo de procesos inflamatorios. Se ha descrito ya que la administración de CT-1 disminuye la acumulación de neutrófilos inducida por endotoxina en el pulmón (178). Los mecanismos implicados en este efecto de la CT-1 sobre la inhibición de la infiltración celular no están del todo claros: podría ser a través de la inhibición por CT-1 de la producción de TNF- α (209), o a través de la inhibición de otras citocinas proinflamatorias. Hay que tener en cuenta que las citocinas como el TNF- α inducen un incremento de la expresión de las CAMs y por lo tanto de la interacción leucocito endotelio. De tal manera que si hay una menor expresión de las CAMs, debida a los menores niveles de TNF- α , habrá menor infiltración de monocitos/neutrófilos asociada a un menor daño.

Además del efecto antiinflamatorio que presenta CT-1, se considera que tiene también un importante efecto antiapoptótico.

Hemos demostrado menor apoptosis en el grupo de ratones que recibió CT-1 mediante el marcador de apoptosis, Caspasa-3 activado, por inmunohistoquímica. Caspasa-3 activada es una proteína que actúa como marcador de apoptosis, cuya activación es obligada para que se lleve a cabo el mecanismo de apoptosis. Se observó una menor cantidad de células que expresan Caspasa-3 en la lámina propia de la mucosa del colon de los animales a los que se administró CT-1.

Los efectos antiapoptóticos de la CT-1 han sido ya documentados en diferentes modelos de daño (224). Por ejemplo, la CT-1 protege de la apoptosis provocada por doxorubicina en miocitos cardiacos *in vitro* (134). También se ha demostrado protección contra la apoptosis inducida en células del pulmón (175). *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 antiapoptótica Bcl-2 (225). La CT-1 también reduce la muerte celular neuronal tanto *in vivo* como *in vitro* (187). 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 (180). También se ha demostrado que CT-1 induce un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90. Este incremento está relacionado con la

protección de muerte celular por estrés isquémico en el pulmón (226). El efecto antiapoptótico de la CT-1 se ha demostrado también en las células β del páncreas en animales a los que se induce diabetes con streptozotocina (227), y en el riñón tras sufrir un daño por isquemia/reperfusión (182) o tras la administración de un contraste iodado (183).

Se ha demostrado que la protección frente a la apoptosis inducida por CT-1 en miocitos cardíacos sometidos a un estrés por isquemia puede estar mediada por la activación de la translocación al núcleo de NF- κ B y la activación transcripcional de la expresión de genes dependientes de NF- κ B con efectos citoprotectores (149). Hay que tener en cuenta que la activación de NF- κ B puede tener efectos proapoptóticos o antiapoptóticos. De ahí la importancia de comprender los mecanismos de señalización a través de los cuales CT-1 actúa sobre NF- κ B. NF- κ B es activado a través de diferentes cascadas de señalización tales como Akt y ERK que fosforilan I κ B, NF- κ B es liberado de la subunidad inhibidora (I κ B), y translocado al núcleo, donde promueve la actividad transcripcional de determinados genes involucrados en inflamación, crecimiento celular y protección antiapoptótica, además de otros genes proapoptóticos (157). Otro de los mecanismos del efecto antiapoptótico de CT-1 podría ser la inhibición de la producción de TNF- α . El TNF- α causa un incremento significativo de la apoptosis debido a un incremento en la activación de la caspasa-3, la proteasa clave en la ejecución de la apoptosis. Además SOCS-1, que hemos visto que se activa por CT-1, suprime la apoptosis inducida por TNF- α posiblemente por la disminución en la caspasa-3 activada y la inhibición de la caspasa-8 activada, por lo que ese podría ser otro mecanismo de acción de CT-1 inhibiendo apoptosis. Este efecto se llevaría a cabo mediante la inhibición de JAK1 por SOCS-1 (228).

La cascada de señales inducida por la CT-1 explica que la CT-1 actúe como una citocina con efectos antiapoptóticos a través de la vía PI3K/Akt (134) y posiblemente como inductora de la proliferación, diferenciación y protección frente al daño a través de la vía JAK/STAT/SOCS.

Nuestros resultados muestran que tanto en el plasma como en el colon hay un aumento del contenido y de la expresión de CT-1 en los ratones del grupo que recibió CT-1 tras la inducción de la colitis. El aumento de los niveles de CT-1 en el colon de estos animales proviene probablemente de la CT-1 administrada de forma exógena, sugiriendo que esta se capta en grandes cantidades por el colon.

En cambio, en el colon no hay un aumento substancial de las cantidades de CT-1 tras la colitis. Estos resultados no son diferentes de los que se han observado en el hígado y en el

riñón, 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 podría actuar de forma paracrina (140,203). Pero esto no es así en todos los modelos de daño. Por ejemplo, los niveles de mRNA de CT-1 estaban muy aumentados en el hígado de ratas adultas 24 horas después de una hepatectomía parcial, y no en el hígado de ratas sin hepatectomía. Por otra lado, cuando hepatocitos cultivados se tratan con una sustancia que induce estrés oxidativo, se observa un gran aumento de la concentración de CT-1 en el medio de cultivo, mientras que en los hepatocitos cultivados sin estrés oxidativo no se observa CT-1 en el medio (140).

Ante los hallazgos descritos y los encontrados en un estudio posterior no publicado, en ratones a los que se administró CT-1 con intención curativa, procedimos a estudiar que ocurría en un grupo de ratones KO para CT-1 a los que se administró DSS por vía oral. Se realizaron dos grupos con 4 ratones en cada uno: un grupo de ratones silvestre WT y otro grupo de ratones KO para CT-1. Se realizó la inducción de la colitis de la misma forma, con la ingesta de DSS en el agua de bebida. Fueron monitorizados durante 7 días, observando que los ratones KO para CT-1 presentaban a partir del día 4, diarrea líquida y sangrado masivo en las heces con deterioro progresivo y rápido del estado general, de tal manera que el día 7 del seguimiento, 2 de los 4 animales murieron. En los animales KO que sobrevivieron, se observaron ulceraciones difusas y visibles en todas las secciones efectuadas, ocupando casi toda la circunferencia de la pared del colon, con muy pocas zonas de mucosa conservada. Estos resultados obtenidos demuestran que CT-1 endógena interviene en el control de la evolución de la colitis. Mejora el cuadro clínico de colitis y previene al daño del colon producido por DSS, ya que, si CT-1 está ausente (KO para CT-1), el daño es mayor.

No conocemos si previamente se ha implicado a CT-1 en los procesos inflamatorios intestinales. Con los resultados obtenidos tras la realización de este estudio, se abre un nuevo campo de investigación sobre la CT-1 en la EII en humanos. CT-1 podría ser un fármaco adecuado para el control de la fase aguda de la CU grave. Hemos efectuado en un segundo tiempo, un estudio utilizando CT-1 con finalidad "curativa" en un modelo animal similar para proceder posteriormente, si los resultados son los esperados, al estudio de CT-1 en diferentes fases de la evolución de la CU en humanos, mediante su medición en plasma y en mucosa de colon. El objetivo de este campo de investigación será conocer la implicación de esta citocina en la actividad inflamatoria de la CU en humanos, y analizar su posible empleo en el futuro

para la prevención del brote agudo de la enfermedad en pacientes corticorresistentes o con fracaso de los tratamientos biológicos.

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 hepático (designation request 07-2449). Por su parte, la Agencia Europea de Medicina, 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, tolerancia y farmacocinética de la 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, un camino muy largo y muy costoso.

Las limitaciones de este estudio han sido:

- No se ha valorado la supervivencia de los ratones tras el cese de CT-1, más allá de los 7 días.
- La dosis de CT-1 administrada se ha extrapolado de otros escenarios y podría ser necesario adecuarlas a la CU grave dado la frecuencia de hipoalbuminemia y el elevado aclaramiento de fármacos que se produce en esta situación.
- CT-1 no es una molécula adecuada para el tratamiento de mantenimiento y sería adecuado diseñar un modelo para fases crónicas de la enfermedad.

VI.- CONCLUSIONES

1. LA ADMINISTRACIÓN PREVENTIVA INTRAVENOSA DE CT-1 PREVIENE EL DAÑO PRODUCIDO POR DSS EN EL COLON
2. CT-1 REDUCE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA COLITIS INDUCIDA POR DSS
3. AL MENOS UNA PARTE DEL EFECTO PROTECTOR DE CT-1 EN LA CU PODRÍA EXPLICARSE POR SU EFECTO EN LA REDUCCIÓN LA APOPTOSIS CELULAR
4. CT-1 PREVIENE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA
5. CT-1 ACTUA A DIFERENTES NIVELES DE LA CASCADA INFLAMATORIA LO CUAL PODRÍA SER UNA VENTAJA FRENTE A LOS NUEVOS FÁRMACOS EXCESIVAMENTE SELECTIVOS
6. CT-1 PUEDE SER UTILIZADA DE FORMA PREVENTIVA PARA DISMINUIR LA GRAVEDAD DE LA CU INDUCIDA POR DSS

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct;14 Suppl 2:S9-11.
- (2) 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.
- (3) Bernstein CN. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* 2010;28(3):406-410.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Jan;17(1):1-5.
- (9) Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013 Dec;62(12):1795-1805.
- (10) 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.
- (11) Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol* 2013 Aug;34(8):371-378.
- (12) 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.
- (13) 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.

- (14) Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.
- (15) 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.
- (16) Kaur N, Chen CC, Luther J, Kao JY. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 2011 Jul-Aug;2(4):211-216.
- (17) 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.
- (18) Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):344-362.
- (19) Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693-733.
- (20) Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, et al. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 2006 Oct 30;25(51):6781-6799.
- (21) 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.
- (22) Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 2010 Jan;20(1):24-33.
- (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) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) 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.

- (29) Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2-6; discussion 16-9.
- (30) 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.
- (31) Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006 Mar;55(3):426-431.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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. *J Crohns Colitis* 2012 Dec;6(10):965-990.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) TRUELOVE SC, WITTS LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955 Oct 29;2(4947):1041-1048.
- (39) Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, Colombel JF. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010 Jan;7(1):15-29.
- (40) 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.
- (41) 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.

- (42) Safdi M, DeMicco M, Sninsky C, Banks P, Wruble L, Deren J, et al. A double-blind comparison of oral versus rectal mesalamine versus combination therapy in the treatment of distal ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997 Oct;92(10):1867-1871.
- (43) 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.
- (44) 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.
- (45) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with systemic and topical corticosteroids. *J Intern Med* 2005 Apr;257(4):374-384.
- (46) 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.
- (47) 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.
- (48) PALMER WL, KIRSNER JB, MARSHALL H. Therapeutic considerations in chronic ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 1950 Apr;32(4):627-639.
- (49) Farmer RG. The clinical evolution of inflammatory bowel disease, 1960-2010: an eyewitness account. *Am J Gastroenterol* 2010 Sep;105(9):1922-1924.
- (50) Hanauer SB. The role of biologics in ulcerative colitis. *Dig Dis* 2010;28(3):497-500.
- (51) Isaacs JD. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? *Nat Rev Immunol* 2010 Aug;10(8):605-611.
- (52) Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009 Apr;136(4):1182-1197.
- (53) Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010 Oct;9(10):767-774.
- (54) Thia KT, Loftus EV, Jr, Sandborn WJ, Yang SK. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* 2008 Dec;103(12):3167-3182.
- (55) Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 Jun 15;474(7351):307-317.
- (56) Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review. *Dig Dis Sci* 2015 Feb;60(2):290-298.

- (57) Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988 Mar;29(3):352-357.
- (58) Montgomery SM, Ekblom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2002 Jul;18(4):416-420.
- (59) Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am J Gastroenterol* 2012 Sep;107(9):1399-1406.
- (60) Ryan WR, Allan RN, Yamamoto T, Keighley MR. Crohn's disease patients who quit smoking have a reduced risk of reoperation for recurrence. *Am J Surg* 2004 Feb;187(2):219-225.
- (61) Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004 Jun;18(3):481-496.
- (62) Cosnes J. What is the link between the use of tobacco and IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008 Oct;14 Suppl 2:S14-5.
- (63) Bergeron V, Grondin V, Rajca S, Maubert MA, Pigneur B, Thomas G, et al. Current smoking differentially affects blood mononuclear cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis: relevance to its adverse role in the disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012 Jun;18(6):1101-1111.
- (64) Zhong D, Brower-Sinning R, Firek B, Morowitz MJ. Acute appendicitis in children is associated with an abundance of bacteria from the phylum Fusobacteria. *J Pediatr Surg* 2014 Mar;49(3):441-446.
- (65) Jackson HT, Mongodin EF, Davenport KP, Fraser CM, Sandler AD, Zeichner SL. Culture-independent evaluation of the appendix and rectum microbiomes in children with and without appendicitis. *PLoS One* 2014 Apr 23;9(4):e95414.
- (66) Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Theissig F, Ruckert JC, Ismail M, et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* 2011 Jan;60(1):34-40.
- (67) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011 Oct 7;334(6052):105-108.
- (68) David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014 Jan 23;505(7484):559-563.
- (69) Cabre E, Domenech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2012 Aug 7;18(29):3814-3822.
- (70) Chapman-Kiddell CA, Davies PS, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010 Jan;16(1):137-151.
- (71) Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2011 Apr;106(4):563-573.

- (72) Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjonneland A, Vogel U. Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2012 Mar;44(3):185-194.
- (73) Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol* 2007 Sep;102(9):2016-2025.
- (74) Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O'Kennedy N, Soderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut* 2010 Oct;59(10):1331-1339.
- (75) Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Fuchs CS, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2014 May;63(5):776-784.
- (76) Jantchou P, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am J Gastroenterol* 2010 Oct;105(10):2195-2201.
- (77) Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004 Dec;80(6 Suppl):1717S-20S.
- (78) Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM, Bao Y, Korzenik JR, Giovannucci EL, et al. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012 Mar;142(3):482-489.
- (79) Ananthakrishnan AN, Cagan A, Gainer VS, Cai T, Cheng SC, Savova G, et al. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Aug;19(9):1921-1927.
- (80) 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.
- (81) Ananthakrishnan AN, Cheng SC, Cai T, Cagan A, Gainer VS, Szolovits P, et al. Association between reduced plasma 25-hydroxy vitamin D and increased risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014 May;12(5):821-827.
- (82) Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012 Mar 6;156(5):350-359.
- (83) Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Richter JM, Feskanich D, Fuchs CS, et al. Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013 Aug;62(8):1153-1159.
- (84) 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.

- (85) Ananthakrishnan AN, Gainer VS, Perez RG, Cai T, Cheng SC, Savova G, et al. Psychiatric comorbidity is associated with increased risk of surgery in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013 Feb;37(4):445-454.
- (86) Sun Y, Zhang M, Chen CC, Gilliland M, 3rd, Sun X, El-Zaatari M, et al. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice. *Gastroenterology* 2013 Jun;144(7):1478-87, 1487.e1-8.
- (87) Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011 Mar;25(3):397-407.
- (88) Ananthakrishnan AN, Long MD, Martin CF, Sandler RS, Kappelman MD. Sleep disturbance and risk of active disease in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013 Aug;11(8):965-971.
- (89) Ananthakrishnan AN, Issa M, Binion DG. Clostridium difficile and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2009 Dec;38(4):711-728.
- (90) Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG. Excess hospitalisation burden associated with Clostridium difficile in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2008 Feb;57(2):205-210.
- (91) Gradel KO, Nielsen HL, Schonheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009 Aug;137(2):495-501.
- (92) Jess T, Simonsen J, Nielsen NM, Jorgensen KT, Bager P, Ethelberg S, et al. Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 2011 Mar;60(3):318-324.
- (93) Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec;106(12):2133-2142.
- (94) Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014 May;146(6):1489-1499.
- (95) Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012 Apr 16;13(9):R79-2012-13-9-r79.
- (96) Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2012 May;18(5):968-984.
- (97) Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004 Aug;127(2):412-421.

- (98) Martin R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, et al. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis* 2014 Mar;20(3):417-430.
- (99) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Oct 28;105(43):16731-16736.
- (100) Jess T, Riis L, Vind I, Winther KV, Borg S, Binder V, et al. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Apr;13(4):481-489.
- (101) Sutherland L, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006 Apr 19;(2)(2):CD000544.
- (102) Kruis W, Jonaitis L, Pokrotnieks J, Mikhailova TL, Horynski M, Batovsky M, et al. Randomised clinical trial: a comparative dose-finding study of three arms of dual release mesalazine for maintaining remission in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011 Feb;33(3):313-322.
- (103) Velayos FS, Loftus EV, Jr, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* 2006 Jun;130(7):1941-1949.
- (104) van Staa TP, Card T, Logan RF, Leufkens HG. 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut* 2005 Nov;54(11):1573-1578.
- (105) Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology* 2009 Oct;137(4):1250-60; quiz 1520.
- (106) Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;105:263-320.
- (107) 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.
- (108) 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.
- (109) 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.

- (110) 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.
- (111) MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978;17(2):135-150.
- (112) Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004 Sep-Oct;50(2):81-92.
- (113) 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.
- (114) 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.
- (115) 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.
- (116) 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.
- (117) 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.
- (118) 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.
- (119) 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.
- (120) Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995 Aug 15;86(4):1243-1254.
- (121) 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.
- (122) Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 2004 Jan;20(1):23-32.
- (123) 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.

- (124) 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.
- (125) 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.
- (126) 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.
- (127) 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.
- (128) Hendry L, John S. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *Eur J Biochem* 2004 Dec;271(23-24):4613-4620.
- (129) 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.
- (130) 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.
- (131) Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007 Jun;7(6):454-465.
- (132) 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.
- (133) 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.
- (134) 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.
- (135) Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003 Dec 8;22(56):8983-8998.
- (136) 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.

- (137) Brar BK, Stephanou A, Liao Z, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, et al. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovasc Res* 2001 Aug 1;51(2):265-274.
- (138) Brar BK, Stephanou A, Pennica D, Latchman DS. CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways. *Cytokine* 2001 Nov 7;16(3):93-96.
- (139) Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol* 2007 Jul;102(4):279-297.
- (140) 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.
- (141) 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.
- (142) Song J, Zhang YW, Yao AH, Yu Y, Hua ZY, Pu LY, et al. Adenoviral cardiotrophin-1 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat small-for-size liver transplantation model. *Transpl Int* 2008 Apr;21(4):372-383.
- (143) 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.
- (144) 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.
- (145) 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.
- (146) 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.
- (147) Baines CP, Molkenin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2005 Jan;38(1):47-62.
- (148) Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009 Apr;53(4):425-435.

- (149) 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.
- (150) 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.
- (151) 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.
- (152) 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.
- (153) 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.
- (154) Fritzenwanger M, Meusel K, Foerster M, Kueth F, Krack A, Figulla HR. Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human monocytes. *Cytokine* 2007 Jun;38(3):137-144.
- (155) 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.
- (156) 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.
- (157) Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008 Nov;8(11):837-848.
- (158) 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.
- (159) 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.
- (160) Latchman DS. Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int J Exp Pathol* 1999 Aug;80(4):189-196.
- (161) 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.

- (162) 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.
- (163) 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.
- (164) 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.
- (165) 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.
- (166) 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.
- (167) 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.
- (168) 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.
- (169) Stejskal D, Ruzicka V. Cardiotrophin-1. Review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008 Jun;152(1):9-19.
- (170) 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.
- (171) Funamoto M, Hishinuma S, Fujio Y, Matsuda Y, Kunisada K, Oh H, et al. Isolation and characterization of the murine cardiotrophin-1 gene: expression and norepinephrine-induced transcriptional activation. *J Mol Cell Cardiol* 2000 Jul;32(7):1275-1284.
- (172) Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Osugi T, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000 Apr 7;275(14):10561-10566.
- (173) 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.
- (174) 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.

- (175) 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.
- (176) 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.
- (177) 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.
- (178) 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.
- (179) 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.
- (180) 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.
- (181) 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.
- (182) 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.
- (183) 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.
- (184) 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.
- (185) 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.
- (186) 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.
- (187) 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.

- (188) 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.
- (189) 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.
- (190) 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.
- (191) Kriegelstein 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.
- (192) Kriegelstein 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.
- (193) Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007;2(3):541-546.
- (194) 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.
- (195) 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.
- (196) 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.
- (197) Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982 Mar;78(3):206-209.
- (198) Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 1985 Nov;14(3):157-167.
- (199) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
- (200) 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.

- (201) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-685.
- (202) 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.
- (203) Porras M, Martin MT, Soler M, Vergara P. Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Jul;287(1):G58-64.
- (204) Porras M, Martin MT, Yang PC, Jury J, Perdue MH, Vergara P. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006 Sep;12(9):843-852.
- (205) Porras M, Martin MT, Teran E, Mourelle M, Vergara P. The nitric oxide donor LA-419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)thioacetate] prevents intestinal dysmotility, bacterial translocation, and inflammation in a rat model of enteritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Feb;324(2):740-748.
- (206) Lozano Sanchez F, Garcia Criado FJ, Garcia Garcia I, Munoz de la Espada B, Garcia Sanchez E, Martin Vicente V, et al. An experimental model of bacterial translocation. *Nutr Hosp* 1993 Sep-Oct;8(7):405-410.
- (207) 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.
- (208) Fritzenwanger M, Meusel K, Jung C, Franz M, Wang Z, Foerster M, et al. Cardiotrophin-1 induces tumor necrosis factor alpha synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Mediators Inflamm* 2009;2009:489802.
- (209) 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.
- (210) 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.
- (211) Nguyen P. STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease?. *J Interferon Cytokine Res* 2015 Mar 11.
- (212) Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:1-38.

- (213) 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.
- (214) Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009 Jul 6;206(7):1465-1472.
- (215) 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.
- (216) 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.
- (217) Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesselin DG, Yin Z, et al. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 18;100(4):1879-1884.
- (218) Liu X, Lee YS, Yu CR, Egwuagu CE. Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J Immunol* 2008 May 1;180(9):6070-6076.
- (219) Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000 May;6(5):583-588.
- (220) Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007 Mar;117(3):514-521.
- (221) Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* 2009 Apr 1;82(1):59-66.
- (222) 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.
- (223) Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol* 2015 Mar;36(3):161-178.
- (224) 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.
- (225) 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.

(226) Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997 Jul;273(1 Pt 1):L1-9.

(227) Jimenez-Gonzalez M, Jaques F, Rodriguez S, Porciuncula A, Principe RM, Abizanda G, et al. Cardiotrophin 1 protects beta cells from apoptosis and prevents streptozotocin-induced diabetes in a mouse model. *Diabetologia* 2013 Apr;56(4):838-846.

(228) Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 2006 Sep;26(3):226-234.