

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE COLITIS EN RATONES KNOCKOUT INDUCIBLES PARA ADRENOMEDULINA

Sonia Martínez Herrero

Máster en Investigación en Ciencias de la Salud

Curso 2013/2014

D. ALFREDO MARTÍNEZ RAMÍREZ, Doctor en Biología Celular y Jefe de Grupo del Área de Oncología del Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR),

CERTIFICA:

Que el Trabajo Fin de Máster realizado bajo mi dirección por la Licenciada en Biología **SONIA MARTÍNEZ HERRERO** titulado: “**Caracterización de un modelo de colitis en ratones knockout inducibles para adrenomedulina**”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar a la consecución del título de Máster Oficial en Ciencias de la Salud expedido por la Universidad Pública de Navarra.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo la presente en Logroño, a cinco de junio de 2014.

Fdo.



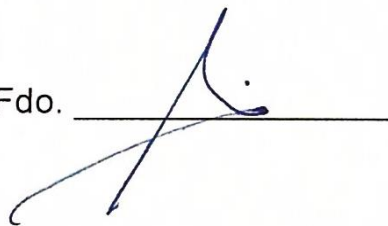
Dr Alfredo Martínez Ramírez

D. MIGUEL ÁNGEL BARAJAS VÉLEZ, Doctor en Biología e Investigador Contratado por la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona, Navarra) y Profesor Asociado de la Universidad Pública de Navarra (UPNA),

CERTIFICA:

Que el Trabajo Fin de Máster realizado bajo mi dirección por la Licenciada en Biología **SONIA MARTÍNEZ HERRERO** titulado: **“Caracterización de un modelo de colitis en ratones knockout inducibles para adrenomedulina”**, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar a la consecución del título de Máster Oficial en Ciencias de la Salud expedido por la Universidad Pública de Navarra.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo la presente en Pamplona a cuatro de Junio de 2014.

Fdo. 

Dr. Miguel Ángel Barajas Vélez

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) y financiado por Fundación Rioja Salud y el Instituto de Salud Carlos III (PI13/02166).

Consejería de Salud y Servicios Sociales. Gobierno de La Rioja.

Logroño, La Rioja, España.

A mis padres,
por apoyarme siempre, sin importar lo que eso
pudiese suponer para ellos.

A mi pareja, Darwin,
por quererme y aceptarme tal como soy y
soportar pacientemente todos mis ataques de
nervios.

A mi pequeño Meeko,
porque por muy negro que haya sido el día,
cuando llego a casa siempre eres capaz de
hacerme reír.

Sin vosotros no habría sobrevivido a este año.

Este trabajo está especialmente dedicado a todas las personas que sufren una enfermedad crónica intestinal.

Porque solo nosotros entendemos lo que esto supone realmente. La angustia que se vive los primeros meses, en los que no entiendes qué le está pasando a tu cuerpo, hasta que tienes un diagnóstico definitivo. La desesperación que se sufre durante los mil y un ensayos de prueba-error hasta que consiguen hallar la dosis adecuada de medicación para ti. El esfuerzo que supone tener que re-adaptar todo tu estilo de vida y tus pautas de alimentación. La intranquilidad que genera no saber cuándo llegará el siguiente brote... Por todo esto, y mucho más, este trabajo es para vosotros, por la lucha y la capacidad de superación que demostráis día tras día.

Desde mi experiencia personal solo puedo recomendaros tres cosas: rodearos de personas que os quieran, aprended a vivir con calma, y sobre todo, reíros mucho. Porque aunque la enfermedad tiene muchos momentos oscuros, lo importante es sobreponerse y no dejarse vencer por el desánimo. Ante esto, la risa es la mejor terapia.

Y sobre todo recordad, puede que estemos “crónicamente” enfermos, pero también somos “crónicamente” maravillosos.

“Tener una enfermedad crónica es difícil. Nunca sé cuándo tendré un buen día, y en cualquier momento mis síntomas pueden aparecer. Eso hace que sea difícil para mí planificar las cosas o incluso tener un calendario regular. Si cancelo planes contigo, no lo tomes como algo personal. No soy una persona huraña. Solo estoy enferma”.

Lema de la campaña “Crohn’s Disease Awareness”.

Agradecimientos

Este año ha sido especialmente duro a todos los niveles (trabajo, clases, exámenes, realizar el Trabajo Fin de Máster, los interminables viajes Sojuela-Logroño-Pamplona, el estrés...), y son muchas las cosas que tengo que agradecer y a muchas personas... Así que, querido lector, se paciente.

En primer lugar, gracias de nuevo a mis padres, a mi novio, y a mi chinchilla, sois mi principal apoyo y si no os tuviese, no sé si algunos días sería capaz de levantarme de la cama. Pero a vosotros ya os he dedicado el trabajo entero, así que no me extenderé más, no seáis acaparadores.

En segundo lugar, muchísimas gracias a mis dos directores de Trabajo Fin de Máster:

Gracias al Dr. Alfredo Martínez, por creer en mí hace cuatro años, cuando acababa de licenciarme y estaba más verde que una lechuga, y darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo. Gracias por toda tu orientación, tus consejos, tus enseñanzas y tu paciencia durante todo este tiempo. Por seguir mostrando un entusiasmo contagioso por la investigación a pesar de llevar tanto camino recorrido en este mundo.

Y gracias al Dr. Miguel Barajas, por su apoyo y dedicación en este trabajo. Sin todas sus correcciones, sugerencias, aportaciones y ánimos, este trabajo no sería el que es.

Gracias a todos mis compañeros del CIBIR, por acogerme tan bien y ser un ejemplo de trabajo y compañerismo. En especial, gracias a todo mi grupo por aguantar pacientemente mis miles de dudas y preguntas, por brindarme siempre vuestra ayuda y apoyo, y servirme de guía en este proceso de introducción a la investigación científica. Os debo mucho a todos, pero hay dos personas especialmente importantes para mí, sin las cuales todo este trabajo no habría sido posible.

Iñaki, ni con toda la sección de chocolates del Mercadona y el Carrefour juntos podría compensarte por todo lo que me has ayudado. Si existiese el puesto de co-director adjunto de Trabajo Fin de Máster, sin duda sería para ti. En cada paso del camino has estado a mi lado, para lo bueno y para lo malo. Has aguantado mis momentos de crisis, me has dado ánimos, me has introducido en el "lado oscuro" de la investigación (los softwares informáticos con aplicaciones en Biología). Sin tu paciencia para enseñarme a usar el programa de captura de imágenes, el programa

Fiji, y el GraphPad, me habría sentido más perdida que un pulpo con un guante. En resumen, gracias por ser como eres y por estar siempre ahí cuando te necesito.

Gracias a la mejor “Técnico especialista en Anatomía Patológica y Citología, y Citotécnico Internacional” del mundo. Judit, sin tus maravillosas preparaciones histológicas este trabajo habría sido un desastre. Si hubiese tenido que cortar yo los bloques de parafina al microtomo, habría medido el grosor de la mucosa y la submucosa de lonchas de mortadela. Y, sobre todo, gracias por ser mi amiga y mi mayor apoyo en el laboratorio. Solo tú entiendes mi peculiar sentido del humor. Sin ti, los días de trabajo serían mucho más aburridos y grises.

A los chicos del animalario, Laura, Héctor y Raluca, por hacer su trabajo a la perfección y asegurarse de que los ratoncitos están perfectamente cuidados y atendidos. Gracias en mi nombre, y en el de todos los ratones del animalario.

En lo personal, quiero darles las gracias a todos los miembros de mi numerosa familia (a mis abuelos Felipe, Petra y Casimiro; a mis tíos Sixto, Matilde, Chus, Santi, Víctor, Bea, Carlos, Elisabeth, Óscar y Mari; a mis primos Juan, Alberto, Ander y Elisabeth; y a los peques de la casa recién incorporados a la familia, Alba e Imanol). Gracias por vuestra forma de ser, porque solo vosotros podéis convertir algo tan tedioso como hacer árboles genealógicos para la asignatura de Genética Humana del Máster, en una anécdota digna de ser contada a las generaciones futuras (¡que vivan los pelopicos y los lenguarollos!). Siempre me habéis apoyado y ayudado en todas y cada una de las locuras que he hecho a lo largo del tiempo. Sin todos vosotros no sería cómo soy, ni habría llegado tan lejos. Llevo un poquito de cada uno dentro de mí. Sois muchos, y me gustaría poder dedicaros un párrafo entero a cada uno, pero como no quiero convertir esto en una novela sensiblera, permitidme que solo les dedique unas palabras a tres de vosotros (a los demás prometo daros un abrazo especialmente fuerte la próxima vez que os vea e invitaros a una barbacoa en mi casa). A mi abuela Carmen, que ya no está entre nosotros, pero que estoy segura de que me sigue cuidando cada día desde ahí arriba. A mi tío Óscar, por ser un ejemplo de lucha y superación constante. Y a mi tía Chus, gracias por quererme de una forma incondicional (como solo una madre querría a una hija a pesar de los problemas que esta le cause), y por buscar y aprender a hacer recetas adaptadas a mis necesidades especiales, ahora yo también puedo seguir disfrutando de las comidas familiares.

Y por último, es imposible que me olvide de las grandes estrellas de este trabajo. Gracias a título póstumo a todos mis ratones, sin vosotros este trabajo sí que habría sido imposible. Casi nadie os reconoce el mérito, pero la ciencia y la investigación científica no habrían avanzado tanto ni serían lo que son sin vosotros. Os debemos mucho. Solo espero de corazón, a pesar todo, haberos cuidado y tratado con el

respecto que os merecáis. ¡Ah!, y gracias por no mordirme ni una sola vez. Prometo repartir una ración extra de pipas entre los ratones del animalario en vuestro honor.

Siento si me olvido de alguien, pero mi memoria ya no es la que era. Solo puedo concluir este apartado dando gracias de corazón a todos los que cada día me dedicáis una sonrisa, una palabra amable, un abrazo... Creo que realmente no sois conscientes de lo que valoro todos esos gestos, y de la fuerza que me dan para seguir avanzando cada día a pesar de los problemas. Sois mis pequeñas baterías de energía. ¡GRACIAS!.

“Cada persona que conoces está luchando una batalla de la que no sabes nada. Por eso, se amable siempre”.

Ian Maclaren.

ÍNDICE

ÍNDICE:

1. LISTA DE ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES	11
3.1.1. Principales tratamientos	18
3.1.1.1. Aminosalicilatos	18
3.1.1.2. Corticosteroides	19
3.1.1.3. Inmunomoduladores: azatioprina/6-Mercaptopurina	20
3.1.1.4. Anticuerpos anti-TNF α	20
3.1.1.5. Otras terapias biológicas	21
3.1.2. Problemas no resueltos por las terapias actuales y sus efectos secundarios.....	22
3.1.2.1. Efectos secundarios de la terapia con corticosteroides	25
3.1.2.2. Efectos secundarios de la terapia con inmunomoduladores: AZA/6-MP.....	26
3.1.2.3. Efectos secundarios de la terapia con anticuerpos anti-TNF α	27
3.1.2.4. Grupos de pacientes de alto riesgo	28
3.2. LA ADRENOMEDULINA	31
3.2.1. Estructura de la adrenomedulina	31
3.2.2. Síntesis y secreción al medio de la adrenomedulina	32
3.2.3. Metabolismo de la adrenomedulina	34
3.2.4. Los receptores de la adrenomedulina y su distribución	34
3.2.5. Mecanismos de transducción de señales de la adrenomedulina.....	36
3.2.6. Acciones fisiológicas de la adrenomedulina	38
3.3. EL USO DE LA ADRENOMEDULINA COMO TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES	43
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	53
5.1. GENERACIÓN DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS	53
5.2. GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS	55
5.2.1. Extracción del ADN genómico	55
5.2.2. Genotipado de ratones mediante PCR	56
5.3. ESTUDIO PILOTO: GENERACIÓN DE LOS RATONES KO	58
5.3.1. Animales	59
5.3.2. Extracción del ADN genómico de los órganos	60
5.3.3. Comprobación de la delección del gen de la adrenomedulina mediante PCR.....	60
5.4. INDUCCIÓN DE LA DELECCIÓN DEL GEN DE LA ADRENOMEDULINA	61
5.5. INDUCCIÓN DE LA COLITIS Y DISEÑO DEL ESTUDIO	61
5.5.1. Animales	61
5.5.2. Inducción de la colitis aguda	62
5.5.3. Evaluación de la severidad de la colitis aguda.....	63
5.5.4. Recogida de muestras	64

5.5.5. Estudios histológicos	65
5.5.6. Evaluación de la infiltración leucocitaria.....	66
5.5.7. Análisis estadísticos.....	69
6. RESULTADOS	73
6.1. GENERACIÓN Y GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS	73
6.2. ESTUDIO PILOTO: GENERACIÓN DE LOS RATONES KO	75
6.3. INDUCCIÓN DE LA COLITIS AGUDA	77
6.3.1. Evaluación de la severidad de la colitis aguda.....	77
6.3.2. Estudios histológicos	87
6.3.3. Evaluación de la infiltración leucocitaria.....	96
7. DISCUSIÓN	101
7.1. GENERACIÓN DE RATONES KO TOTALES PARA ADRENOMEDULINA.....	101
7.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE COLITIS AGUDA EN RATONES KO PARA ADRENOMEDULINA.....	104
7.2.1. La ausencia de adrenomedulina aumenta la severidad clínica del modelo de colitis aguda inducido por TNBS, acelerando el inicio y agravando la patología.....	105
7.2.2. La ausencia de adrenomedulina provoca un aumento de los parámetros macroscópicos de inflamación local y promueve la recirculación linfocitaria desde el bazo	108
7.2.3. La ausencia de adrenomedulina aumenta de forma significativa las respuestas inflamatorias a nivel de la mucosa y la submucosa	110
7.2.4. La ausencia de adrenomedulina parece causar un aumento moderado de infiltrados de tipo leucocitario a nivel local.....	113
7.3. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	116
7.3.1. Estudios sobre la relación entre la adrenomedulina y la microbiota intestinal en la colitis aguda	116
7.3.2. Traslación de resultados: posible relación entre niveles bajos de adrenomedulina y un peor pronóstico y respuestas al tratamiento en pacientes con IBD	117
7.3.3 Posibles tratamientos farmacológicos basados en el sistema de la adrenomedulina.....	118
8. CONCLUSIONES	123
9. BIBLIOGRAFÍA	127

LISTA DE ABREVIATURAS

1. LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-ASA: 5-aminosalicilatos
- 6-MP: 6-Mercaptopurina
- 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina: ADHP
- AIC: Amplitud intercuartílica
- AM: Adrenomedulina
- AMPc: Adenosín monofosfatos cíclico
- AMR: Receptores de AM; del inglés *Adrenomedullin receptors*
- AP-2: Proteína activadora 2; del inglés *Activation protein-2*
- ATG: Proteína relacionada con la autofagia; del inglés *Autophagy-related protein*
- AZA: Azatioprina
- BSA: Seroalbúmina bovina; del inglés *Bovine serum albumin*
- CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina; del inglés *Calcitonin gene related peptide*
- CLR: Receptor similar al receptor de la calcitonina; del inglés *Calcitonin receptor-like receptor*
- cm: Centímetro
- CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad
- CU: Colitis ulcerosa
- DSS: Dextrano sulfato de sodio
- EC: Enfermedad de Crohn
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- ERK: Proteín quinasas reguladas por señales extracelulares; del inglés *Extracellular-signal-regulated kinases*
- FDA: Agencia de alimentos y medicamentos; del inglés *Food and Drug Agency*
- GALT: tejido linfoide asociado a tracto digestivo; del inglés *gut associated lymphoid tissue*
- GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HETAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio; del inglés *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide*
- HIF: Factor inducido por hipoxia; del inglés *Hypoxia-inducible factor*
- HLA: Antígeno leucocitario humano; del inglés *Human leukocyte antigen*
- HREs: Elementos de respuesta a hipoxia; del inglés *Hypoxia-Response Elements*
- IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal; del inglés *Inflammatory Bowel Disease*
- IC: Intervalo de confianza
- IFN-γ: Interferon-γ
- IL: Interleucina
- IRF: Factor de regulación del interferón; del inglés *Interferon regulatory factor*
- LNH: Linfomas no-Hodgkin
- MAPK: Proteín quinasas activadas por mitógenos; del inglés *Mitogen-activated protein kinase*

- Me: Mediana
- mM: milimolar
- MPO: mieloperoxidasa
- MST: Estimulador de macrófagos; del inglés *Macrophage-stimulating protein*
- n: Tamaño muestral
- NaCl: cloruro sódico
- NO: Óxido nítrico; del inglés *Nitric oxide*
- PAMP: Péptido aminoterminal de la proadrenomedulina
- pb: pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés *Polymerase chain reaction*
- PI3K: Fosfoinositol-3-quinasa; del inglés *Phosphatidylinositol 3-kinase*
- PK: Proteín quinasa; del inglés *Protein kinase*
- RAMP: Proteínas modificadoras de la actividad del receptor; del inglés *Receptor activity-modifying proteins*
- rTA-M2: Transactivador reverso activado por tetraciclina; del inglés *Reverse tetracycline-controlled transactivator*
- SEM: Erro estándar de la media; del inglés *Standard error of the mean*
- SDS: Dodecilsulfato sódico; del inglés *Sodium dodecyl sulfate*
- SNP: Polimorfismo de nucleótido simple; del inglés *Single nucleotide polymorphism*
- tetO: Elemento promotor de respuesta a tetraciclina; del inglés *Tetracycline-controlled transcriptional activation operator*
- TNBS: Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico; del inglés *2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid*
- TNF: Factor de necrosis tumoral; del inglés *Tumor necrosis factor*
- μL : Microlitro
- μm : Micrómetro
- VSMC: Células musculares lisas vasculares; del inglés *Vascular smooth muscle cells*
- \bar{x} : Media aritmética

RESUMEN

2. RESUMEN

Introducción: La adrenomedulina (AM) es un péptido biológicamente activo que es capaz de mejorar el pronóstico y progresión de las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), tanto en modelos animales, como en estudios piloto en pacientes con colitis ulcerosa severa. Recientemente se ha descubierto un polimorfismo en el gen de la AM que conduce a niveles plasmáticos más bajos de esta hormona en individuos portadores, lo que podría tener como consecuencia una mayor predisposición a padecer IBD, así como una mayor severidad clínica y/o una peor respuesta al tratamiento de estas enfermedades. Para conseguir una demostración formal de los efectos que los niveles endógenos de AM puedan tener en las IBD se necesita un abordaje genético, en el que se delecione este gen de todo el organismo.

Objetivo: Pretendemos generar el primer modelo knock-out (KO) para AM viable, que permita establecer si existe o no relación entre la expresión de AM y el desarrollo y grado de patogénesis de las IBD. La hipótesis de la que partimos es que la ausencia de AM conducirá a una mayor severidad de la enfermedad.

Material y métodos: Dado que la supresión sistémica del gen de la AM desde el momento de la concepción causa la muerte de los embriones, se ha generado un KO inducible usando la tecnología Cre//oxP combinada con el sistema de inducción mediado por doxiciclina, tet-On. La colitis aguda se indujo a los ratones, machos y hembras, mediante una instilación rectal de TNBS en etanol al 50%; los ratones controles recibieron el mismo volumen de NaCl en etanol al 50%. El procedimiento duró 5 días, durante los cuales se evaluó el peso de los animales y el índice de severidad de la enfermedad. Una vez finalizado el procedimiento se evaluó la respuesta inflamatoria en todos los ratones mediante el análisis del peso del colon y del bazo, como marcadores macroscópicos de inflamación; mediante el análisis histomorfométrico de preparaciones histológicas de colon; y mediante la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) como indicador de infiltración leucocitaria.

Resultados: La inducción de la deleción en ratones adultos generó animales KO viables, sin anomalías aparentes. La administración de TNBS causa en los ratones KO, especialmente las hembras, una colitis mucho más grave en comparación con los ratones wild-type (WT) tratados con TNBS. La deleción del gen de la AM causó diarreas más intensas, acompañadas de hemorragias, anorexia y un aumento significativo en el peso del colon. El análisis histológico de los ratones KO tratados con TNBS confirmó los datos del estudio macroscópico, mostrando zonas extensas de infiltrados de linfocitos en la mucosa y submucosa que destruyen la arquitectura del

tejido. La actividad de la MPO mostró una tendencia a aumentar en los ratones KO, tanto tratados como control, lo que podría significar que ante la ausencia de AM existe una mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Conclusiones: Todos los resultados de este trabajo apoyan el papel protector de la AM endógena frente al desarrollo de la colitis aguda inducida en ratón, siendo su efecto especialmente beneficioso en las hembras.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

El término de Enfermedades Inflammatorias Intestinales (IBD, del inglés Inflammatory Bowel Disease) se usa para englobar a la colitis ulcerosa (CU) y a la enfermedad de Crohn (EC), ya que, ambas son dos trastornos inflamatorios crónicos del sistema digestivo con una común patofisiología de tipo inmune (1). Ambas cursan con dolor abdominal, hábitos intestinales alterados e irregulares, y distensión abdominal.

En el caso concreto de la CU, la zona del tracto gastrointestinal más afectada es el colon, de una forma difusa, continua y superficial. La inflamación puede extenderse desde el ano hasta el colon proximal en distintos grados (2). Como el recto se encuentra inevitablemente afectado, los síntomas más comunes en estos pacientes son el sangrado rectal, la sensación de tenesmo rectal y la diarrea (2). Los sistemas actuales de clasificación de la enfermedad, como la clasificación Montreal (Tabla 1) (3), el índice Lichtiger (4) o el índice Mayo (5), se basan en la evaluación de la severidad de los síntomas y de la extensión y gravedad de la inflamación colorrectal. Además, cerca del 20% de los pacientes presentan patologías inflamatorias de tipo inmune en otros órganos (6, 7). El hígado se encuentra afectado en el 5% de los pacientes (colangitis esclerosante primaria y enfermedad autoinmune hepática), las articulaciones en el 20% de los casos (artritis seronegativa, sacroileítis y espondilitis anquilosante), los ojos en el 5% (escleritis, episcleritis y uveítis anterior) y la piel en el 5% de los pacientes (eritema nodoso y pioderma gangrenoso).

Extensión	Anatomía	Severidad	Definición
E1: proctitis ulcerosa	Limitada al recto	S0: remisión clínica	Asintomática.
E2: colitis ulcerosa en el lado izquierdo	Limitada a una proporción desde el colon distal hasta el ángulo esplénico	S1: leve	≤4 deposiciones/día (con o sin sangre), ausencia de síntomas sistémicos, y marcadores inflamatorios normales.
		S2: moderada	≥ 4 deposiciones/día pero signos mínimos de toxicidad sistémica.
E3: colitis ulcerosa extensa	Extensión próxima al ángulo esplénico	S3: severa	≥ 6 deposiciones sanguinolentas/día, pulso ≥90latidos/minuto, temperatura ≥37.5°C, hemoglobina < 105g/L, y velocidad de sedimentación globular ≥ 30mm en la primera hora.

Tabla 1. Clasificación Montreal de la colitis ulcerosa (3).

La EC es más compleja, debido a que puede afectar a todo el tracto gastrointestinal, desde el esófago hasta el ano, y a que la inflamación es transmural, con úlceras penetrantes que llegan a las capas profundas de las paredes gastrointestinales (8). El 50% de los pacientes muestran afectación en la zona terminal del íleon y en el colon, aunque normalmente no llega a afectar al recto (solo el 25% de los pacientes muestran complicaciones perianales) (8). Existen numerosos sistemas de clasificación de la enfermedad que suelen usarse mayoritariamente en ensayos clínicos. Sin embargo, en la práctica clínica lo normal es emplear la que se considera la prueba estándar o el patrón de oro, el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (Tabla 2) (8), que se basa en la evaluación de la severidad de los síntomas clínicos, la localización anatómica de la enfermedad, la extensión de las lesiones y el fenotipo de la enfermedad (penetrante, estenosante o inflamatorio). Los síntomas más comunes son dolor abdominal agudo, diarrea, vómitos, fatiga y pérdida de peso. Además, entre el 20 y el 40% de los pacientes padecen manifestaciones extraintestinales, derivadas de la propia enfermedad o de efectos secundarios de los tratamientos (6, 7). El 33% de los pacientes sufren artritis, el 10% padecen estomatitis aftosa, entre el 5 y el 15% tienen manifestaciones patológicas cutáneas (eritema nodoso y psoriasis) y el 6% manifiestan algún tipo de patología ocular (escleritis, episcleritis y uveítis anterior).

Variable	Descripción	Puntuación	Factor de multiplicación
Número de deposiciones líquidas	Suma de los últimos 7 días		2
Dolor abdominal	A considerar los últimos 7 días	0=nada 1=leve 2=moderado 3=severo	5
Estado general	En los últimos 7 días	0=bueno 1=ligeramente malo 2=malo 3=muy malo 4=terrible	7
Complicaciones extraintestinales	Número de complicaciones	Fiebre, artritis, uveítis, estomatitis aftosa, artralgia, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, fístulas, abscesos...	20
Antidiarreicos	Usados en los últimos 7 días	0=no 1=yes	30
Masa abdominal		0=no 1=cuestionable 2=definida	10
Hematocrito	Niveles inferiores a los esperados	Hombres<47% Mujeres<42%	6
Peso corporal		$1 - (\text{peso observado}) \times 100$	1 (no contar si el valor obtenido es <10)

Tabla 4. Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (8).

La incidencia y prevalencia de las IBD se han visto dramáticamente incrementadas en las últimas décadas en todas las regiones del mundo, demostrando que esta patología se está convirtiendo en una enfermedad global (9).

De acuerdo con los datos reportados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, solo en el territorio de los Estados Unidos de América, había diagnosticados 1,4 millones de adultos con esta patología en el 2012 (9) (Figura 1). En Europa se estima que la prevalencia actual de las IBD es de 2,5 a 3 millones de personas afectadas (7). Y Canadá tiene una de las tasas más altas de prevalencia de IBD: a finales de 2012 había diagnosticados 233 000 canadienses con IBD (129 000

pacientes con EC y 104 000 pacientes con CU), de los cuales, 5900 eran niños y adolescentes menores de 18 años (10).

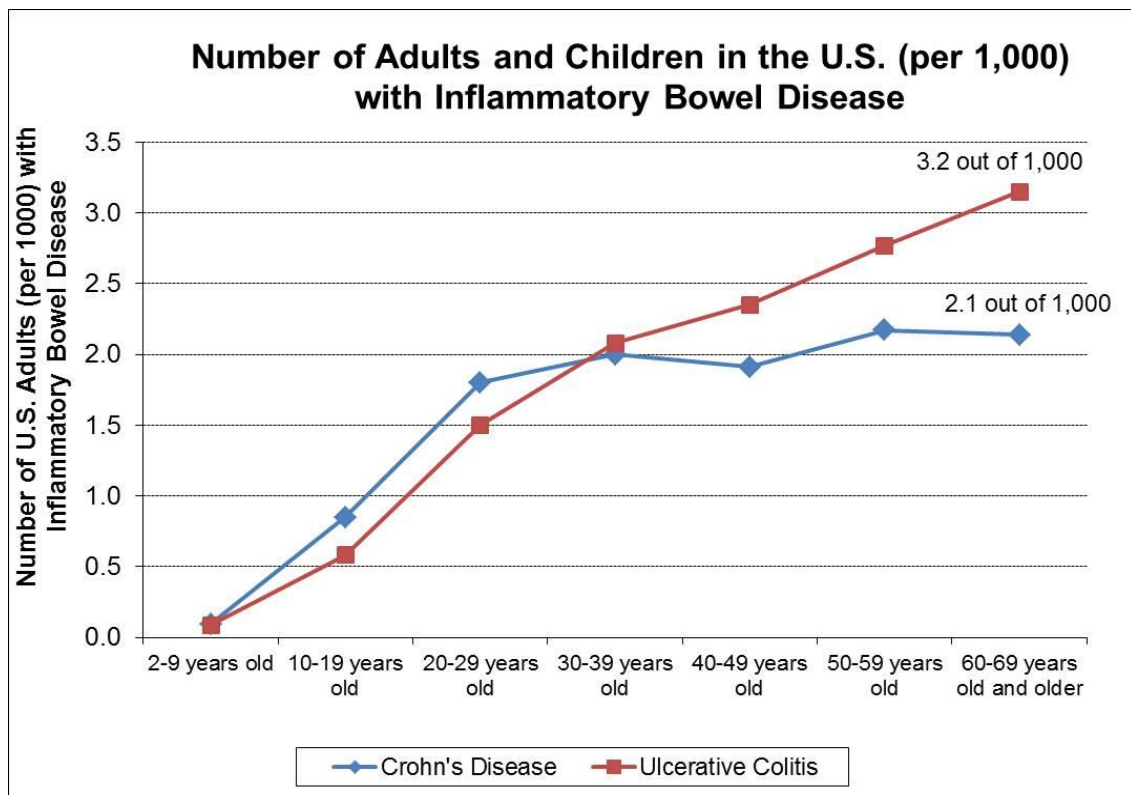


Figura 1. Prevalencia de las IBD entre adultos y niños en los Estados Unidos (por 1000 habitantes), de acuerdo a los datos de 2012, según el Coriell Institute for Medical Research (11).

Las revisiones sistemáticas epidemiológicas actuales apuntan a que su incidencia en Europa y Estados Unidos se sitúa entre 0,6 y más de 20 personas/año por 100 000 habitantes, mientras que en Asia y el Medio Este es de 0,1 a 6,3 personas/año por 100 000 habitantes (9). En Europa, las tasas de prevalencia e incidencia están aumentando con el paso de los años, los países nórdicos y Reino Unido tienen las tasas más altas, mientras que las más bajas se dan en el Sur y el Este (7). Sin embargo, datos recientes revelan que las zonas que históricamente tenían incidencias bajas de estas enfermedades están sufriendo un continuo incremento de casos de IBD (12). Y si revisamos los datos procedentes del Departamento de Epidemiología de Ontario, Canadá, podemos comprobar que, de nuevo, este país tiene una de las tasas de incidencia de IBD más altas a nivel mundial, con aproximadamente 10 200 casos nuevos al año (10).

Los continuos cambios en los factores ambientales; incluyendo las infecciones (como las causadas por bacterias como la *Salmonella sp* o el *Helicobacter pylori*), la dieta, el estilo de vida (la elevada incidencia de estrés o el continuo aumento de los

niveles de contaminantes ambientales), así como el uso de ciertos medicamentos (el mal uso de antibióticos o antiinflamatorios no esteroideos, o el uso de anticonceptivos orales); han contribuido al aumento de la prevalencia mundial de la enfermedad (13).

La patofisiología de las IBD se desconoce, pero se cree relacionada con causas genéticas y medioambientales, que junto con alteraciones en la microbiota intestinal, conducen a una desregulación de la respuesta inmunitaria (2) (Figura 2).

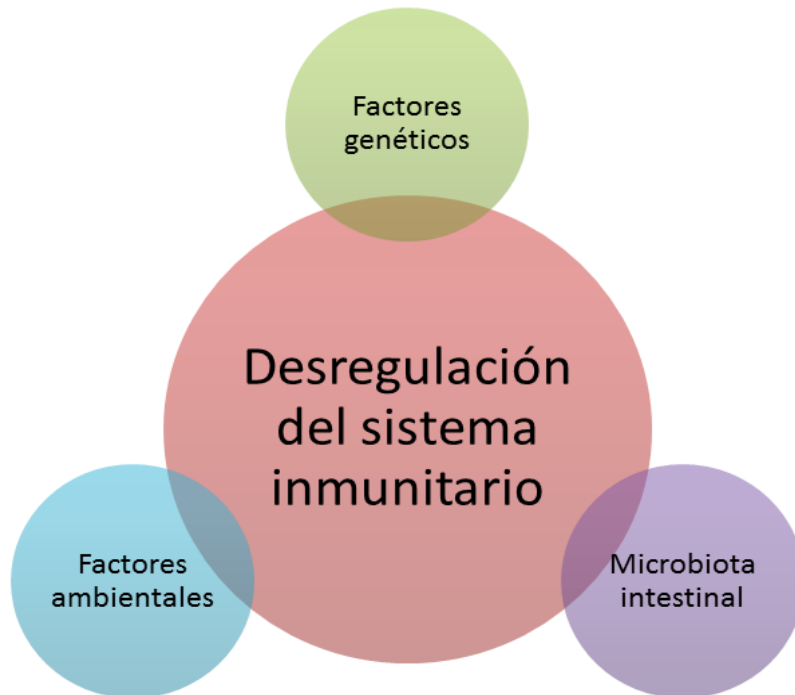


Figura 2. Factores implicados en la patogénesis de las Enfermedades Inflammatorias Intestinales.

La distinta incidencia de las IBD en función de la raza y la prevalencia aumentada entre miembros cercanos de la misma familia, sugieren que son enfermedades con un fuerte componente genético (1). En los últimos años, numerosos estudios genéticos han permitido identificar distintas mutaciones que están relacionadas con el desarrollo de estas patologías (14). Mutaciones en los genes implicados en la preservación de la barrera epitelial intestinal están asociadas con la patogénesis de la CU y la EC (15). Se cree que la falta de mucina y la desregulación de las uniones ocluyentes entre los enterocitos contribuyen a la disrupción de la arquitectura epitelial, lo cual, permite que las bacterias comensales del intestino accedan a las células dendríticas, induciendo una respuesta inmunitaria inapropiada (15). También se han identificado varias mutaciones en genes codificantes de proteínas implicadas en el reconocimiento y presentación de antígenos bacterianos (autofagia, complejo mayor de histocompatibilidad...), y en la coordinación entre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Tabla 3) (14). Esto indicaría que la

desregulación de la respuesta inmunitaria en los pacientes con IBD podría estar, en parte, causada por mutaciones genéticas.

Marcador genético	Locus	Genes candidatos	Rol propuesto en la inflamación
IBD1	16q12	NOD2/CARD15	Detección de los componentes bacterianos citosólicos
IBD3	6p21.3	CMH HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB5, HLA-DRB1, TNF	Detección de antígenos. Regulación de la inflamación
IBD5	5q31	IL3, IL4, IL5, IL13	Regulación de la inflamación
IBD10	2q37.1	ATG6L1	Autofagia
IBD12	3p21	MST1, BSN, GNA12	Regulación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios
IBD14	7q32	IRF5	Regulación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios
IBD17	1p31.1	IL23R	Generación y mantenimiento de células Th17
IBD19	5q33.1	IRGM	Autofagia
IBD23	1q32	IL10	Regulación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios

Tabla 3. Principales loci cromosómicos de susceptibilidad para las IBD (14). CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; TNF: factor de necrosis tumoral; HLA: antígeno leucocitario humano; IL: interleucina; IRGM: familia GTPasa relacionada con inmunidad; IRF5: factor 5 de regulación del Interferón; MST1: estimulador de macrófagos 1; GNAI2: G proteína de unión al nucleótido de guanina, con actividad alpha inhibidora del polipéptido 2; ATG16L1: proteína relacionada con la autofagia 16-1.

Sin embargo, estos descubrimientos genéticos no explican todos los casos de IBD, ni porqué su incidencia ha aumentado tanto en los últimos 50 años, sobre todo en países desarrollados (9). Estos datos sugieren la implicación de factores medioambientales y epigenéticos en la patogenia de la enfermedad, de forma que individuos genéticamente susceptibles se encontrarían con uno o varios desencadenantes medioambientales, los cuales darían lugar a la respuesta inmunitaria descompensada. Varios estudios sugieren que la exposición a los contaminantes ambientales generados por las industrias, como el dióxido de azufre (SO₂) y el dióxido de nitrógeno (NO₂), aumenta el riesgo de padecer IBD (16, 17). También hay descubrimientos que apuntan a que varios factores asociados a la vida urbana incrementan el riesgo de desarrollar estas patologías (trabajos sedentarios, contaminación, estrés...) (13). Los cambios en los hábitos alimenticios también tienen repercusión sobre la iniciación y el desarrollo de las IBD. Se sabe que las dietas ricas

en carne, alimentos grasos y dulces aumentan el riesgo de padecer IBD (18). Además, en un estudio realizado a pacientes con IBD con el fin de que autoevaluaran el papel de la dieta en su enfermedad, se comprobó que una proporción elevada (el 15.6% de los encuestados) consideran que la dieta pudo ejercer como factor desencadenante en la iniciación de su enfermedad, o que está directamente relacionada con la aparición de nuevos brotes (el 57.8% de los pacientes consultados) (19).

Por otro lado, los cambios en la dieta tienen una repercusión directa sobre la microbiota intestinal. Las dietas occidentales, ricas en carbohidratos y grasas, promueven la expansión de los llamados “patobiontes” (microorganismos patógenos) en el tracto gastrointestinal, causando una disminución de bacterias comensales beneficiosas. El metabolismo de los patobiontes genera productos residuales bacterianos como el H_2S , que al entrar en contacto con las células del tracto gastrointestinal desencadenan una respuesta inflamatoria (Figura 3) (1).

Hoy en día se sabe con seguridad que la alteración de la microbiota intestinal es otro desencadenante más, dentro de la multitud de causas, que influye en la incidencia de las IBD en aquellas personas genéticamente susceptibles (1, 20). La microbiota entérica interactúa de forma íntima con la mucosa intestinal. Es esencial en la metabolización de nutrientes que el sistema digestivo no es capaz de procesar por sí mismo, así como en la maduración y educación del sistema inmune intestinal (21). Cuando se altera de forma crónica este mutualismo entre hospedador y microbiota se pueden originar respuestas inmunitarias aberrantes, que acaben desencadenando cualquiera de las dos patologías de las IBD (1).

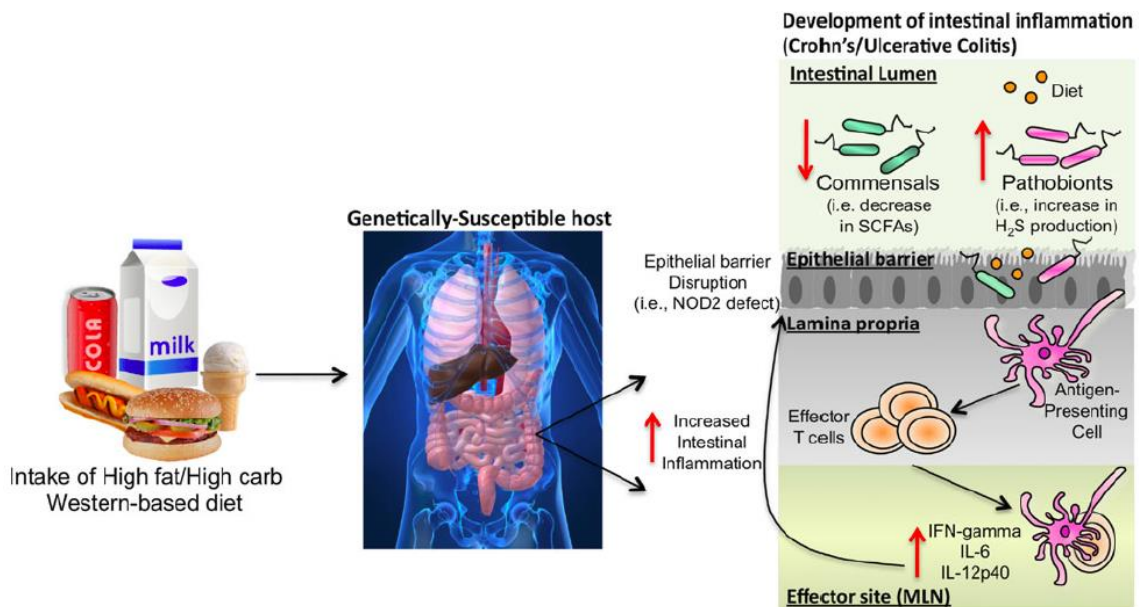


Figura 3. La dieta occidental promueve la aparición de patobiontes que generan productos bacterianos de desecho que promueven la inflamación intestinal (1).

3.1.1. Principales tratamientos

Las IBD son trastornos crónicos, por lo tanto, los pacientes necesitan ser tratados durante toda su vida (2). Los distintos factores desencadenantes, la variabilidad entre pacientes, y los episodios de remisión y recidivas, dificultan la aplicación de una pauta estándar de tratamiento; teniendo este que adaptarse a la situación concreta de cada paciente (2, 22).

En la actualidad no existe cura para las IBD. La finalidad del tratamiento es inducir y mantener la remisión de los brotes de la enfermedad, tratando de mejorar la calidad de vida del paciente, y de prevenir las complicaciones y la necesidad de cirugía (23). Tradicionalmente, el tratamiento de elección para inducir la remisión clínica ha consistido en el uso de corticosteroides, mientras que la terapia de mantenimiento está basada en el uso de 5-aminosalicilatos (5-ASA) y tiopurinas (24). En los últimos 15 años la terapia biológica, especialmente con el uso de anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral (TNF), ha revolucionado el panorama del tratamiento de las IBD, especialmente de la EC (23), ya que, el tratamiento con 5-ASA no es efectivo en estos pacientes (8); sin embargo, su uso suele reservarse para los casos más severos o que no responden al tratamiento inicial con corticosteroides (24). Las investigaciones más recientes siguen en la línea de las terapias con agentes biológicos, como el uso de probióticos (25) o de helmintos (un tipo de gusanos parásitos) (26). La cirugía se considera la última opción en el tratamiento de las IBD, en especial de la CU; ya que, el tener que realizar una colectomía significa que todas las demás opciones terapéuticas han fallado, y el paciente se encuentra en una situación grave que puede terminar en una colitis fulminante (7). En el caso de los pacientes con EC se recurre también a la cirugía como última opción para eliminar las complicaciones derivadas de la presencia de úlceras profundas (8).

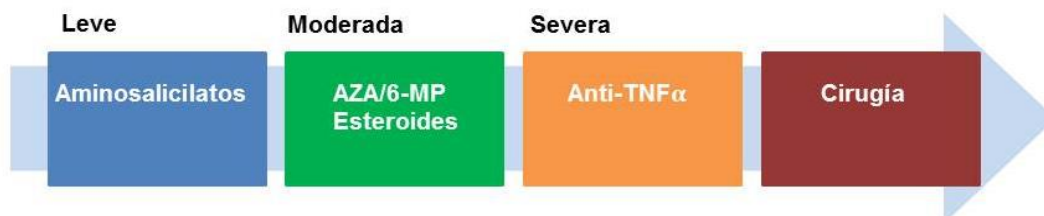


Figura 4. Tratamientos actuales para las IBD y orden de elección en su aplicación.

3.1.1.1. Aminosalicilatos

Los 5-ASA siguen siendo la primera línea de terapia para inducir y mantener la remisión clínica en pacientes con CU leve o moderada (27). Sin embargo, no están recomendados para los pacientes con EC, porque no hay evidencias disponibles que

apoyen que sean eficaces en esta patología; solo la sulfasalacina ha demostrado tener una modesta eficacia en el tratamiento de la EC, pero que en ningún caso es suficiente para mantener un estado de remisión clínica (8).

Centrándonos por tanto en el tratamiento de la CU, la eficacia de la sulfasalacina se ha probado en varios ensayos clínicos, y fue el primer compuesto de este grupo en usarse para el tratamiento de este trastorno (originariamente se diseñó para el tratamiento de la artritis reumatoide) (28). Sin embargo, el grupo sulfuro que contiene el fármaco no es bien tolerado en uno de cada tres pacientes (29), por eso se han diseñado nuevos compuestos libres de este grupo. Una revisión Cochrane analizó la efectividad de estos nuevos 5-ASA, en comparación con placebo y con sulfasalacina, para la inducción y el mantenimiento de la remisión de pacientes con CU (30). Los resultados demostraron que los nuevos 5-ASA eran significativamente eficaces en la inducción y el mantenimiento de la remisión clínica frente al placebo; y aunque no se observaron diferencias significativas frente a la sulfasalacina en términos de eficacia clínica, sí hubo significativamente menos efectos secundarios entre los grupos que tomaban los nuevos 5-ASA.

Además de los fármacos orales, han aparecido tratamientos tópicos basados en compuestos 5-ASA, en concreto en la mesalamina administrada vía rectal (27). La mesalamina rectal es significativamente más eficaz que el uso de placebo, más eficaz que los esteroides tópicos en la inducción de remisiones clínicas y, al menos, tan eficaz como los 5-ASA orales en el mantenimiento de la remisión clínica (27).

3.1.1.2. Corticosteroides

Para los pacientes con EC y para aquellos pacientes con CU en los que el tratamiento con 5-ASA es insuficiente para controlar los síntomas, por presentar un grado de enfermedad de medio a severo, los corticosteroides se han mantenido como pilar fundamental de tratamiento para inducir la remisión de los síntomas clínicos desde la década de los cincuenta (31). Dentro del amplio abanico de corticosteroides disponibles, los más usados son la metilprednisolona y la hidrocortisona, sin datos que sugieran que un compuesto sea superior al otro (27).

Debido a la multitud de efectos adversos de los corticosteroides sistémicos, los esteroides no sistémicos están generando un gran interés, y su uso como terapia para las IBD ya se está estudiando. La budesonida ha demostrado ser capaz de inducir la remisión en la EC entre el 50 y el 70% de los casos (8), sin embargo, su efectividad en la CU es muy limitada (31). Solo se ha comprobado que se aumentan significativamente las tasas de remisión frente a placebo si se administra en forma de enema (27).

3.1.1.3. Inmunomoduladores: azatioprina/6-Mercaptopurina

La 6-Mercaptopurina (6-MP) y su precursor, la azatioprina (AZA), son análogos de purinas que son convertidos en nucleótidos de 6-tioguanina produciendo metabolitos activos que interfieren con la síntesis de ADN, tienen efectos anti-proliferativos en los linfocitos activados, y se ha descubierto que inducen su apoptosis (32, 33).

En pacientes con CU, el tratamiento con AZA o con 6-MP reduce significativamente la aparición de nuevos brotes y permite reducir progresivamente la dosis de tratamiento con corticosteroides, limitando los efectos adversos (27).

El uso de estos inmunomoduladores está muy extendido entre los pacientes con EC, donde se emplean como terapia de mantenimiento mayoritariamente (8, 22). Aunque son capaces de inducir la remisión de los brotes clínicos en el 55% de los casos, su acción es muy lenta, y por eso es preferible iniciar un tratamiento conjunto de corticosteroides e inmunomoduladores, para reducir después progresivamente la dosis de los primeros y continuar el tratamiento solo con AZA o 6-MP (8).

3.1.1.4. Anticuerpos anti-TNF α

La aparición de los anticuerpos monoclonales anti-TNF α revolucionó el control de las IBD de severidad alta o refractarias a los tratamientos habituales (34). Aunque su mecanismo de acción concreto no se conoce aún a la perfección, se cree que estos fármacos causan la apoptosis de las células inflamatorias productoras de TNF α , una citocina pro-inflamatoria con un papel fundamental en la patogénesis de las IBD (23, 27).

Aunque el efecto de los tratamientos biológicos en la CU es menos impresionante que en la EC (donde el uso de estos fármacos llega a lograr la remisión de los brotes en el 80% de los pacientes (8)), se ha demostrado en varios ensayos clínicos que, aunque modesto, hay un beneficio significativo (23).

Actualmente existen varios anticuerpos monoclonales anti-TNF α disponibles (adalimumab, certolizumab pegol, cetuximab, alemtuzumab, bevacizumab...), aunque probablemente el más empleado es el infliximab (35). El infliximab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF α quimérico (75% de ratón y 25% humano) cuya eficacia en el tratamiento de la EC ha sido probada inequívocamente (36). Sin embargo, existían datos contradictorios sobre su eficacia en el tratamiento de la CU, hasta que los ensayos clínicos ACT 1 y 2 ("Active Ulcerative Colitis Trials") aportaron la evidencia suficiente acerca de su eficacia en estos pacientes (37).

3.1.1.5. Otras terapias biológicas

En el tratamiento de la CU también se han evaluado anticuerpos anti-IL2, una citocina producida por las células T activadas y que ayuda a continuar la proliferación y activación de más linfocitos T (38). Uno de estos anticuerpos, el basiliximab, consigue inducir la remisión clínica en la mayoría de pacientes con CU refractaria al tratamiento con corticosteroides (39).

También se han completado las primeras fases de un ensayo clínico para evaluar la eficacia del visilizumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (40). Aunque los resultados parecían prometedores, los pacientes experimentaban múltiples efectos secundarios y recientemente han aparecido estudios que niegan la eficacia de este compuesto en el tratamiento de las IBD (41).

Tanto el interferón (IFN) α como el IFN β también están siendo estudiados como posibles terapias para las IBD severas. Pero los resultados parecen indicar que no son efectivos como tratamientos primarios (27).

El medicamento natalizumab, un anticuerpo monoclonal anti-integrinas $\alpha 4$, ha demostrado ser eficaz en la inducción y el mantenimiento de la remisión clínica en pacientes con EC de moderada a severa (42). Es el primer inhibidor selectivo de moléculas de adhesión que previene el reclutamiento y el paso de los leucocitos a través del endotelio vascular. Sin embargo, la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) del gobierno de los Estados Unidos de América ha limitado su uso exclusivamente a aquellos pacientes en los que todas las demás terapias hayan fallado, debido al excesivo riesgo de que se produzca una leucoencefalopatía durante el uso de esta terapia (43). Además, los pacientes que estén siendo tratados con natalizumab deberán seguir estrictos controles sanitarios y la continuación del tratamiento quedará supeditada a la demostración de que la terapia está siendo eficaz (44).

En cuanto al uso de probióticos, la evidencia disponible apunta a un efecto beneficioso de su uso en los pacientes con IBD (25). Los estudios realizados con varios tipos de bacterias como VSL#3, *Saccharomyces boulardi*, *Lactobacillus GG* o *Bifidobacterium longum* son prometedores, ya que, en esos casos se consigue una mejora significativa frente a placebo o resultados similares a los conseguidos con el uso de mesalamina (27).

3.1.2. Problemas no resueltos por las terapias actuales y sus efectos secundarios

A pesar del amplio espectro de tratamientos farmacológicos disponibles, muchos pacientes no tienen un alivio adecuado de los síntomas (45). El 50% de los pacientes afectados consiguen el estado de remisión clínica con los fármacos disponibles, sin embargo, entre el 20 y el 25% de los pacientes europeos afectados afirman experimentar síntomas continuos sin mejorías a pesar del tratamiento (7). El 90% de los pacientes de CU experimenta de forma más o menos continua a lo largo de su vida nuevos brotes de la enfermedad (27). Según un estudio realizado en los países nórdicos con 454 pacientes de CU (46), el 78% de los afectados sufrió por lo menos una recaída grave en los primeros 5 años tras el diagnóstico; siendo el porcentaje de nuevos brotes más alto entre los grupos de mujeres y de pacientes jóvenes. Otros estudios epidemiológicos, realizados también en los países nórdicos, con pacientes de EC revelaron que en cinco años tras el diagnóstico aproximadamente el 93,1% de los pacientes tuvieron brotes severos y repetidos de la enfermedad (47, 48).

El impacto de las IBD en la calidad de vida de un individuo cuyos síntomas no están controlados puede ser enorme; y los costes sociales y financieros de la enfermedad son, en general, altos (7, 10, 45). En toda Europa se estima que hay afectadas entre 2,5 y 3 millones de personas, que generan un coste directo a los sistemas sanitarios de entre 4,6 y 5,6 billones de euros al año (7). El coste económico de las IBD en Canadá se estimó en torno a los 2,8 billones de dólares en 2012 (casi 12 000 dólares por paciente al año) (10). De esos 2,8 billones, los costes médicos directos fueron de 1,2 billones de dólares, repartidos entre costes de medicación (521 millones), hospitalización (395 millones) y visitas médicas (132 millones). El resto del coste generado por las IBD se deriva de costes indirectos causados principalmente por bajas laborales de larga duración (979 millones de dólares) (10) (Figura 5).

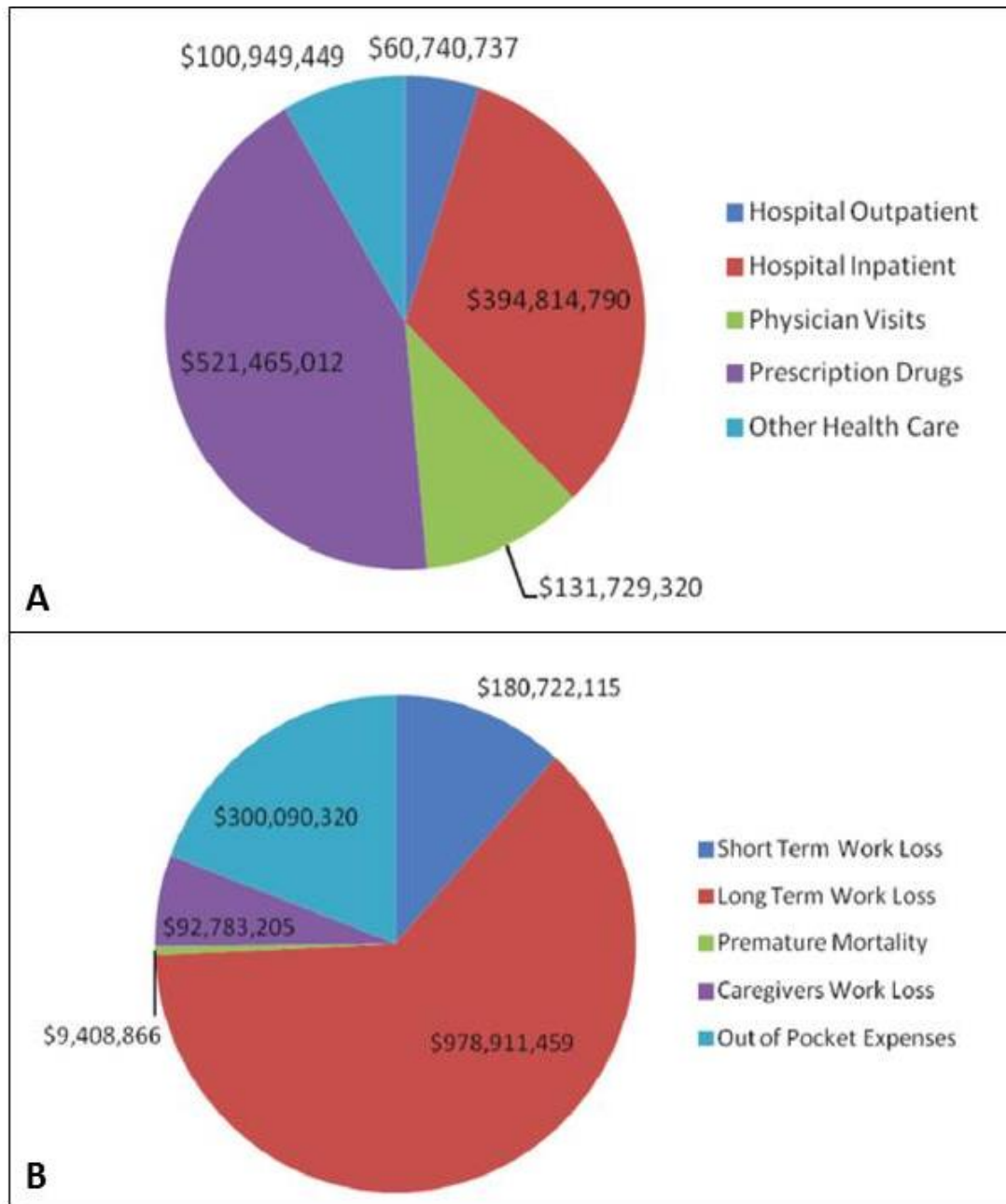


Figura 5. A) Costes económicos directos causados por las IBD en Canadá en 2012. B) Costes económicos indirectos generados por las IBD en Canadá en 2012 (10).

Estos pacientes se enfrentan a grandes retos en el entorno actual, incluyendo la falta de conciencia de las IBD como enfermedades crónicas, el diagnóstico tardío o inadecuado, el acceso desigual a los servicios de atención médica, los elevados costes de los medicamentos que necesitan, las perspectivas de empleo disminuidas y el apoyo comunitario limitado (10).

Debido a las características de las IBD, es muy frecuente que los pacientes se ausenten del trabajo o del centro escolar (27). Solo en Europa, se calcula que la tasa de desempleo entre los pacientes con IBD es del 10%, la media de bajas laborales de

estos pacientes se sitúa entre 3 y 6 semanas al año, y su riesgo de sufrir incapacidad laboral permanente es dos veces superior a la de la población general (7). En Canadá, los datos de 2012 indican que los pacientes con IBD sufrieron una reducción de la probabilidad de empleo del 9%, lo que se traduce en que, en ese año, 21 000 personas con estas patologías se retiraron a la fuerza de su trabajo a causa de su enfermedad (10).

En comparación con la población general, la calidad de vida que experimentan los pacientes con IBD es baja en todas las etapas de la enfermedad (49). Estos pacientes experimentan un coste personal muy grande, como suele ser el caso de todos los pacientes con enfermedades crónicas. Tienen problemas médicos con los que lidiar, que van desde los síntomas (dolor crónico, diarrea, fatiga...) hasta la preocupación acerca de cómo el curso de la enfermedad afectará a su futuro (49). La naturaleza fluctuante e impredecible de las IBD puede hacer muy difícil la planificación del futuro de los pacientes, afectando negativamente a la toma de decisiones relacionadas con la carrera profesional y otras opciones personales (10).

Los niños diagnosticados con IBD también experimentan una reducción en su calidad de vida, lo mismo que los pacientes pediátricos que sufren otras enfermedades, aunque su situación suele mejorar tras el primer año de tratamiento (50). Sin embargo, la situación empeora de forma drástica cuando llegan a la adolescencia y tienen que convivir con los síntomas de la enfermedad durante esta etapa de su vida, tan complicada a nivel psicológico y social (10).

Es muy importante destacar que incluso en aquellos pacientes en los que los síntomas están más o menos controlados, la valoración de su calidad de vida está disminuida (49). Los pacientes sin síntomas graves también experimentan una fuerte angustia a nivel psicológico debido a su enfermedad (estrés, ansiedad, miedo al dolor, vergüenza sobre algunos síntomas como la diarrea, preocupación por las recaídas y cómo evolucionará su enfermedad...) (49).

En un estudio reciente de la Universidad de Yale con 105 pacientes de IBD se demostró que la prevalencia de depresión entre estos pacientes es bastante elevada, en torno al 25%, y que está directamente relacionada con una peor valoración de la calidad de vida (51). Y un estudio con dos muestras representativas de población canadiense (con 4514 participantes en total) afectada por IBD desveló que la prevalencia de depresión entre estos pacientes, del 15% aproximadamente, triplica la de la población general de Canadá (52). Las tasas de depresión eran especialmente altas entre mujeres, pacientes jóvenes y aquellos que experimentaban más dolor y limitaciones a causa de la enfermedad. Además, un dato importante es que averiguaron que el 17% de los entrevistados habían considerado el suicidio en el

último año, y el 30% habían pensado en suicidarse en algún momento desde que les habían diagnosticado la enfermedad (52). Estos datos concuerdan con los reportados por un estudio más reciente en la población danesa, donde, además, se comprobó que el riesgo de completar el suicidio era el doble en los pacientes de IBD que entre la población general (53).

Todo esto es especialmente preocupante si se tiene en cuenta que por norma general la enfermedad hace su aparición a edades tempranas. Y es indicativo de que aún existen necesidades no satisfechas por los tratamientos actuales. Deben realizarse, por tanto, intensos esfuerzos en investigación para encontrar nuevas terapias capaces de optimizar resultados reduciendo los riesgos para el paciente al mínimo.

Otra dificultad añadida a la que se enfrentan los pacientes con IBD es que la terapia a largo plazo con algunos de los medicamentos de elección es problemática, debido a los efectos secundarios y a que la enfermedad puede volverse refractaria (54).

3.1.2.1. Efectos secundarios de la terapia con corticosteroides

Aunque, como hemos visto anteriormente, la terapia con corticosteroides en las IBD es efectiva y se utiliza de forma frecuente, a largo plazo la mayoría de pacientes se vuelven refractarios a estos fármacos (55). Además, sus efectos secundarios son frecuentes y llegan a tener consecuencias importantes: el 55% de los pacientes que están siendo tratados con corticosteroides tienen algún efecto secundario grave, que les conduce a abandonar el tratamiento (56, 57).

Varios estudios recientes sugieren que el tratamiento con corticosteroides de larga duración (más de 60 días) está asociado a varios efectos secundarios no deseados como la ganancia de peso, insomnio, piel más fina y frágil, cataratas, fracturas óseas e infecciones oportunistas, entre otros (58, 59). Estos efectos adversos aparecen incluso con el uso de dosis bajas.

En el caso concreto de los pacientes con IBD en tratamiento con corticosteroides, los efectos adversos más frecuentes son acné (con una frecuencia estimada del 50%), sudor facial abundante (35% de frecuencia estimada), osteoporosis (33%), incremento de la presión ocular (22%), hipertensión (13%), infecciones oportunistas (13%), edema de tobillo (11%), cataratas (9%), hematomas frecuentes (7%) y problemas de memoria (7%) (54). Existen otros efectos adversos graves, aunque más infrecuentes, que incluyen la diabetes, necrosis de cadera, inhibición de la función adrenal o aparición de infecciones oportunistas graves que pongan en peligro la vida del paciente (54).

Sin duda, uno de los efectos secundarios más preocupantes en el caso de los pacientes con IBD es el de la osteoporosis. De acuerdo a estudios realizados en 2009, los pacientes con IBD tienen un alto riesgo de desarrollar osteoporosis u osteopenia a lo largo de su vida en comparación con la población general (60). El riesgo relativo de sufrir una fractura en estos pacientes es un 40% superior al de una persona sana. Y la prevalencia de osteopenia y osteoporosis entre pacientes con IBD, a pesar de variar mucho entre poblaciones, se sitúa en rangos del 22-77% y del 17-41% respectivamente (60). Los principales factores de riesgo en esta población incluyen la patología de la enfermedad (se ha encontrado una importante correlación entre la inflamación y el desarrollo de osteoporosis), los problemas de malnutrición, la deficiencia de vitamina D y calcio, y, por supuesto, el uso prolongado de corticosteroides (61). En el Reino Unido, las guías de práctica clínica aconsejan minimizar el uso de corticosteroides, optimizando las terapias con 5-ASA para pacientes con CU y tiopurinas para los pacientes con EC. Además, aconsejan en el caso de pacientes mayores de 65 años seguir una profilaxis con bisfosfonatos y realizar mediciones regulares de densitometría ósea (62).

El caso de la osteoporosis es especialmente relevante cuando se trata de pacientes pediátricos de IBD, como veremos más adelante.

3.1.2.2. Efectos secundarios de la terapia con inmunomoduladores: AZA/6-MP

El tratamiento con AZA o con 6-MP tiene efectos secundarios similares. Aproximadamente el 11% de los pacientes que siguen estos tratamientos los interrumpen debido a la aparición de efectos secundarios (54). Los efectos adversos más comunes incluyen náuseas, reacciones alérgicas, alteraciones hepáticas o pancreatitis. Estos efectos indeseados suelen desaparecer al interrumpir la terapia (54).

Más preocupantes son otros efectos secundarios que pueden llegar a poner en peligro la vida del paciente, como las infecciones graves (sufridas aproximadamente por el 5% de los pacientes que reciben estos tratamientos) o la incidencia de linfomas no-Hodgkin (LNH), cuya frecuencia se estima entre 4 y 9 afectados por 10 000 pacientes tratados a lo largo de un año (63). Un mecanismo propuesto para esta tasa de incidencia incrementada entre los pacientes con IBD estaría relacionado con la proliferación del virus Epstein-Barr (64).

Recientemente también han aparecido evidencias que apuntan a que el tratamiento con tiopurinas incrementaría el riesgo de padecer efectos secundarios de tipo cutáneo en pacientes con IBD (65). Los efectos adversos cutáneos más

frecuentes irían desde síntomas leves como enrojecimiento de la piel, picores o erupciones cutáneas; pasando por casos de severidad media como las reacciones cutáneas derivadas de infecciones virales propiciadas por el tratamiento (herpes o varicela zoster); hasta llegar a casos graves como el cáncer de piel no melanocítico, donde la exposición a las tiopurinas incrementa el riesgo de padecer este tipo de cáncer hasta en 20 veces al compararlos con los grupos control (66).

3.1.2.3. Efectos secundarios de la terapia con anticuerpos anti-TNF α

Evaluar los efectos adversos causados por la terapia con anticuerpos anti-TNF α en pacientes con IBD es complicado, ya que, en la mayoría de casos, los pacientes que reciben este tratamiento han estado previamente en tratamiento con corticosteroides o inmunomoduladores (67).

Todas las terapias biológicas basadas en anticuerpos anti-TNF α han demostrado estar asociadas con un amplio espectro de efectos dermatológicos adversos, como infecciones cutáneas, urticaria, alopecia, reacciones granulomatosas, dermatitis atópica, acné, linfomas cutáneos, vitíligo, púrpura... (65). Los efectos secundarios más comunes y mejor documentados en pacientes con IBD son las reacciones locales en el sitio de inyección o infusión del fármaco (entre el 3 y el 21%) (54). Lo más frecuente es que se caractericen por síntomas leves como rojez, eritema leve, inflamación local o sarpullidos; que se resuelven al disminuir la frecuencia de administración, o al administrar antihistamínicos o esteroides al paciente (65). Sin embargo, también existen casos de reacciones cutáneas severas como eritema multiforme, el síndrome Stevens-Johnson o necrosis epidérmica tóxica; descritos tras el uso de infliximab o adalimumab (65). Lo más frecuente es que estas reacciones severas comiencen como un eritema leve que evoluciona de forma no favorable. Aunque raras, estas complicaciones pueden ser extremadamente graves y se asocian con una morbilidad significativa, e incluso con mortalidad (68).

El siguiente efecto adverso más frecuente sería la aparición de infecciones oportunistas serias (alrededor del 3%) (54), muchas de ellas relacionadas con manifestaciones pulmonares (69, 70), especialmente con la reactivación de la tuberculosis latente (71-73).

Y por último, con una frecuencia del 1%, estarían las reacciones de tipo lupus, con el desarrollo de anticuerpos anti-nucleares (54). En los pacientes con IBD lo normal suele ser un cuadro cínico más leve que del lupus eritematoso sistémico y sin implicación renal (65).

Estudios recientes desarrollados para analizar los factores de riesgo del desarrollo de osteoporosis en pacientes con IBD han encontrado correlaciones

positivas entre el uso de terapias con anticuerpos anti-TNF α (en concreto, infliximab) y bajos niveles de densidad óseos (74). Sin embargo, no hay evidencias claras que permitan determinar si la baja densidad ósea es consecuencia del uso de estas terapias, o si los pacientes que requieren de estas terapias tienen un índice de actividad inmune muy alto que ha podido promover el deterioro óseo de forma anterior al inicio del tratamiento.

3.1.2.4. Grupos de pacientes de alto riesgo

Al tratar el tema de los efectos adversos de las terapias actuales de las IBD es necesario hacer una mención especial sobre algunos grupos de pacientes, para los cuales, los fármacos de elección disponibles a día de hoy pueden no ser del todo seguros o convenientes.

Las pacientes embarazadas son el primero de esos grupos. Los enfermos de CU o EC suelen ser jóvenes y en edad de formar una familia, o concebir en el caso particular de las mujeres. Sin embargo, se sabe que las IBD tienen serias implicaciones en el embarazo (2). Aquellas pacientes cuya enfermedad está activa en el momento de la concepción tienen un riesgo más alto de sufrir un aborto espontáneo. Además, los riesgos de tener un parto prematuro, un bebé con bajo peso al nacer o con anomalías congénitas, como malformaciones de las extremidades u obstrucción urinaria, están aumentados (75). Una de cada cinco pacientes embarazadas con IBD termina dando a luz mediante cesárea (76). Y si aparecen brotes de la enfermedad durante el embarazo se incrementa el riesgo de partos prematuros y de tener bebés con complicaciones debido a su bajo peso al nacer (77).

Un meta-análisis relativamente reciente de siete estudios, donde se consideraban los casos de 2200 mujeres embarazadas con CU, reveló que no había asociaciones significativas entre el tratamiento con 5-ASA y la incidencia de abortos espontáneos, partos prematuros, bajo peso al nacer de los bebés, defectos congénitos o muerte fetal (78). También se consideran seguros durante el período de lactancia (79). Sin embargo, el caso concreto de la mesalamina debe estudiarse con más cuidado, ya que, ha sido trasladada de la categoría B de seguridad durante el embarazo a la categoría C por la FDA tras comprobarse en estudios animales que dosis altas pueden provocar malformaciones fetales en el esqueleto (79).

En cuanto a la seguridad del uso de las tiopurinas, en concreto AZA o 6-MP, los datos son contradictorios. Estudios animales sugieren que pueden tener efectos teratogénicos; sin embargo, en estudios con pacientes embarazadas con IBD tratadas con estos compuestos se ven riesgos elevados que no llegan a ser significativos (79). La FDA los incluye en la categoría D y no recomienda su uso durante la concepción y

el embarazo, a menos que los beneficios de la terapia excedan los riesgos asumidos al administrarla.

Las terapias biológicas se sabe que atraviesan la placenta y que también se distribuyen a través de la leche en bajas cantidades (80). Aunque la FDA incluye a varios anticuerpos anti-TNF α , en la categoría B de seguridad, se recomienda, siempre que sea posible, la interrupción del tratamiento antes del tercer trimestre; ya que, se ha comprobado que en ese período estos fármacos atraviesan la placenta de forma extremadamente eficiente, conduciendo a niveles altos en el feto y el recién nacido (79).

El segundo de estos grupos de alto riesgo sería el formado por los pacientes pediátricos de IBD. Como hemos visto anteriormente, tanto las características patológicas de la enfermedad, como las terapias de elección, contribuyen al desarrollo de patologías óseas en los pacientes con IBD (60). Cuanta mayor sea la duración del tratamiento, mayor es el riesgo de sufrir osteoporosis u osteopenia (74). Lógicamente, esto pone el punto de mira en los pacientes en los que la enfermedad hace su aparición a edades muy tempranas, los niños y adolescentes. Que además, se encuentran en una etapa de la vida donde la remodelación ósea es vital y constante, y en los que malformaciones óseas puede tener un impacto enorme y limitante. Un estudio canadiense de cohortes ya centró la atención en el riesgo de fracturas vertebrales por compresión en niños que recibían tratamientos de larga duración con corticosteroides (81). Hoy en día se sabe que las IBD en pacientes pediátricos se asocian con una baja densidad ósea y una elevada tasa de fracturas a lo largo de la infancia (82). A parte del efecto de la inflamación y la malnutrición, citocinas y glucocorticoides son los factores clave que probablemente alteran la densidad ósea, desencadenando efectos posteriores como el retraso del crecimiento y la entrada en la pubertad, la baja masa muscular y la inactividad física (83) (Figura 6).

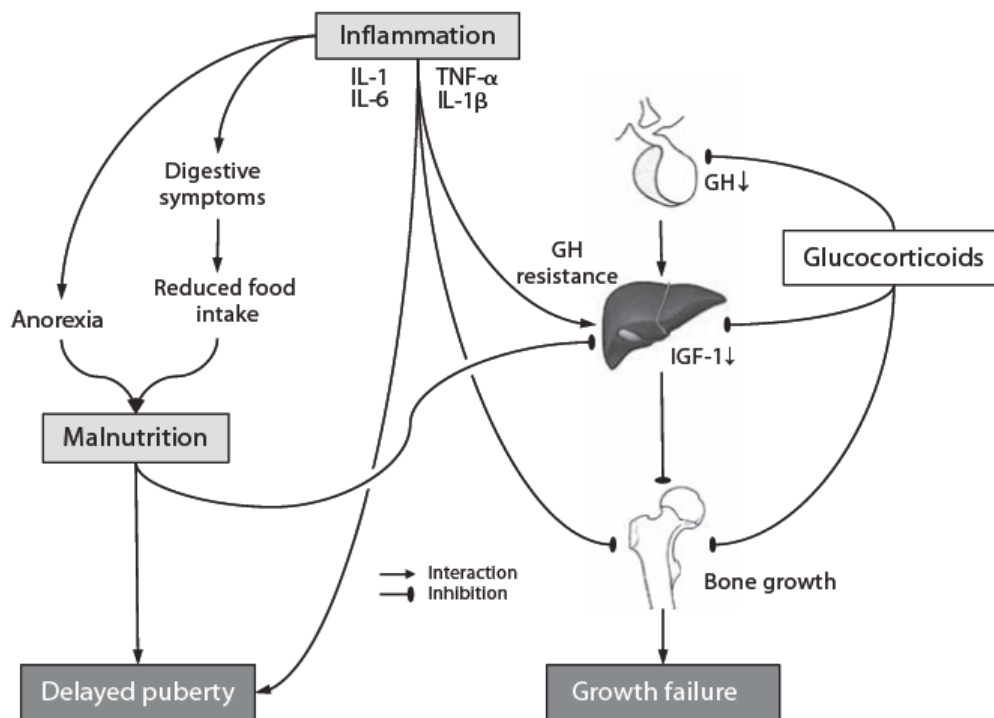


Figura 6. Mecanismos que conducen a un fallo en el crecimiento y retrasan la entrada en la pubertad en pacientes pediátricos con IBD (83).

La mayoría de los tratamientos para las IBD tienen propiedades inmunosupresoras, por eso, el riesgo de infecciones oportunistas en estos pacientes está aumentado (84). Esto tiene especial relevancia para un grupo concreto de pacientes, aquellos que ya tienen infecciones crónicas subyacentes en el momento del diagnóstico de CU o EC. Existen varios casos reportados y estudios que corroboran que el tratamiento con inmunomoduladores y anticuerpos anti-TNF α provoca la reactivación de varios tipos de infecciones latentes como el JC virus (85), el citomegalovirus humano (86) o los virus de la hepatitis B y C (87). Por eso, las guías de práctica clínica están incluyendo procedimientos de estudios serológicos de los potenciales pacientes al tratamiento con estos fármacos antes de iniciar la terapia (84).

El último grupo de riesgo a considerar son los pacientes oncológicos con IBD. En este caso podemos encontrarnos con tres posibles escenarios: pacientes que han tenido cáncer y después se les diagnostica la IBD, pacientes que actualmente tienen un cáncer activo y a los que se les diagnostica la IBD, o pacientes con IBD que acaban desarrollando un cáncer activo.

En el primer caso, no existe un consenso entre las distintas guías de práctica clínica; ya que, a veces, es difícil distinguir si un cáncer ha sido totalmente erradicado, en cuyo caso la inmunosupresión no sería un problema; o simplemente permanece en estado de latencia, caso en el que si se inicia la terapia con inmunomoduladores el

riesgo de recidiva es muy elevado. En el caso de las tiopurinas parece existir un mayor consenso, no modifican de forma significativa la recurrencia del cáncer (88). En cuanto a los anticuerpos anti-TNF α la discrepancia es mayor. Las guías europeas de 2010 de la Organización de Crohn y Colitis desaconsejan su uso si ha habido casos de linfoma o cáncer no hematopoyético (89). Sin embargo, las guías del Colegio Americano de Gastroenterología y de la Organización Mundial de Gastroenterología no incluyen ninguna recomendación al respecto (90, 91).

Tanto en el segundo como en el tercer caso, parece lógico y razonable suspender los tratamientos inmunosupresores mientras dure el tratamiento del cáncer activo. En los dos años siguientes al tratamiento oncológico, los 5-ASA, los corticosteroides, los antibióticos, la terapia nutricional y la cirugía como última opción, deberán fundamentar el tratamiento para las IBD en esos pacientes (88). En el caso de que se desarrolle una IBD severa refractaria a estos tratamientos, se considerará el uso de los inmunomoduladores como terapia de emergencia, haciendo un uso prudente de ellos, y comenzando con una terapia de un único fármaco como primera opción (88).

3.2. LA ADRENOMEDULINA

La adrenomedulina (AM) es un péptido biológicamente activo que fue aislado por primera vez en 1993 a partir de extractos de feocromocitoma humano (92). Los científicos descubrieron que era capaz de estimular la producción de adenosín monofosfatos cíclico (AMPc) en las plaquetas humanas y que ejercía una potente actividad hipotensora de larga duración en ratas (92). La AM es sintetizada tanto por células tumorales como por células normales de la médula adrenal y de otros muchos tejidos (93). Es una hormona circulante, aunque también actúa como un mediador autocrino y paracrino con una amplia multitud de funciones fisiológicas; cabe destacar, entre otras, su función vasodilatadora, broncodilatadora, regula la secreción de numerosas hormonas como la insulina, regula la función renal, la proliferación celular y es un potente antimicrobiano (93, 94).

3.2.1. Estructura de la adrenomedulina

La AM humana es una hormona de 52 aminoácidos que, de acuerdo a su secuencia y estructura, está englobada en la superfamilia de la calcitonina, la cual también incluye al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), a la Amilina y a la AM-2 (también conocida como Intermedina) (95-97). Esta hormona se encuentra amidada en su extremo carboxilo (-CONH₂) y posee dos cisteínas que forman un puente disulfuro interno, que da lugar a un anillo intramolecular de 6

aminoácidos (Figura 7). Ambas características estructurales son esenciales para su actividad biológica (98).

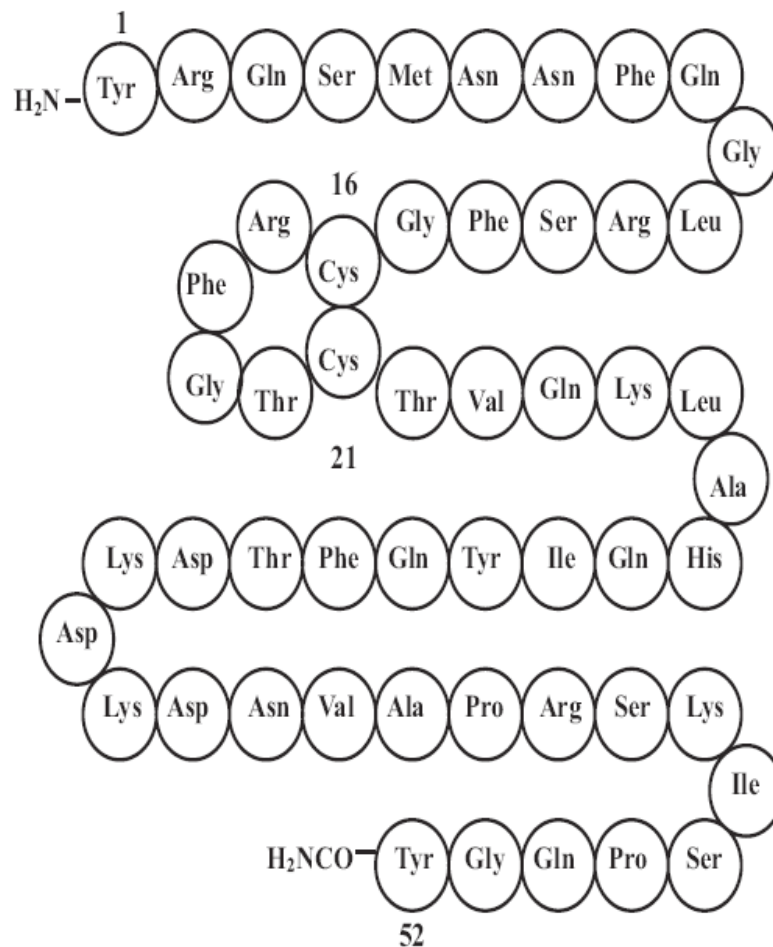


Figura 7. Estructura de la molécula de AM humana.

La estructura tridimensional de la AM comprende una región α -helicoidal central, que ocupa aproximadamente un tercio de su longitud total, y que se encuentra flanqueada por dos segmentos desordenados. La presencia de esta hélice α en el centro de la AM parece ser una característica general de los miembros de la superfamilia de la calcitonina, la cual es importante para que estos péptidos ejerzan su función fisiológica y puedan unirse a sus receptores específicos (99).

3.2.2. Síntesis y secreción al medio de la adrenomedulina

El gen asociado a la AM se ha identificado en varias especies de mamíferos. En humanos el gen se encuentra en el cromosoma 11, en el locus 11p15.4, contiene 4 exones y 3 intrones, con cajas TATA, CAAT y GC en la región que flanquea el extremo 5' (98). En ratones el gen de la AM se localiza en el cromosoma 7 (93).

Recientemente se han descubierto varias mutaciones en las proximidades del gen de la AM, entre ellas un polimorfismo de microsatélites (100, 101) y varios polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) (102-104), que modifican los niveles plasmáticos de AM circulante en los individuos portadores. Además, también se ha comprobado que los niveles de AM pueden estar influidos por mutaciones en otros genes; como un polimorfismo de inserción/delección exónica en el gen de la AM-2/intermedina (105), un SNP en el gen de la IL-6 (106) o un SNP en el gen de la adiponectina (107). Es muy relevante el hecho de que los individuos homocigotos para estas mutaciones han demostrado tener una mayor predisposición genética a desarrollar ciertas patologías como hipertensión, disfunción renal, disglucemia o enfermedades cerebrovasculares; a excepción de los individuos homocigotos para el alelo menor del SNP rs4910118, cuyos niveles de AM circulante son significativamente menores que los de las personas portadoras del alelo mayor (104), que tienen una probabilidad 4.6 veces menor de desarrollar un cáncer a lo largo de su vida (108).

El péptido maduro de AM deriva de una preprohormona, conocida como preproadrenomedulina, que en humanos contiene 185 aminoácidos. Tras la escisión del péptido de señalización N-terminal formado por 21 aminoácidos, la preproadrenomedulina se convierte en proadrenomedulina, la cual es precursora de la AM madura (aminoácidos 95 a 146 de la preproadrenomedulina), así como de otro péptido activo, el péptido aminoterminal de la proadrenomedulina (PAMP), el cual contiene solo 20 aminoácidos (aminoácidos 22-41 de preproadrenomedulina) (95) (Figura 8).

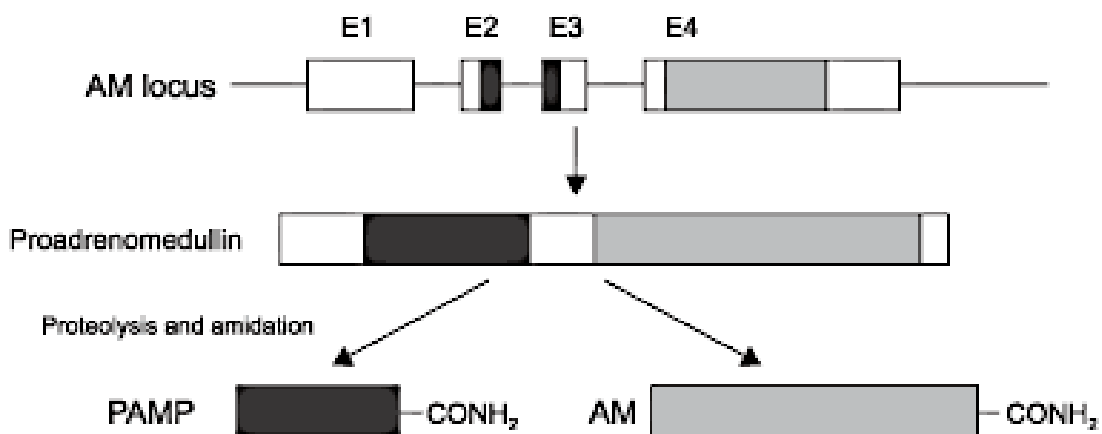


Figura 8. Representación esquemática de la biosíntesis de la AM y el PAMP (109).

La producción de AM está principalmente regulada por el estrés oxidativo y las sustancias relacionadas con procesos inflamatorios, como los lipopolisacáridos y las

citocinas pro-inflamatorias (TNF- α o IL-1), que incrementan la tasa de secreción de AM. En el gen de la AM hay varios sitios de unión para la proteína activadora 2 (AP-2) y elementos potenciadores regulados por AMPc. También se han descubierto sitios de unión para el factor nuclear-K β en el promotor del gen de la AM (93). La hipoxia también es un potente inductor de la expresión del gen de la AM. Esta sobreexpresión está mediada por la transactivación del promotor de la AM a través del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), así como por la estabilización del ARN mensajero post-transcripcional. Distintos elementos de respuesta a hipoxia (HREs) se han identificado en el promotor del gen humano de la AM (110).

3.2.3. Metabolismo de la adrenomedulina

La AM es un péptido circulante que se puede detectar en el plasma humano a una concentración que varía entre 2 y 10 picomolar. Además de en el plasma, la AM también se encuentra presente en otros fluidos biológicos como la orina, saliva, sudor, leche materna, fluido amniótico y líquido cefalorraquídeo (98).

En el plasma, la AM viaja unida de forma específica a la proteína de unión a AM tipo 1, la cual, fue identificada posteriormente como el factor de complemento H (111). La AM unida al complemento H es indetectable, por ello, se cree que los niveles de AM plasmática total podrían ser más elevados de lo que se menciona en la mayoría de estudios.

La AM circulante se degrada rápidamente, su vida media es de 16 a 20 minutos. La metaloproteasa de matriz 2 parece ser la responsable de llevar a cabo la degradación inicial de la AM, que es continuada por una aminopeptidasa (112, 113).

3.2.4. Los receptores de la adrenomedulina y su distribución

Existen sitios específicos de unión para la AM en varios tipos celulares y tejidos, como en corazón, pulmón, bazo, hígado, conductos deferentes, glomérulos renales, músculo esquelético, hipotálamo, médula ósea...(98). Esta amplia distribución de sus sitios de unión está relacionada con la gran variedad de funciones biológicas que posee esta hormona. Además, estudios posteriores también demostraron que la AM es capaz de unirse a numerosas áreas cerebrales, proporcionando las bases anatómicas de la implicación de la AM en la fisiología del sistema nervioso central (114). Los mismos estudios también proporcionaron evidencias de la posible existencia de sitios de unión para la AM en el cerebro que serían distintos a los existentes en los tejidos periféricos, y que tendrían además distintas afinidades por la AM (114).

El receptor de la AM pertenece a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G, y recibe el nombre de receptor similar al receptor de la calcitonina (CLR). Sin embargo, el CLR necesita la presencia de proteínas moduladoras con un único dominio transmembrana conocidas como proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP). En el genoma humano se han identificado 3 isoformas de RAMP: RAMP1, RAMP2 y RAMP3. Las RAMP se unen al CLR en el retículo endoplasmático promoviendo su desplazamiento hasta la membrana plasmática (115).

RAMP1 transporta y presenta al CLR en la superficie de la membrana como una glicoproteína madura; además, este heterodímero funciona como un receptor de CGRP (115).

Las moléculas de CLR transportadas por RAMP2 y RAMP3 son proteínas glicosiladas en su core y funcionan como receptores de AM (AMR). El dímero CLR/RAMP2 se conoce como AMR₁, mientras que el dímero CLR/RAMP3 es el AMR₂ (95, 116).

Qi *et al.* (117) estudiaron las diferencias existentes entre las secuencias de RAMP1, y RAMP2 y RAMP3 para poder identificar residuos individuales que pudiesen alterar su farmacología. Propusieron que residuos presentes en RAMP2 y RAMP3, pero no en RAMP1, son los responsables de convertir a los dímeros de CLR con estas dos RAMP en receptores exclusivos de la AM. Informaron además que la posición 74 en RAMP2 y RAMP3 es crítica para establecer su afinidad por la AM, mientras que el residuo Phe93 en RAMP1 contribuye de manera muy importante a su afinidad con los receptores de CGRP (117).

La expresión de las distintas isoformas de RAMP en un tipo celular concreto podría cambiar entre los estados fisiológicos y patológicos, determinando el grado de respuesta a la AM y al CGRP (118). En condiciones fisiológicas, la isoforma más abundante es RAMP2, sugiriendo que la mayoría de moléculas de CLR se unirían a él para formar un receptor funcional para la AM. Sin embargo, cambios dinámicos en el patrón de expresión de los genes de RAMP tienen lugar cuando se produce una enfermedad, o hay determinadas situaciones fisiológicas como el embarazo. Los cambios más importantes en los niveles de expresión de RAMP coinciden con aquellas situaciones en las que la concentración plasmática de AM es más elevada, como durante el embarazo o en enfermedades como la sepsis o la insuficiencia cardíaca. En estos casos en los que los niveles de AM son mucho más elevados se produce un aumento en la expresión de RAMP3, aparentemente para lograr compensar los aumentos de AM con una menor respuesta a su presencia (118).

3.2.5. Mecanismos de transducción de señales de la adrenomedulina

Los mecanismos de transducción de señales activados por la AM varían de unas especies a otras, entre órganos, entre tejidos, e incluso, de un tipo celular a otro. Sin embargo, hay tres vías principales de señalización por las cuales la AM ejerce sus acciones: la vía del AMPc, la vía del Akt (también conocida como proteína quinasa B (PKB)) y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)-proteína quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).

La vía de transducción más importante activada por la AM parece ser el sistema adenilil ciclasa/AMPc. En muchos tipos celulares, los receptores de AM y CGRP están asociados a proteínas G_s que activan la adenilato ciclasa e incrementan los niveles intracelulares de AMPc (95). En células endoteliales de aorta bovina y en células musculares lisas vasculares (VSMC) la acumulación de AMPc provoca la activación de la PKA, que a su vez incrementa los niveles de calcio intracelular, conduciendo a la relajación de las células vasculares (119). Por otra parte, la AM puede inducir la movilización de los iones de calcio independientemente de los niveles de AMPc. Este hecho sugiere que existe otro mecanismo implicado en la acción ionotrópica positiva de la AM. Esta teoría fue confirmada por Szokodi *et al.* (120). La AM activaría a la fosfolipasa C a través de su receptor específico, acelerando la formación del Inositol-1,4,5- P_3 , lo que a su vez estimularía la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplasmático (119, 120). Además, la activación de la fosfolipasa C también está implicada en la apertura de los canales iónicos.

Sin embargo, otros estudios muestran que la administración exógena de AM no tiene ningún efecto en la concentración intracelular de calcio, e incluso disminuye los niveles de calcio en células HUVEC en cultivo (121) o en arterias coronarias porcinas (122). Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que la regulación de la movilización del calcio intracelular mediado por la AM dependería del tipo celular y del contexto.

También se ha visto en cardiomiocitos que el calcio intracelular aumenta en respuesta a la AM, a través de la activación de la sintasa del óxido nítrico (NO) y de la liberación al medio de NO, lo que conduce a una relajación celular (123).

La activación de la vía del NO mediada por AM tiene un papel crucial en la regulación del sistema cardiovascular a través de la regulación del flujo sanguíneo (124). La vía del NO y sus especies oxidativas reactivas producen una elevación del flujo colateral en tejidos isquémicos, logrando un efecto citoprotector contra el daño isquémico y contra las arritmias inducidas por isquemia miocárdica en ratas (125). Además, Sata *et al.* demostraron que la AM inhibe la apoptosis de las células

endoteliales a través de un mecanismo dependiente de la vía del NO (126). Sus resultados sugieren que el efecto antiapoptótico de la AM mediado por NO es independiente del guanosín monofosfato cíclico (GMPc), a pesar de que la mayoría de funciones vasodilatadoras del NO están mediadas por el sistema GMPc/GMPc dependiente de quinasas (126). Algunos autores postulan que el NO activado por AM previene de la apoptosis a través de la S-nitrosilación del sistema de caspasas (127-129).

En cuanto a su segunda vía principal de transducción de señales, la AM ha demostrado que activa la vía fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt en las células del endotelio vascular donde regula numerosos procesos; como la vasodilatación, la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la formación de estructuras vasculares en haces (130). El papel específico de la AM en los procesos angiogénicos está regulado por un mecanismo que requiere de la activación de los receptores AMR₁ y AMR₂ (131).

Otros descubrimientos sugieren que la AM también actúa directamente sobre el miocardio gracias a la presencia del CLR en los miocitos, y que esta hormona induce sus efectos cardioprotectores y antiapoptóticos después de un proceso isquémico a través de la vía PI3K/Akt, que permite además la neovascularización del tejido afectado (132).

El papel de la AM en el crecimiento y en la mitogénesis ha conducido a varios científicos a investigar la hipotética regulación de la AM sobre la vía de las MAPK. La señalización mediada por AM promueve directamente el crecimiento de las células endoteliales y la supervivencia a través de la activación de la vía MAPK/ERK (133). Curiosamente, en las células mesangiales glomerulares la AM tiene el efecto opuesto, promoviendo la apoptosis durante la falta de suero en el medio (134). Sin embargo, en células endoteliales y tumorales la AM inhibe la apoptosis, sugiriendo que el efecto de la AM sobre la apoptosis estaría condicionado por el tipo celular (93).

Se ha propuesto que el efecto proapoptótico de la AM en las células mesangiales estaría mediado por la activación de MAPK y otras quinasas como PKA dependiente de AMPc, JKN o la fosfatasa 2A. Por otro lado, la AM protegería a las células malignas de la muerte inducida por hipoxia mediante la regulación positiva de Bcl-2 de un modo autocrino o paracrino (135).

De igual modo, parece que la AM estimula o inhibe la proliferación celular dependiendo del tipo celular concreto. Las respuestas proliferativas mediadas por AM serían una consecuencia de la activación de la vía de la proteín tirosin quinasa-MAPK. Sin embargo, en células carentes de MAPK, el aumento en los niveles de AMPc causado por la AM conduciría a una inhibición del crecimiento celular (136).

En VSMCs existen resultados contradictorios al respecto. Inicialmente se sugirió que la AM tenía efectos antiproliferativos (137). Pero estudios más recientes postulan que la AM ejerce una potente acción mitogénica en este tipo celular cuando se les retira el suero del medio de cultivo (138, 139). Bajo condiciones de privación de suero, la AM promueve la síntesis de ADN y la proliferación de las VSMCs. Estas respuestas estarían mediadas por la activación del sistema p42/p44 por MAPK. La AM estimula la síntesis de la tirosin quinasa 2 rica en prolinas, que a su vez, activa al promotor c-Src e induce el reclutamiento de proteínas mediadoras (Shc/Grb2), lo que conduce a una activación de la cascada de Ras-MAPK.

Todos los mecanismos de señalización en los que la AM participa son la base de su extenso repertorio de funciones biológicas como la vasodilatación, la proliferación celular, la modulación de la apoptosis o la regulación inflamatoria.

3.2.6. Acciones fisiológicas de la adrenomedulina

El papel principal desempeñado por la AM en el desarrollo de mamíferos se ha hecho evidente a raíz de la generación de diferentes modelos knockout (KO). En ratones KO para el gen de la AM, en los que la expresión de AM y PAMP se ha suprimido, el fenotipo nulo es letal a nivel embrionario debido a la ausencia de vascularización de la placenta, malformación de la membrana basal en la aorta y las arterias del cuello del útero, el desprendimiento de las células endoteliales de la estructura basal, y a la presencia de edema (140). Otros grupos han generado modelos KO de ratones donde solo la expresión de AM, pero no la de PAMP, está suprimida (141). El genotipo $AM^{-/-}$ también es letal a nivel embrionario, y ambos genotipos $AM/PAMP^{-/-}$ y $AM^{-/-}$ causan la muerte de los embriones en el mismo momento, entre los días 14 y 15 de desarrollo embrionario.

Para demostrar la importancia *in vivo* del CLR, se creó un modelo especial donde se knockeaba el gen de este receptor (*Calcrl*). Los ratones heterocigotos para el alelo diana parecían normales, sobrevivían hasta la etapa adulta y eran normales en términos reproductivos. Sin embargo, las crías $Calcrl^{-/-}$ no eran viables, los embriones morían entre los días 13 y 14 de gestación y tras su extracción se comprobaba que exhibían un fenotipo muy similar al de los embriones $AM^{-/-}$ y $AM/PAMP^{-/-}$ (142) (Figura 9). Estos resultados demuestran que tanto el gen de la AM, con el gen de su receptor son esenciales para la supervivencia del embrión.

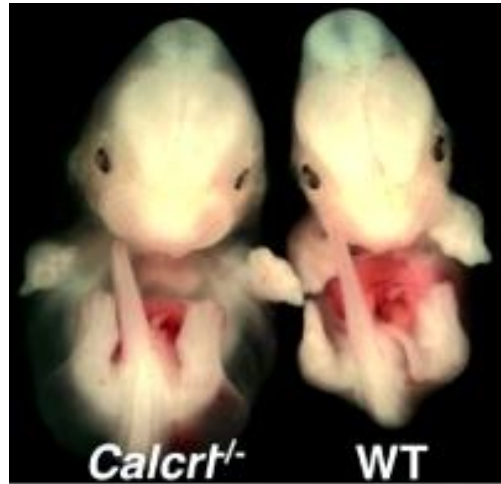


Figura 9. Hidrocefalia y edema severo observados en los fetos $Calcrl^{-/-}$ en comparación con fetos normales (WT) (142).

En modelos animales transgénicos donde se elimina el gen de RAMP2 se obtiene un resultado similar a los señalados anteriormente. Los embriones $RAMP2^{-/-}$ morían en el útero a la mitad de la gestación debido a malformaciones severas, fragilidad vascular, edema severo y hemorragias. En contraste, las crías $RAMP2^{+/-}$ eran viables, alcanzaban la edad adulta pero mostraban una gran variedad de fenotipos asociados a la hiperpermeabilidad vascular y fallos de neovascularización (143). Estos datos demuestran que RAMP2 es un factor clave y determinante en los efectos que la AM ejerce a nivel vascular, y que es esencial para la integridad vascular y los procesos de angiogénesis.

Estudios más recientes con animales transgénicos a los que se les knockea el gen de RAMP2 en el endotelio ($E-RAMP2^{-/-}$) han permitido confirmar que el sistema AM-RAMP2 es clave y determinante para la integridad vascular y la homeostasis sistémica, desde estadios embrionarios hasta la edad adulta (144). La mayoría de los ratones $E-RAMP2^{-/-}$ mueren en el período perinatal, y los pocos supervivientes muestran anomalías vasculares de forma espontánea a medida que crecen. Además, al envejecer, estos ratones transgénicos desarrollan una fibrosis severa en hígado, corazón y riñón; así como una importante y acelerada senescencia vascular asociada a un elevado estrés oxidativo (144). Estudios posteriores *in vitro* revelaron que la fragilidad vascular es consecuencia de una desorganización de las fibras de actina que conduce a una separación de las células endoteliales. El grupo de Koyama *et al.* han demostrado que el sistema AM-RAMP2 regula la proporción de Rac1-GTP/RhoA-GTP y la formación de actina, de modo que alteraciones en este sistema conlleva a la interrupción de la formación de actina que a la larga ocasiona un daño vascular y orgánico crónico.

Sorprendentemente, la ausencia absoluta de RAMP3 no tiene efectos adversos en la supervivencia. Los ratones KO para RAMP3 parecen normales hasta los 9-10 meses, momento en el que se comprueba que su peso y tamaño son menores a los de sus hermanos de camada con el receptor intacto (145). Esto sugiere que RAMP2 y RAMP3 tienen funciones fisiológicas distintas durante la embriogénesis y la vida adulta.

Para poder realizar el estudio de la falta de AM en distintos órganos y tejidos durante la vida adulta se han creado modelos KO condicionales usando la tecnología Cre/loxP (146). La proteína Cre, de origen viral, reconoce las secuencias loxP de forma que cuando encuentra dos de ellas en tándem corta toda la secuencia intermedia dejando una sola secuencia loxP (Figura 10). De este modo, el gen de la AM estaría flanqueado por las secuencias loxP y la expresión de Cre estaría dirigida por un promotor específico de distintos órganos o tejidos, como el promotor de la cadherina 5 para la expresión de Cre en células endoteliales (147), el promotor de la adiponectina para la expresión de Cre en el tejido adiposo (148) o el promotor de la tubulina $\alpha 1$ para lograr la expresión de Cre en neuronas del sistema nervioso central (149).

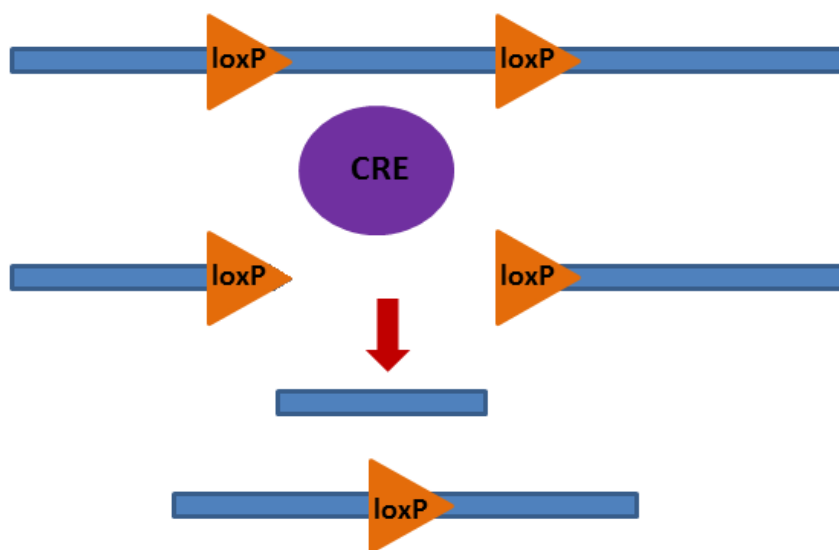


Figura 10. Esquema del funcionamiento del sistema Cre/loxP. Cuando hay dos regiones loxP en tándem en la misma hebra de DNA, la proteína Cre elimina la zona de DNA comprendida entre ambas secuencias, dejando una de ellas.

En el organismo adulto, la AM se ha localizado en varios tipos celulares y en la mayoría de tejidos corporales (150). Esta amplia distribución sugiere que la AM ejerce diversas funciones fisiológicas y que necesita un sistema de regulación muy fino. El gen de la AM se expresa, entre otros, en el sistema nervioso y sus estructuras

relacionadas, en el sistema cardiovascular, en órganos endocrinos, en el aparato digestivo, respiratorio y genitourinario, en estructuras óseas y musculares...

La AM controla y lleva a cabo una gran variedad de acciones biológicas de suma importancia para la homeostasis cardiovascular, el crecimiento y correcto desarrollo de los tejidos vasculares, y para la regulación de los fluidos corporales. La administración sistémica de AM exógena ha demostrado que este péptido reduce la presión arterial, disminuye la resistencia vascular periférica e incrementa la frecuencia y el gasto cardíaco (151). *In vitro*, la AM dilata los vasos sanguíneos de diferentes lechos vasculares pertenecientes a distintas especies animales. Respecto al mecanismo del efecto vasodilatador de la AM, la mayoría de los datos indican que puede inducir la dilatación del endotelio de forma independiente al actuar sobre los receptores CGRP₁ y elevar el nivel de AMPc en las VSMCs (93). Además, la AM se une de forma específica a receptores presentes en las células endoteliales y ejerce acciones vasodilatadoras mediadas por el sistema del NO (152), por el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (153), y/o por prostanoïdes vasodilatadores (154).

Por otro lado, se han acumulado evidencias que sostienen un papel compensatorio de la AM en el fallo cardíaco (155). Se ha establecido que los niveles plasmáticos de AM se encuentran incrementados de forma significativa en pacientes con fallo cardíaco respecto a la población general; además, este aumento es proporcional a la severidad de la patología: cuanto mayores sean los niveles de AM, peor es el estado clínico del paciente (156). Varios estudios sugieren incluso que los niveles plasmáticos de AM son un factor pronóstico independiente del fallo cardíaco (157). Este péptido sería capaz de regular la hipertrofia del miocardio y su remodelación en la hipertensión arterial de una forma autocrina y paracrina (156).

La AM también ejerce un estrecho control sobre la función renal y el volumen de fluido corporal (158). En primer lugar, ejerce un control directo sobre los riñones, afectando a la diuresis y natriuresis. Además, regula el eje hipotalámico-pituitario-adrenal a todos los niveles (159). Se ha demostrado en ensayos animales que las infusiones intracerebrales de AM inhiben la sed y la ingestión de sales (160). En la pituitaria, la AM es capaz de inhibir la secreción de vasopresina y ACTH; mientras que en la glándula suprarrenal controla la secreción de aldosterona (159).

Por otro lado, la AM regula la secreción de varias hormonas en distintos tejidos y órganos. Los niveles de este péptido tienen efectos en el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, como se ha mencionado anteriormente (159). Además, la AM es sintetizada por las células productoras de polipéptido F de los islotes pancreáticos; y las células β productoras de insulina expresan receptores específicos para AM (161).

La incubación de islotes en cultivo con un anticuerpo monoclonal contra AM provoca que se eleve hasta 5 veces la secreción basal de insulina (161). Esto indica que la AM endógena inhibe de forma fisiológica la secreción de insulina.

En el aparato reproductor femenino la AM es sintetizada por las células de la granulosa de los folículos del ovario. Los niveles plasmáticos de AM aumentan durante la fase folicular y disminuyen durante la fase lútea del ciclo menstrual (162). Tanto la AM como sus receptores se expresan en el útero, y esta expresión se incrementa de forma natural durante el embarazo (163). Esta hormona también se puede detectar en la placenta y en numerosos tejidos fetales, lo cual sugiere que podría estar íntimamente relacionada con la embriogénesis y el desarrollo normal del embarazo (164, 165).

En el sistema digestivo la inmunoreactividad de la AM se distribuye en la mucosa y el epitelio glandular del estómago, esófago, intestino, vesícula biliar, conductos biliares, y en los acinos de las glándulas salivales y del páncreas (166). Además, es capaz de regular la motilidad gastrointestinal y la producción de secreciones gastrointestinales; por ejemplo, es un potente inhibidor de la secreción basal de HCl mediada por gastrina (167).

Tanto la AM como sus receptores están ampliamente distribuidos por todo el sistema nervioso central (166, 168). Se encarga de regular algunas de las propiedades de la barrera hematoencefálica (169), aumenta la tasa de descargas simpáticas preganglionares (170), ejerce diversas acciones neuroprotectoras frente al daño por infarto cerebral (171), y regula el balance electrolítico y de fluidos corporales (158). Además, estudios relativamente recientes sugieren que la AM podría estar implicada en la respuesta neuroendocrina al estrés y en la nocicepción (149, 172).

Finalmente, la AM se ha detectado en todas las barreras epiteliales que separan el medio externo e interno del organismo (173), así como en todos los fluidos corporales. Todos estos datos sugerían que la AM podría tener una función relacionada con la inmunidad. A día de hoy se ha demostrado que tanto la AM como el PAMP son potentes agentes antimicrobianos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (94). Se ha descrito que los pacientes que sufren un shock séptico tienen niveles plasmáticos de AM elevados, probablemente como una acción de defensa frente a la infección (174). Sin embargo, una producción incontrolada de AM durante el estado de sepsis puede tener consecuencias adversas, como hipotensión severa, que pueden llegar a poner en peligro la vida del paciente (94).

3.3. EL USO DE LA ADRENOMEDULINA COMO TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Dentro del amplio abanico de funciones que ejerce la AM, hay varias que la convierten en una buena candidata para su posible uso en el tratamiento de la IBD. Por ejemplo, se ha demostrado que la AM es capaz de inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias actuando como un agente anti-inflamatorio natural secretado al medio por los monocitos de la sangre periférica cuando se transforman en macrófagos (95). A parte de actuar a nivel de las células inflamatorias, la AM también disminuye la permeabilidad endotelial, reduciendo la formación de exudados inflamatorios (95). Además, al ser un potente agente angiogénico (175) es necesaria para mantener la integridad de la microvasculatura de las mucosas (176), y favorece una curación y cicatrización de las lesiones más rápida (177). En 1999 ya quedó demostrado en un experimento *in vitro* que la AM era necesaria para la recuperación del epitelio gástrico tras la aparición de úlceras (178). Y por último, gracias a su efecto antimicrobiano, la AM podría ayudar a combatir el sobre crecimiento de bacterias no propias de la microbiota que se produce en los pacientes de IBD (94, 95).

Los valores añadidos al uso terapéutico de la AM son, por un lado, que se trata de una hormona producida de forma normal por el organismo y, por otro, que su administración exógena ya se ha probado en ensayos clínicos y estudios pilotos anteriores (179-185).

La AM ha demostrado en muchos estudios, realizados por grupos independientes, ser capaz de mejorar la severidad de las IBD en los principales modelos animales de colitis. (186-196)

En experimentación animal, las IBD se estudian a través de modelos de colitis, ya que el acceso al colon de los animales es más cómodo y seguro. Lo más habitual es usar modelos murinos a los que se les induce la colitis usando ácido acético por vía intra-rectal (186), dextrano sulfato sódico (DSS) administrado oralmente (187), ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) por instilación rectal (189) u oxazolona, que produce una colitis que histológicamente se asemeja más a la CU que a la EC (196). Tras la inducción de la colitis se procede al tratamiento con AM recombinante o suero salino en los controles. La AM se administra vía intraperitoneal o intra-rectal. La evaluación de la colitis se hace a 3 niveles: el macroscópico (evaluando el peso de los animales, la diarrea, sangrado en heces, y la observación del colon tras su extracción), el microscópico (mediante la evaluación del daño histológico) y el bioquímico (midiendo niveles de mediadores inflamatorios en el tejido y en la sangre).

La AM es capaz de desempeñar esta función protectora en los modelos de colitis a través de los siguientes mecanismos:

Por un lado, actúa como un potente factor anti-inflamatorio, tanto a nivel local como sistémico, manteniendo estable el balance de células Th1/Th2, disminuyendo el infiltrado de neutrófilos a la zona afectada y reduciendo los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ principalmente) (186, 187, 189). Estas acciones podrían estar mediadas a través de la regulación que la AM ejerce en la actividad de HIF: niveles altos de AM favorecen la síntesis de HIF-1 α , factor protector endógeno frente a procesos inflamatorios en las mucosas (192).

Además, la AM es esencial para el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial intestinal, siendo capaz de combatir la hiperactivación y la hiperpermeabilidad del epitelio gastrointestinal, ambos signos clínicos típicos de las IBD que favorecen la aparición de lesiones ulcerativas y la inflamación (187).

La administración de AM también aumenta significativamente la velocidad de reepitelización y regeneración del tejido ulcerado (193).

Y por último, la AM es capaz de proteger y restaurar la función vascular mesentérica dañada, disminuyendo los niveles de ciclooxigenasa-2 (enzima mediadora en procesos inflamatorios) en la microvasculatura de las ratas con colitis y del NO (potente vasodilatador) en el tejido del colon, pero no a nivel sistémico (191).

Al conseguir mejorar de forma muy significativa la severidad de la inflamación y los otros daños histológicos, el tratamiento con AM contribuye a mejorar el índice global de severidad de la enfermedad, controlando la pérdida de peso, las diarreas, el sangrado en heces y aumentando la tasa de supervivencia de los animales tratados frente a los controles.

En vista de los éxitos logrados en los modelos animales, ya se han realizado los primeros estudios piloto en pacientes con CU severa refractaria a los tratamientos convencionales (197, 198). Los datos son prometedores, ya que, la administración intravenosa de AM consigue reducir en todos los casos el índice de actividad de la enfermedad entre 5 y 12 puntos sobre 12, que es la puntuación máxima del Índice de Actividad de la Enfermedad de Colitis Ulcerosa, mejorando significativamente la curación de las úlceras (Figuras 11 y 12). En varios casos se consigue mantener el estado remisión clínica durante más de un año tras el tratamiento con AM. Y no se observan efectos adversos destacables, salvo el descenso leve de la presión arterial.



Figura 11. Hallazgos endoscópicos. Úlceras profundas y extensas se observan en el colon transverso (a) y sigmoideo (b) a día 0 del tratamiento. Dos semanas después del tratamiento con AM (c,d), una significativa neovascularización y regeneración de la mucosa se observan en los márgenes y la base de las úlceras en el colon transverso (c). En el colon sigmoideo, fibrosis (cicatrización) y vasodilatación se observan en las úlceras más superficiales. Las zonas fibróticas muestran una apariencia reticulada, como de tela de araña (d) (198).

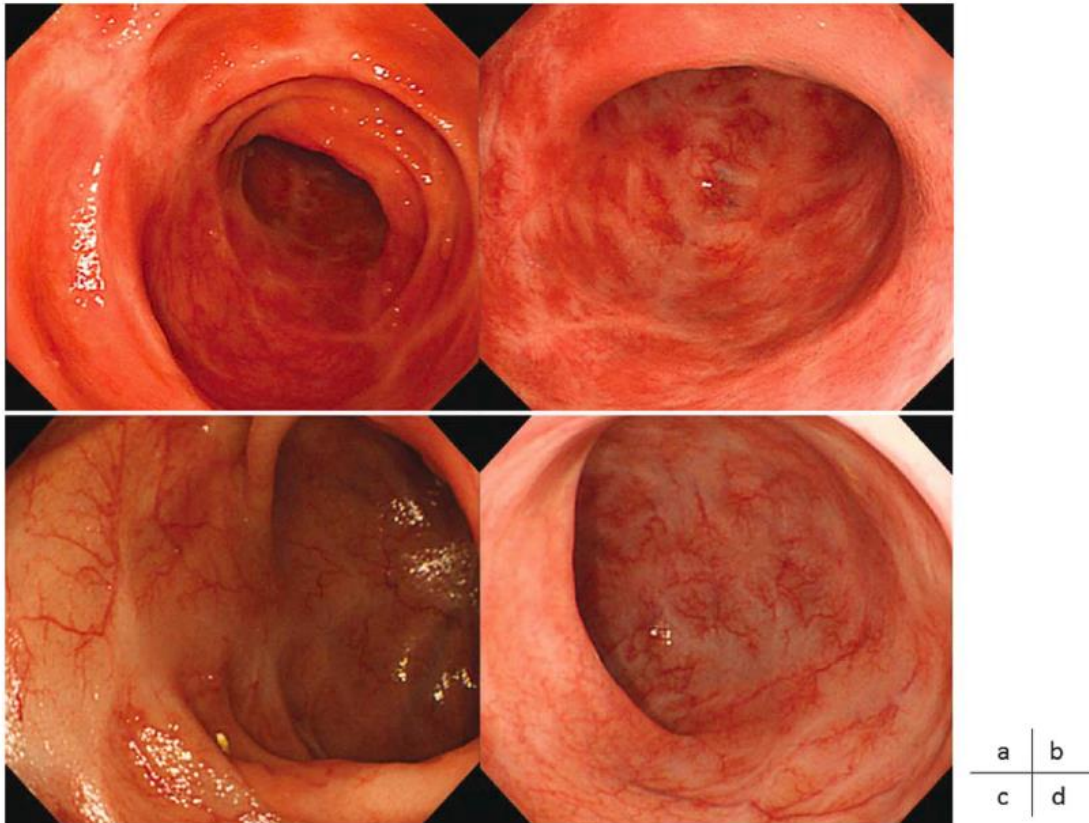


Figura 12. Hallazgos endoscópicos. Tres meses tras el tratamiento con AM las úlceras han desaparecido en su totalidad y algunas cicatrices se observan en el colon transverso (a) y sigmoideo (b). Un año tras el tratamiento con AM, la mucosa del colon transverso (c) y del colon sigmoideo (d) permanece en estado de remisión, con una vascularización totalmente recuperada (198).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Hasta el momento, todas las aproximaciones experimentales para determinar la relación entre la AM y las IBD han sido desde un punto de vista terapéutico. La administración exógena de AM ha demostrado tener efectos beneficiosos en los principales modelos animales de colitis (186, 187, 191) y en los primeros estudios clínicos pilotos realizados en pacientes con CU severa refractaria al tratamiento convencional con corticosteroides (197, 198).

Sin embargo, no existe ningún estudio publicado hasta el momento que investigue una posible relación entre la AM endógena y la patogenia de la enfermedad.

Recientemente se ha descubierto un polimorfismo en las proximidades del gen de la AM que conduce a niveles plasmáticos más bajos de esta hormona en los individuos portadores (104). Estudios previos realizados por nuestro grupo sugieren que este polimorfismo se relaciona con efectos protectores frente al cáncer (108); y podría estar relacionado con otras patologías en las que la AM juegue algún papel. Si la AM tiene efectos positivos sobre las IBD, los pacientes que tengan niveles bajos de esta hormona podrían presentar una mayor susceptibilidad a desarrollar la patología, una mayor severidad clínica y/o una peor respuesta a la terapia. Si se corrobora esta hipótesis, se podría iniciar una nueva línea de investigación para establecer si una de las posibles causas genéticas de susceptibilidad al desarrollo y peor pronóstico de la enfermedad es la presencia de mutaciones o polimorfismos en el gen de la AM o de sus receptores. Para conseguir una demostración formal de los efectos que los niveles endógenos de AM puedan tener en las IBD es necesario un enfoque genético, en el que usando un modelo animal se deleccione el gen de la AM todo el organismo.

Por tanto, el objetivo principal del presente estudio es generar un modelo KO global para AM que permita establecer si existe o no relación entre la presencia de AM endógena y el desarrollo y grado de patogénesis de las IBD. La hipótesis de la que partimos es que la ausencia de AM conducirá a una mayor severidad de la enfermedad.

Los objetivos secundarios son, en el caso de que se corrobore la hipótesis de trabajo, intentar averiguar cuáles son los mecanismos biológicos que intervienen en el desarrollo de una mayor patología en los animales KO mediante estudios de parámetros macroscópicos, microscópicos y bioquímicos; de acuerdo con la metodología seguida en los artículos consultados (186-196, 199).

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. GENERACIÓN DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

Como se ha mencionado anteriormente, los ratones KO totales para AM, PAMP, o los receptores CLR y RAMP2 no son viables y mueren a partir de la segunda semana de gestación (140-143). Por ello, para poder conseguir generar los ratones KO totales necesarios para el experimento es preciso usar un modelo genético de inducción de la delección en ratones adultos.

Para ello, se ha empleado la tecnología Cre/*loxP* (146): los ratones que contienen el gen de la AM flanqueado por las secuencias *loxP* (que se conocen como ratones “floxeados”) se habían generado previamente en nuestro laboratorio (149). Estos animales se cruzaron con otra línea de ratones transgénicos que contenían un sistema de recombinación donde la expresión de Cre es inducida por tetraciclina o por su análogo, doxiciclina (Figura 13), obteniendo una línea tritransgénica (línea AM DOXI, identificada en el animalario con la letra “X”).

Esta segunda línea de ratones transgénicos se consiguió cruzando una línea de ratones mutantes C57BL/6 que tienen una expresión optimizada y global, dirigida por el promotor endógeno Gt(ROSA)26Sor, del transactivador reverso activado por tetraciclina (rtTA-M2) (línea 006965, The Jackson Laboratory Bar Harbor, ME, EE.UU.) y una línea de transgénicos del mismo fondo genético (C57BL/6) que expresan la recombinasa Cre bajo el control de un elemento promotor de respuesta a tetraciclina, tetO (línea 006234, The Jackson Laboratory) (Figura 13).

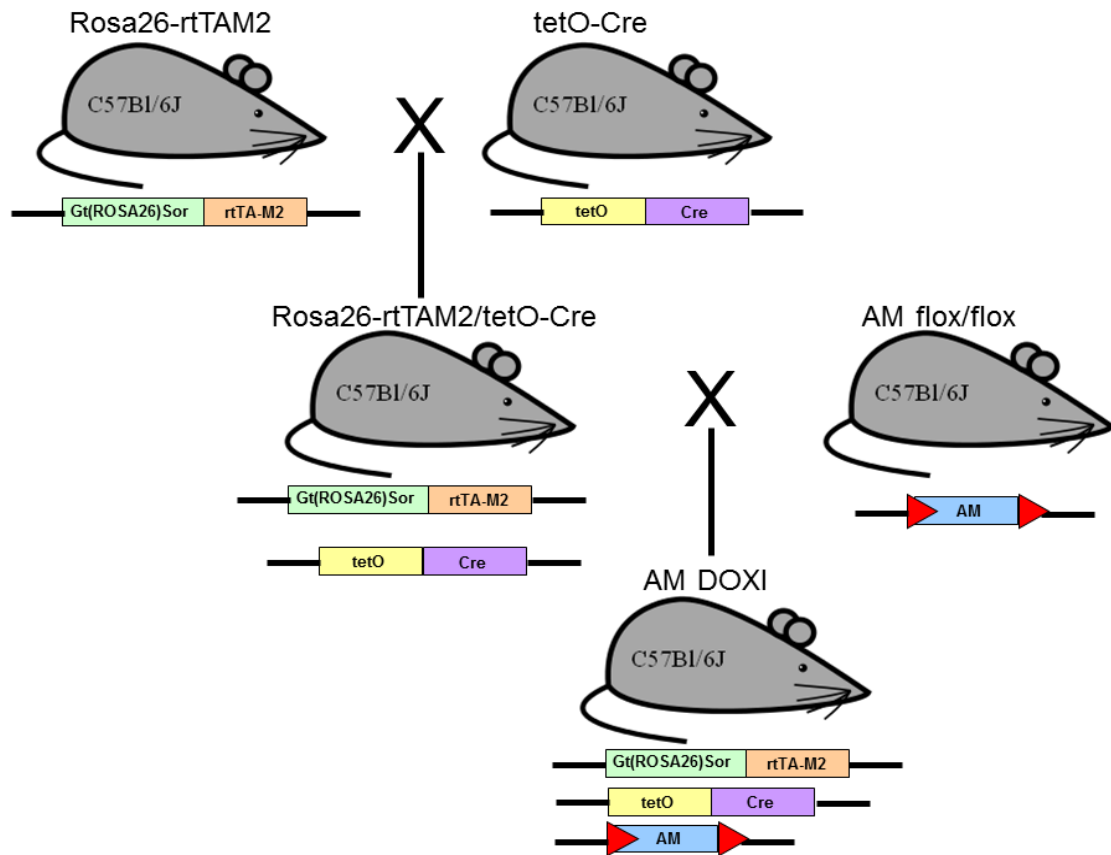


Figura 13. Generación de los ratones transgénicos KO totales para el gen de la AM inducibles mediante la tecnología Cre/LoxP y los promotores e inductores de respuesta a tetraciclina.

De este modo, cuando los ratones tetO-Cre se cruzan con ratones Rosa26-rtTAM2, la expresión de la proteína Cre y la recombinación mediada por esta en los ratones descendientes (línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre, identificada en el animalario con la letra “W”) se puede regular mediante la administración de doxiciclina. Este sistema de inducción se conoce como sistema tet-On (Figura 14) (200). Al poder regular el momento de expresión de Cre, podemos controlar el momento en que se delecte el gen de la AM y, por tanto, la expresión de la proteína AM.

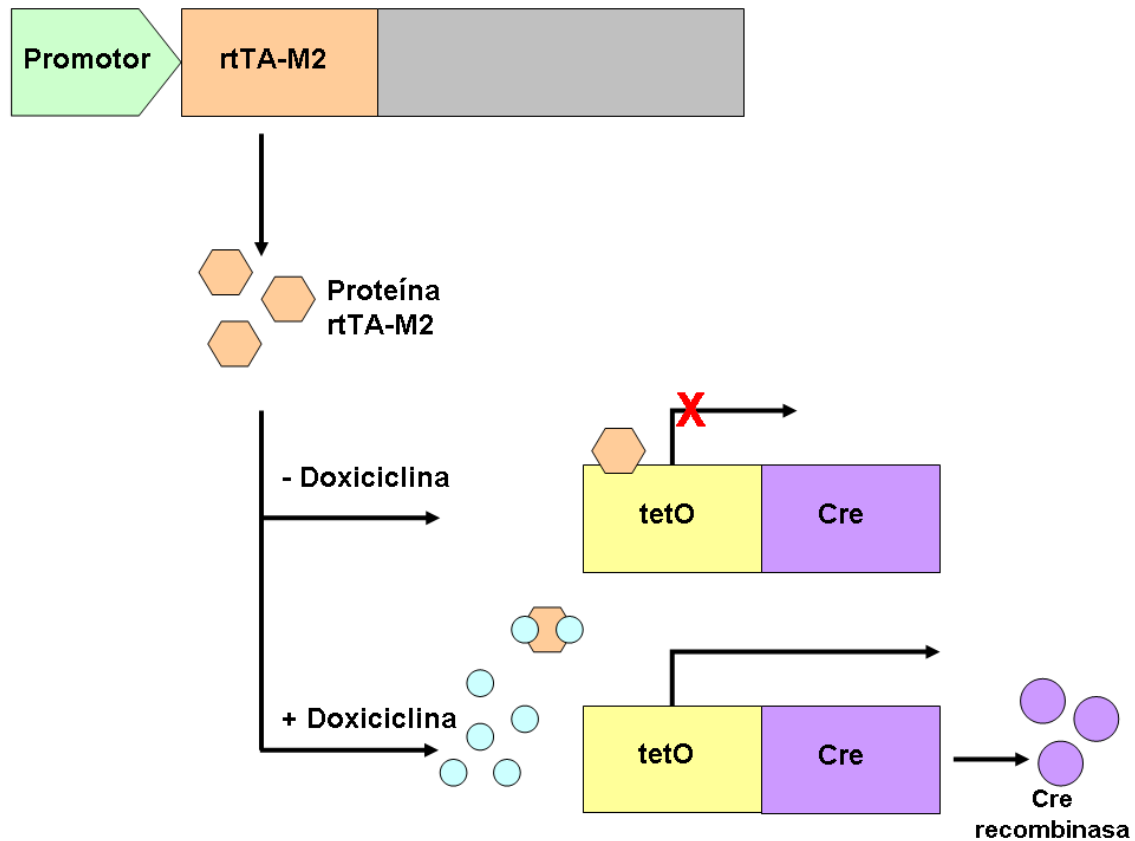


Figura 14. Representación esquemática del funcionamiento del sistema tet-On. El transactivador reverso activado por tetraciclina (rtTA-M2) produce una proteína que se une de forma específica al elemento promotor de respuesta a tetraciclina (tetO). En ausencia de doxiciclina, la proteína represora es activa y bloquea la expresión del promotor tetO y del gen Cre que está inmediatamente después. Sin embargo, en presencia de doxiciclina, esta se une a la proteína represora y la inactiva, permitiendo la expresión del promotor tetO y del gen responsable de la síntesis de la proteína Cre recombinasa (201).

5.2. GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

5.2.1. Extracción del ADN genómico

El genotipo de los ratones se realizó a partir del ADN genómico de biopsias de cola recogidas antes del destete de los animales, en la tercera semana de vida. La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo (mientras no se especifique lo contrario, todos los reactivos químicos proceden de Sigma-Aldrich, Dorset, England):

Las biopsias de la parte terminal de la cola se recogieron en viales de 1,5 mL identificados. Cada biopsia se digirió añadiendo 500 μ L de un búffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.5; EDTA 5 mM; SDS 2% y NaCl 200 mM) y 5 μ L de proteinasa K 10 mg/mL (Proteinase K, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se dejó incubar la reacción de digestión toda la noche en un termobloque a 55°C y con agitación, 500 rpm (Mixing Block MB-102, BIOER, Hangzhou, China). Al día siguiente, las digestiones se centrifugaron a velocidad máxima (16 100 x g, *Centrifuge 5415R*, Eppendorf,

Hamburgo, Alemania) a 4°C durante 60 minutos. Se trasvasó todo el sobrenadante a un vial nuevo, y se precipitó el ADN con 500 µL de isopropanol. El tubo se agitó hasta que apareció el ovillo de ADN. Tras una centrifugación de 10 minutos a velocidad máxima se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Este paso se realizó dos veces. Tras la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire. Por último, este precipitado se resuspendió en 200 µl de agua ultrapura (MiliQ), y se almacenó a -20°C hasta su uso para realizar las PCR.

5.2.2. Genotipado de ratones mediante PCR

El genotipo de los ratones se determinó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos (Tabla 4) y el ADN genómico extraído de acuerdo al protocolo explicado anteriormente.

Para la línea de ratones Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre se realizaron dos reacciones de PCR diferentes. Una para detectar la presencia del rtTA-M2 en el alelo Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} y otra para detectar la presencia o ausencia del gen de la Cre recombinasa.

La reacción de amplificación del alelo Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}, de acuerdo con el protocolo facilitado por The Jackson Laboratory (202), se realizó con 1 µL de ADN genómico (50 – 200 ng) y tres cebadores: un cebador sense común a ambos genotipos, y un cebador específico para la presencia o ausencia del transactivador. Las secuencias de los cebadores que fueron utilizados en la reacción y el tamaño de los amplicones generados se muestran en la Tabla 4. Una reacción típica para el genotipado de los animales se realiza en un volumen final de 25 µl con 1 µl de ADN genómico de ratón, 2,5 µl de búffer de reacción con magnesio 10x (Biotools, Madrid, España), 0,5 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µl del cebador sense común, 1 µl del cebador antisense mutante y 1 µl del cebador antisense WT 10 µM, 1 µl de la enzima Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools) y 17 µl de agua ultrapura (MiliQ).

Para el genotipado del transgen tetO-Cre se amplificó un fragmento de 625 pb del gen de Cre (203). Como control interno de la reacción se amplificó un fragmento de 325 pb del gen IL-2 (Tabla 4). La reacción se realizó en un volumen total de 25 µl con 1 µl de ADN genómico de ratón y los siguientes componentes: 2,5 µl de búffer de reacción con magnesio 10x (Biotools), 0,5 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µl del cebador sense Cre y 1 µl del cebador antisense Cre, 0,5 µl del cebador sense de la IL-2 y 0,5 µl del cebador antisense de la IL-2, todos los cebadores a una concentración de 10 µM, 1 µl de la enzima Taq polimerasa (1 U/µl, Biotools) y 17 µl de agua ultrapura (MiliQ).

Para genotipar la línea de ratones AM DOXI, además de las dos reacciones anteriores, hubo que realizar una tercera PCR para detectar la presencia de las secuencias *loxP* flanqueando al gen de la AM. Las secuencias de los cebadores que fueron utilizados en la reacción y el tamaño de los amplicones generados se muestran en la Tabla 4. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l con 1 μ l de ADN genómico de ratón y los siguientes componentes: 2,5 μ l de búffer de reacción con magnesio 10x (Biotools), 0,5 μ l de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 μ l del cebador sense AM floxeada y 1 μ l del cebador antisense AM floxeada 10 μ M, 1 μ l de la enzima Taq polimerasa (1 U/ μ l, Biotools) y 18 μ l de agua ultrapura (MiliQ).

Cebador	Secuencia 5' – 3'	Resultados esperados
Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} mutante antisense	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	rtTA-M2 ^{+/+} : banda 340 pb rtTA-M2 ^{+/-} : bandas 340 pb y 650 pb rtTA-M2 ^{-/-} : banda 650 pb
Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} común sense	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	
Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} WT antisense	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
Cre sense	CGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCA	Cre +: banda 625 pb
Cre antisense	CACCAGCTTGCATGATCTCCGGTATT	Cre -: no hay banda
IL-2 sense	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	Banda 325 pb
IL-2 antisense	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	
AM floxeada sense	TGATTATCGCCTGTGGATGA	AM flox/flox: banda ~ 650 pb AM flox/wt: bandas ~ 650 pb y ~ 625 pb
AM floxeada antisense	GCCTTAGCTCAGGTCCAGTG	AM wt/wt: banda ~ 625 pb

Tabla 4. Primers empleados para el genotipado de los ratones.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE.UU.) con el siguiente programa de temperaturas: comienza con un paso inicial a 94°C para desnaturalizar el ADN durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación. Cada uno de estos ciclos consta de tres pasos: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un segundo paso de anillamiento de los cebadores con al ADN genómico a 60°C durante 30 segundos y un paso final de elongación a 72°C durante

30 segundos. Y el último paso de la PCR es una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Las bandas amplificadas fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa (Biotools) al 1,5% en TBE 1x y colorante *Gel Red*® (1:10000, Biotium, Hayward, CA, EE.UU.). De los 25 µl finales de reacción de PCR en los geles se cargaron 10 µl a los que se le añadieron 2 µl de una solución de carga *Orange G* (Merck, Darmstadt, Alemania) al 1,5% en una solución de Ficoll (*Ficoll*® *Solution, Type 400, 20% water*). La electroforesis se resolvió a 80 V entre 35 minutos o 1 hora, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN analizados, se incluyó en los geles un marcador de peso molecular (*100 bp DNA Ladder*, Invitrogen).

Los ratones fueron seleccionándose de acuerdo a sus genotipos hasta obtener en la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre ratones homocigotos para la presencia del rtTA-M2 (rtTA-M2^{+/+}) y positivos para el gen de Cre (Cre +); y en la línea AM DOXI ratones homocigotos para la presencia del rtTA-M2 (rtTA-M2^{+/+}), positivos para Cre (Cre +) y homocigotos para la presencia de las secuencias *loxP* (AM flox/flox).

5.3. ESTUDIO PILOTO: GENERACIÓN DE LOS RATONES KO

Como ya se ha explicado anteriormente, en los sistemas genéticos tet-On la inducción de la expresión de la proteína Cre recombinasa se consigue administrando el análogo de la tetraciclina, doxiciclina.

La forma más común de administrar la doxiciclina (*Doxycycline hyclate*, Sigma-Aldrich, número de referencia D9891-10G) a los ratones es disolviéndola a una concentración de 2 mg/mL en el agua de bebida suplementada al 5% con sacarosa (200, 204, 205), de modo que el sabor dulce contribuya a contrarrestar el sabor del antibiótico y a que los animales beban con normalidad. La doxiciclina es un compuesto fotosensible y los biberones deben protegerse de la luz. Además, la solución debe renovarse cada 72 horas porque la doxiciclina se degrada con el paso del tiempo y deja de ser efectiva.

Para inducir la recombinación del gen deseado en la mayoría de tejidos basta con administrar la solución de doxiciclina durante una semana. Sin embargo, para conseguir que la doxiciclina llegue a aquellos tejidos donde existe una barrera hemática, como la barrera hematoencefálica o la barrera hematotesticular, puede ser necesario ampliar la administración a dos semanas (206).

Con el fin de determinar la dosis y la duración del tratamiento más adecuados para conseguir la delección del gen de la AM en todo el organismo se realizó un experimento piloto.

5.3.1. Animales

Se seleccionaron en total 20 animales de 9 semanas de edad de ambos sexos (Tabla 5). En un primer momento se incluyeron 15 ratones de la línea AM DOXI que se dividieron en 3 grupos de 5 animales cada uno: al primer grupo se le administró doxiciclina durante 7 días, al segundo grupo se le administró la solución de doxiciclina durante 14 días, y al tercer grupo no se le administró doxiciclina. Al analizar los resultados se comprobó que en los animales sin tratar con doxiciclina estaba ocurriendo una delección del gen de la AM de forma espontánea en la mayoría de los tejidos analizados, por eso, en vista a futuros procedimientos se incluyeron en el estudio piloto otros 5 animales de la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre que recibieron la solución de doxiciclina durante el tiempo máximo, 14 días.

Línea	Genotipo	Edad	n y sexo	Tratamiento
AM DOXI	rtTA-M2 ^{+/+} Cre + AM flox/flox	9 semanas	3 machos 2 hembras	Doxiciclina 2mg/mL 7 días
	AM DOXI			
AM DOXI	rtTA-M2 ^{+/+} Cre + AM flox/flox	9 semanas	1 macho 4 hembras	Agua normal
Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre	rtTA-M2 ^{+/+} Cre + AM wt/wt	9 semanas	2 machos 3 hembras	Doxiciclina 2mg/mL 14 días

Tabla 5. Características de la muestra de animales empleada en el estudio piloto para determinar las pautas más adecuadas de administración de doxiciclina para lograr la delección del gen de la AM en todos los órganos corporales.

La solución de doxiciclina en el agua suplementada de bebida se preparó disolviendo 300 mg de doxiciclina y 7,5 g de sacarosa en 150 mL de agua de bebida previamente autoclavada. Los biberones se protegieron de la luz con papel de plata. La solución de doxiciclina se renovó cada 72 horas.

El procedimiento se llevó a cabo con el consentimiento del Comité Ético de Experimentación Animal del CIBIR (número asignado de procedimiento CEEA-CIBIR 09/12). Todos los animales fueron revisados y pesados diariamente en busca de signos de malestar, prestando especial atención al estado de hidratación (test de turgencia de la piel) y a la presencia de diarrea. También se pesaron diariamente los biberones para asegurar que los ratones estaban consumiendo de forma adecuada la solución de doxiciclina. Se comprobó que durante las primeras 48 horas tras el cambio

de agua de bebida a solución de doxiciclina se produce un descenso de consumo de líquidos y casi todos los animales pierden peso (en torno al 10% respecto a su peso inicial); sin embargo, esta situación se normalizó en la totalidad de los casos al tercer día, cuando los animales ya se han acostumbrado al sabor de la bebida.

Una vez finalizado el procedimiento los animales se sacrificaron usando una dosis letal de anestesia (*Imalgene*® (MERIAL LABORATORIOS S.A., Barcelona, España), 300 mg/Kg; *Domtor*® (Norvet, Lugo, España), 3 mg/Kg por vía intraperitoneal, y se extrajeron muestras de colon, duodeno, páncreas, hígado, testículos/ovarios, bazo, glándula suprarrenal, riñón, pulmón, corazón, músculo esquelético (tríceps), cerebro e hipófisis. Tras lavar las muestras en PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.3.2. Extracción del ADN genómico de los órganos

La extracción de ADN de los órganos se realizó siguiendo el mismo protocolo empleado para las biopsias de cola de ratón (ver apartado 5.2.1. *Extracción del ADN genómico*).

Las concentraciones de ADN obtenidas en las muestras de órganos eran superiores a las obtenidas en biopsias de cola (600 – 800 ng/μL), por lo que se diluyeron en agua ultrapura hasta obtener una concentración final de 120 ng/μL.

5.3.3. Comprobación de la delección del gen de la adrenomedulina mediante PCR

Para comprobar la delección del gen de la AM tras la acción de recombinasa Cre se procedió a su respectiva identificación por PCR. Usando los cebadores específicos mostrados en la Tabla 6, el fragmento de la delección es de 600 pb, frente a los alrededor de 1300 pb en el alelo floxeado o en el alelo WT. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl con 1 μl de ADN genómico de ratón y el *KAPA LongRange PCR Kit with dNTPs*® (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EE.UU.) que permite amplificar fragmentos de ADN de gran tamaño.

Cebador	Secuencia 5' – 3'	Resultados esperados
AM delección sense	AAGGGAAGTCCTGCTCCAGT	AM ^{+/+} : banda ~ 2500 pb AM ^{+/-} : bandas ~ 600 y ~ 2500 pb
AM floxeada antisense	GCCTTAGCTCAGGTCCAGTG	AM ^{-/-} : banda ~ 600 pb

Tabla 6. Primers específicos empleados para comprobar la presencia de la delección del gen de la AM mediante PCR con ADN genómico obtenido de muestras de tejido.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron con el siguiente programa de temperaturas: comienza con un paso inicial a 94°C para desnaturalizar el ADN durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación. Cada uno de estos ciclos consta de tres pasos: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, un segundo paso de anillamiento de los cebadores con al ADN genómico a 64°C durante 15 segundos y un paso final de elongación a 72°C durante 3 minutos y medio. Y el último paso de la PCR es una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Las bandas amplificadas fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 2% con el mismo protocolo comentado anteriormente.

5.4. INDUCCIÓN DE LA DELECCIÓN DEL GEN DE LA ADRENOMEDULINA

A las 9 semanas de vida se procedió a administrar la solución de doxiciclina, siguiendo el mismo protocolo que en el estudio piloto (2mg/mL en el agua de bebida suplementada al 5% con sacarosa durante 14 días), a los 64 ratones que iban a formar parte del procedimiento de colitis aguda.

La mitad del grupo (32 animales) pertenecía a la línea AM DOXI, con lo que al administrar la doxiciclina se iba a lograr la delección del gen de la AM de todo el organismo. La otra mitad del grupo eran los animales control que pertenecían a la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre; en estos ratones al no estar floxeada la AM no iba a producirse ninguna recombinación génica (como ya se había comprobado en el estudio piloto), sin embargo, se consideró oportuno administrarles también la solución de doxiciclina para que ambos grupos partiesen de las mismas condiciones basales, ya que, por un lado la doxiciclina puede tener efectos sobre la flora bacteriana intestinal (207); y por otro, recientemente se ha comprobado que este compuesto puede modificar de forma significativa distintas vías intracelulares (208).

5.5. INDUCCIÓN DE LA COLITIS Y DISEÑO DEL ESTUDIO

5.5.1. Animales

Se emplearon 32 ratones KO para AM de la línea AM DOXI (16 machos y 16 hembras) y 32 ratones WT de la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre (16 machos y 16 hembras) de 16 semanas de edad (Tabla 7) a los que previamente se les había administrado la solución de doxiciclina (debido a los efectos secundarios de la doxiciclina sobre el tracto gastrointestinal se consideró necesario esperar un mes tras el cese de su consumo para llevar a cabo la inducción de la colitis aguda). Los

animales permanecieron estabulados en un animalario con barrera, con parámetros controlados (temperatura 24-25°C, humedad 70-75%, régimen de iluminación 12 horas de luz/12 horas de oscuridad) y fueron alimentados con una dieta normal de laboratorio (Panlab, Barcelona, España). Todos los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal del CIBIR (número asignado de procedimiento: CEEA-CIBIR 11/12).

Línea	Genotipo	Edad	n y sexo	Tratamiento
AM DOXI	rtTA-M2 ^{+/+}	16 semanas	8 machos	TNBS en etanol 50%
	Cre +		8 hembras	
	AM flox/flox			
AM DOXI	rtTA-M2 ^{+/+}	16 semanas	8 machos	NaCl en etanol 50%
	Cre +		8 hembras	
	AM flox/flox			
Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre	rtTA-M2 ^{+/+}	16 semanas	8 machos	TNBS en etanol 50%
	Cre +		8 hembras	
	AM flox/flox			
Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre	rtTA-M2 ^{+/+}	16 semanas	8 machos	NaCl en etanol 50%
	Cre +		8 hembras	
	AM wt/wt			

Tabla 7. Características de la muestra de animales empleada en el estudio del papel de la AM endógena en el desarrollo y severidad de un modelo de colitis aguda inducido por la instilación rectal de TNBS.

5.5.2. Inducción de la colitis aguda

La inducción de la colitis se realizó siguiendo el método de Kono *et al.* (209) con ligeras modificaciones de acuerdo al protocolo seguido por González-Rey *et al.* (188).

A los animales se les retiró el alimento a primera hora de la mañana y permanecieron en ayunas durante 6 horas antes de la inducción para lograr el vaciado del tracto gastrointestinal. Pasadas esas 6 horas, los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con Isoflurano (*IsoFlo®*, Esteve, Barcelona, España). Una vez anestesiados, se procedió a la instilación del TNBS (Sigma-Aldrich, número de referencia 92822-1ML) o del suero salino (*FisioVet®*, Braun, Barcelona, España), según el grupo al que pertenezcan los animales (Tabla 7), por vía rectal con un catéter médico de poliuretano de grado 3,5 F conectado a una jeringa de 0,3 mL sin aguja (Terumo Europe España S.L., Alcalá de Henares, España), insertando el catéter a una profundidad de 3 cm en machos y 2.5 cm en hembras desde el ano. Después de la instilación se mantuvo elevada la mitad inferior del cuerpo del animal durante 1 minuto para evitar la salida del producto introducido.

Cada ratón de los grupos tratados recibió una instilación de 3 mg de TNBS disueltos en etanol al 50% en agua destilada en un volumen total de 100 µL. Cada ratón de los grupos controles recibió una instilación del mismo volumen, 100 µL, de suero salino en etanol al 50% en agua destilada.

Los ratones se revisaron y pesaron diariamente para evaluar su estado de bienestar y la evolución de la colitis. Se administró suero *Lactato de Ringer* (Braun) por vía intraperitoneal y subcutánea a todos los animales con signos de deshidratación.

Todos los animales fueron sacrificados 5 días después de la instilación con TNBS o con NaCl y se procedió a la recogida de muestras necesaria para los estudios posteriores. Un esquema de toda la metodología realizada con los animales puede verse en la Figura 15.

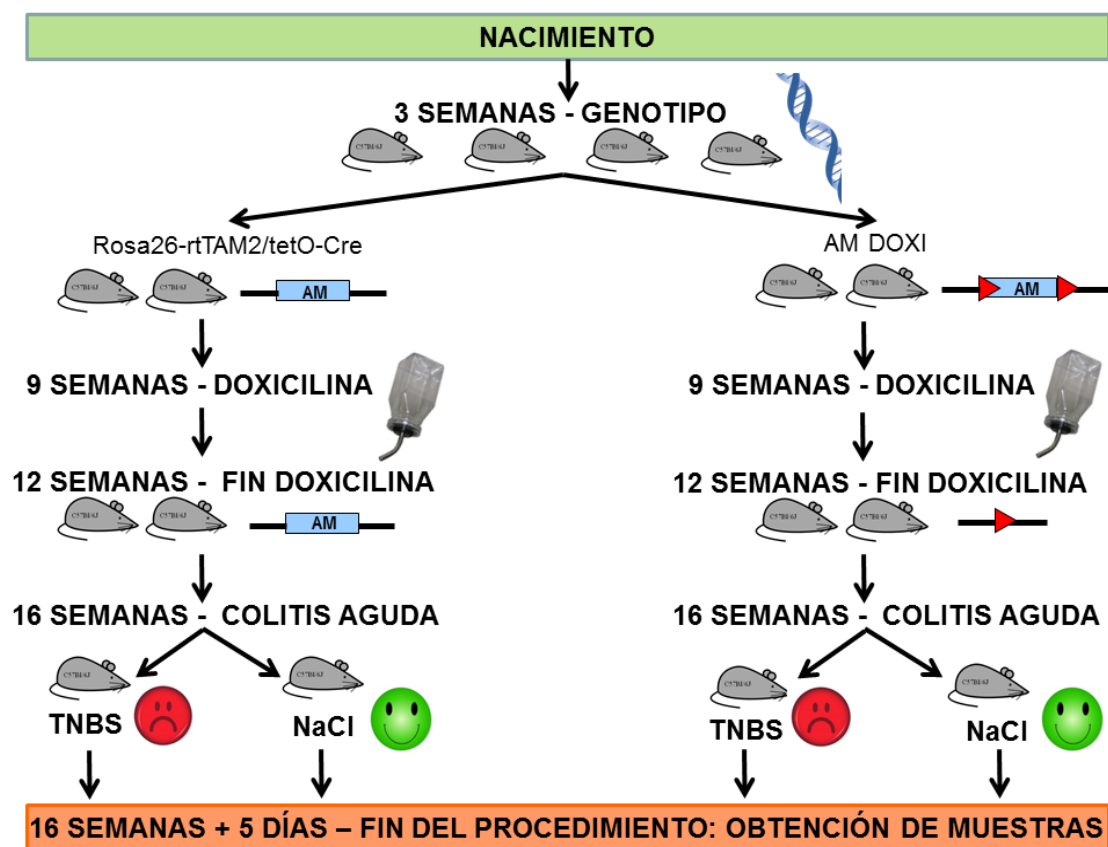


Figura 15. Esquema de todos los procedimientos realizados con cada animal de la muestra durante el experimento.

5.5.3. Evaluación de la severidad de la colitis aguda

Durante los 5 días siguientes a la instilación del TNBS o del NaCl se evaluó la evolución de los signos clínicos característicos de la colitis como son la pérdida de peso, la diarrea, la presencia de sangre en heces, los prolapsos rectales, la letargia... Al igual que se hace en la práctica clínica en humanos, se realizó una escala para cuantificar la severidad de la enfermedad basada en una serie de parámetros, usando

como referencia la propuesta por el grupo de Gommeaux *et al.* (210), y seguida por varios artículos consultados, con algunas modificaciones (Tabla 8). De este modo, cada ratón obtuvo distintas puntuaciones a lo largo de los 5 días, siendo mayor la puntuación cuanto más severo fuese el grado de patología.

Parámetro	Opciones	Severidad
Apariencia	Normal	0
	Piloerección, falta de acicalamiento	1
	Piloerección, postura arqueada, no acicalamiento	2
Comportamiento	Normal	0
	Poco activo y aislado pero alerta	1
	Inactivo- aislado, responde a estímulos externos	2
	Letárgico o inmóvil, no alerta	3
Peso corporal	Pérdida de peso ≤ 10%	0
	Pérdida de peso 10-20%	1
	Pérdida de peso >20%	2
Deshidratación (Test de turgor)	Normal	0
	Deshidratado (Test +)	1
Hemorragias	No hemorragia	0
	Ligera, puntos rojos en heces	1
Diarrea	Heces sólidas, bien formadas	0
	Heces blandas, no adheridas al ano	1
	Heces blandas, adheridas al ano	2
	Heces líquidas, zona perianal mojada	3
Prolapso rectal	No	0
	Ligero, no presencia de sangre	1
	Severo, presencia de sangre	2

Tabla 8. Índice para medir la severidad de la colitis aguda en ratones. Dentro de cada parámetro existen distintas opciones, de forma que a cada una le corresponde una puntuación. La suma final de las puntuaciones proporciona un valor en concordancia con el grado de severidad de la colitis.

5.5.4. Recogida de muestras

Después de sacrificar a los animales mediante una dosis letal de anestesia (con el mismo protocolo descrito anteriormente), se extrajo todo el colon, se inspeccionó visualmente y se recogieron los 5 cm terminales, se obtuvieron fotografías con una cámara digital *Canon EOS 50D* con un macro *EF-S 60mm* (Canon, Tokio, Japón), se limpiaron las heces contenidas en el tracto intestinal, se pesó la muestra en fresco, y se procedió a seccionar la muestra de forma que el centímetro central se recogió en cassettes de histología debidamente identificados y las dos secciones de los extremos

(de 2 cm cada una) se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso para realizar las determinaciones bioquímicas pertinentes. Cada sección fue congelada en un tubo de congelación independiente, quedando registrado si era la sección de colon más distal o más proximal.

Se extrajo todo el bazo, se limpió en PBS, se pesó, y se procedió a seccionar la muestra de forma que la zona central se recogió en cassettes de histología identificados y las dos secciones de los extremos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

5.5.5. Estudios histológicos

Para la evaluación histomorfométrica del engrosamiento de la mucosa y la submucosa intestinal como medida de inflamación se utilizaron muestras de tejido del colon distal de cada animal y se fijaron en formaldehído tamponado al 4% (Panreac, Barcelona, España) durante 24 horas, después se introdujeron al procesador de tejidos *MICROM STP 420D* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) donde se deshidrataron por concentraciones crecientes de etanol, y se embebieron en parafina. Se confeccionaron los bloques orientando el tejido de tal modo que los cortes se hiciesen de forma transversal al colon. Posteriormente, las secciones de tejido se cortaron a 3 micras con un microtomo *MICROM HM 355S* (Thermo Scientific), se montaron en portaobjetos de vidrio limpios y se secaron a 37°C .

Después se aclararon en xilol (VWR, Barcelona, España), se hidrataron, y se tiñeron con hematoxilina-eosina, de acuerdo con el protocolo estándar. Los portaobjetos fueron codificados para evitar el sesgo durante la evaluación histológica de la inflamación. Todas las secciones de tejido se examinaron y fotografiaron a una ampliación de 4x y 10x en un microscopio óptico *Nikon Eclipse 50i* con una cámara digital *DXM 1200C* acoplada (Nikon, Tokio, Japón). El software FIJI (211) se utilizó para la caracterización de los cambios histopatológicos, en concreto se midió la distancia, en micras, desde la punta del epitelio superficial hasta la capa muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*) para determinar el grosor de la mucosa; y la distancia, en micras, desde la base de la capa muscular de la mucosa hasta el comienzo de la capa muscular propia para determinar el grosor de la submucosa. Todas las mediciones se realizaron en zonas donde el corte de las vellosidades se observase de forma totalmente longitudinal, no se midieron zonas donde se hubiese roto o desprendido el tejido, o donde el corte fuese tangencial (Figura 16). De acuerdo con la escala de medida del microscopio a un aumento de 10x el programa, se realizó la siguiente conversión de medida con el programa Fiji de píxeles (px) a micras: 1 px corresponde a $0.31\ \mu\text{m}$.

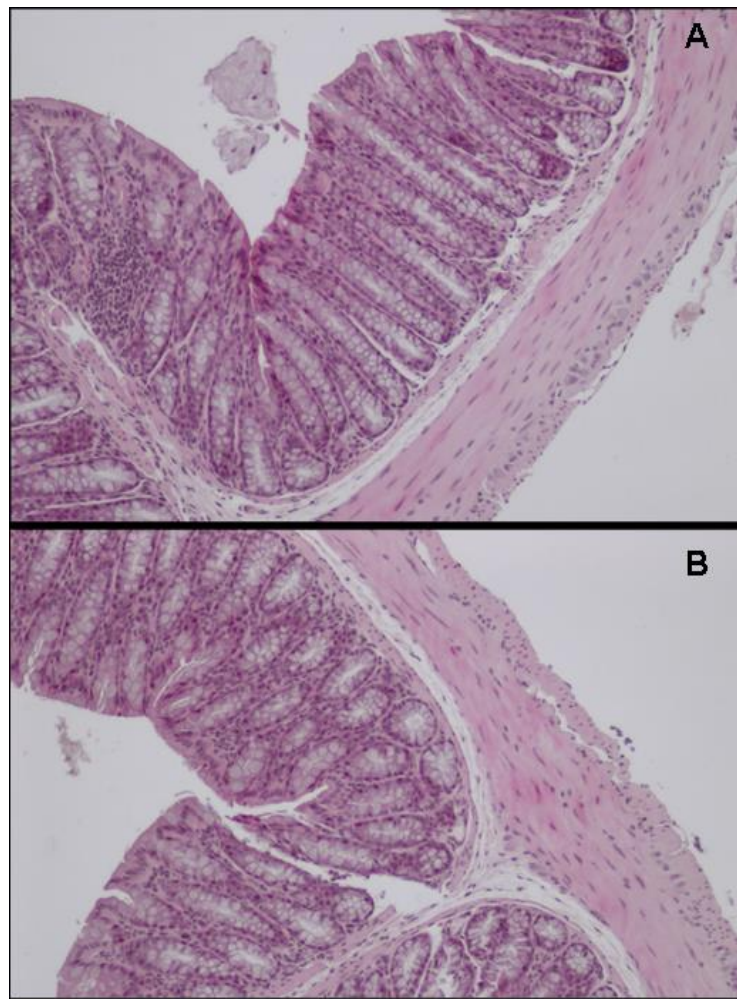


Figura 16. A) Imagen de una sección de colon teñido con hematoxilina-eosina (10x) donde se aprecia que el corte de las vellosidades es longitudinal y por tanto podrían tomarse mediciones histomorfológicas. B) Imagen de una sección de colon teñido con hematoxilina-eosina (10x) donde se aprecia que existe una ruptura en el tejido y donde, además, el corte de las vellosidades no es totalmente longitudinal, por lo que no podrían recogerse mediciones del grosor de la mucosa de la submucosa.

5.5.6. Evaluación de la infiltración leucocitaria

La evaluación de la infiltración leucocitaria en el tejido se realizó de forma indirecta a través de la medición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), la cual es un miembro de la superfamilia de las peroxidasa que usan como cofactor el grupo hemo y que es almacenada en los gránulos azurófilos de los leucocitos (212). La MPO puede detectarse dentro de los neutrófilos, monocitos y macrófagos que están en circulación.

La extracción de MPO en las muestras de colon se realizó siguiendo el método de Ito *et al.* (213) con ligeras modificaciones. Se descongeló el fragmento de colon más distal (de las 2 secciones de tejido que habían sido preservadas a -80°C), se lavó con PBS 1x enfriado a 4°C previamente, se pesó y se homogenizó en hielo en una

solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) (Sigma-Aldrich, referencia número H5885-100G) 0.5% en PBS 1x (se añadió a la muestra 1 mL de HETAB por cada 50 mg de tejido) con un homogenizador *Ultra Turrax T8* (IKA®-WERKE, Breisgau, Alemania). El homogenizado se sonicó en hielo durante 30 segundos con un *Soniprep 150* (MSE, Londres, Reino Unido) y después se centrifugó a 16 100 x g, 15 minutos a 4°C (*Centrifuge 5415R*, Eppendorf). El sobrenadante se alicuotó en viales limpios (100 µL/vial) y se almacenó a -80°C.

Para cuantificar la cantidad de proteína, se utilizó el sistema de determinación de proteínas *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual está basado en el método de Bradford (absorbancia a 595 nm en una solución ácida de azul de Coomassie G-250 cuando el colorante se une a proteína). El cálculo de la concentración de proteína se determinó por interpolación en una recta patrón, empleando diluciones de concentración conocida de proteína a partir de una solución patrón de 1 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA) proporcionada en el kit. La recta patrón se generó por duplicado preparando las diluciones seriadas 1:2 de las muestras de BSA en pocillos de fondo plano de una placa de 96 pocillos (*Falcon®*, VWR). En los pocillos de la recta patrón el volumen final fue de 225 µL, siendo 200 µL de la solución colorante y 25 µL de las muestras de BSA. Para determinar la cantidad de proteína presente en los extractos de las distintas muestras, se descongeló una de las alícuotas de cada muestra, y estas se midieron por duplicado en pocillos de la misma placa. En cada pocillo se pipetearon 2 µL de muestra, 23 µL de agua estéril y 200 µL de la solución colorante. La placa con las diluciones de la recta patrón y las distintas muestras se incubó en oscuridad a 37 °C durante 30 minutos, e inmediatamente después se pasó a un lector de placas (POLARstar Omega, Biogen, Madrid, España), donde se midió la absorbancia a 595 nm.

La actividad MPO se determinó usando el ensayo *Myeloperoxidase Peroxidation Fluorometric Assay Kit* (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo permite detectar la actividad peroxidada de la MPO, tanto en lisados celulares crudos como en extractos de proteína purificados, gracias a la reacción que se produce entre el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ADHP (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), la cual da como resultado un compuesto altamente fluorescente llamado resurfina (Figura 17). La fluorescencia emitida por la resurfina se puede analizar fácilmente excitando a 530-540 nm y midiendo la emisión a 585-595 nm. El kit incluye además un inhibidor específico de la MPO (4-aminobencen-hidrácido), que permite determinar la fluorescencia presente en las muestras que es independiente de la actividad de la MPO.

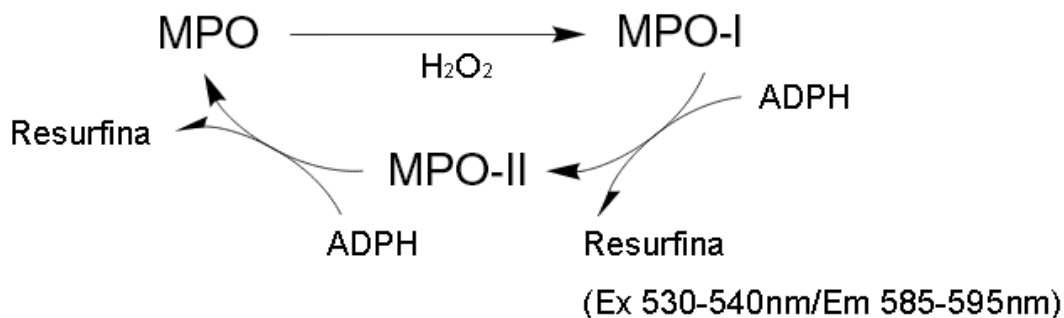


Figura 17. Esquema del ensayo fluorométrico para determinar la actividad MPO presente en los homogenizados de colon.

El cálculo de la actividad de MPO se determinó por interpolación en una recta patrón, empleando diluciones de concentración conocida de resurfina proporcionada en el kit. La recta patrón se generó por duplicado preparando las diluciones a partir de una solución 10 μM de resurfina en pocillos de 96 de fondo plano de una placa opaca proporcionada en el kit. En los pocillos de la recta patrón el volumen final fue de 110 μL , de los cuales 60 μL eran de búffer (PBS 1x) y 50 μL de las muestras de resurfina. Tras incubar la placa 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se pasó a un lector de placas (POLARstar Omega), donde se midió usando una excitación de 530-540 nm y captando la emisión entre 585-595 nm. Después en la misma placa se determinó la actividad de MPO de cada muestra (pocillos de muestra) y la fluorescencia no correspondiente a la actividad MPO (pocillos de inhibidor). En cada pocillo de muestra se pipetearon 50 μL de la muestra correspondiente, 10 μL del búffer de ensayo y 50 μL de la solución de trabajo (que contiene ADPH y H_2O_2). En cada pocillo de inhibidor se pipetearon 50 μL de la muestra correspondiente, 10 μL de la solución inhibidora y 50 μL de la solución de trabajo. Como control positivo se empleó una solución de MPO humana purificada. El control positivo se realizó por duplicado y en cada pocillo se pipetearon 50 μL de MPO purificada (250 ng/mL), 10 μL del búffer de ensayo y 50 μL de la solución de trabajo. La placa quedó configurada como se muestra en la Figura 18. Inmediatamente después de añadir la solución de trabajo a los pocillos correspondientes se pasó la placa al lector de placas, donde se midió la fluorescencia cada 30 segundos durante media hora usando los mismos parámetros arriba indicados. Los resultados se cuantificaron como pmol/min/mL, normalizados en función de la concentración total de proteínas presentes en la muestra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(A)	(A)	(+)	(+)	()	()	()	()	()	()	()	()
B	(B)	(B)	(M1)	(I1)	()	()	()	()	()	()	()	()
C	(C)	(C)	(M2)	(I2)	()	()	()	()	()	()	()	()
D	(D)	(D)	(M3)	(I3)	()	()	()	()	()	()	()	()
E	(E)	(E)	(M4)	(I4)	()	()	()	()	()	()	()	()
F	(F)	(F)	(M5)	(I5)	()	()	()	()	()	()	()	()
G	(G)	(G)	(M6)	(I6)	()	()	()	()	()	()	()	()
H	(H)	(H)	(M7)	(I7)	()	()	()	()	()	()	()	()

A-H: Pocillos estándar con resurfina

+: Pocillos control positivo (MPO purificada)

M: Pocillos de muestras

I: Pocillos de muestras + inhibidor

Figura 18. Esquema de configuración de la placa para determinar la actividad de MPO en los homogenizados de colon. Las dos primeras columnas se reservaron para la realización de la curva patrón por duplicado con concentraciones conocidas de resurfina (Pocillos A-H). El control positivo de MPO humana purificada también se realizó por duplicado (Pocillos +). Cada muestra fue sometida a dos reacciones, una para determinar la actividad de MPO presente en el tejido (Pocillos M), y otra para determinar el nivel de fluorescencia presente en la muestra independiente de la actividad de MPO (Pocillos I).

5.5.7. Análisis estadísticos

Para el estudio de las características de la distribución de las variables se ha recurrido al programa *Graph Pad Prism v5*.

Todos los datos se sometieron al test de Levene para determinar la homocedasticidad y al test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la población.

Si ambos tests eran positivos ($p > 0.05$), las diferencias estadísticas entre las medias de las puntuaciones del índice de severidad y la evolución del peso durante los 5 días de procedimiento se evaluaron mediante el análisis de ANOVA de dos vías, y en caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las medias de

los grupos se realizaron comparaciones múltiples con el test de Bonferroni. Para el resto de parámetros analizados, si se cumplían los requisitos de normalidad y homoscedasticidad se compararon las medias de los grupos con el test de ANOVA de una vía, seguido de comparaciones múltiples con el test de Neuman-Keuls si se encontraban diferencias estadísticamente significativas. En caso de que la variable analizada siguiese una distribución no paramétrica, o no se cumpliera el criterio de homogeneidad de varianzas, se recurrió al test de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunn para realizar las comparaciones múltiples posteriores si existían diferencias significativas en el comportamiento de la variable entre los grupos estudiados.

Todos los valores de las figuras y el texto se expresan como media aritmética (\bar{x}) \pm el error estándar de la media (SEM) si la variable sigue una distribución normal; y como mediana (Me) \pm la amplitud intercuartílica (AIC) si la variable sigue una distribución no paramétrica.

En todos los casos se consideró que valores de p menores de 0.05 eran estadísticamente significativos.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. GENERACIÓN Y GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS

La puesta a punto de técnicas diagnósticas para conocer el genotipo de los ratones fue fundamental para el resto del estudio. A continuación se muestran ejemplos representativos de geles de agarosa teñidos con *Gel Red*® (Biotium 1:10000) donde se separaron por electroforesis los productos de la reacción de amplificación del ADN genómico de las dos principales líneas transgénicas empleadas en este estudio.

Recordemos que para la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre se realizaron dos reacciones de PCR diferentes. Una para detectar la presencia del rtTA-M2 en el alelo Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} y otra para detectar la presencia o ausencia del gen de la Cre recombinasa.

El ADN de los animales con los dos alelos Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor} normales (rtTA-M2^{-/-}) genera una única banda de 650 pb. Los animales heterocigotos con un alelo normal y otro mutado (rtTA-M2^{+/-}) generan dos bandas, la banda WT a 650 pb y la banda mutante a 340 pb. Y la amplificación del ADN genómico de los animales homocigotos para la mutación (rtTA-M2^{+/+}) genera una única banda a 340 pb (Figura 19).

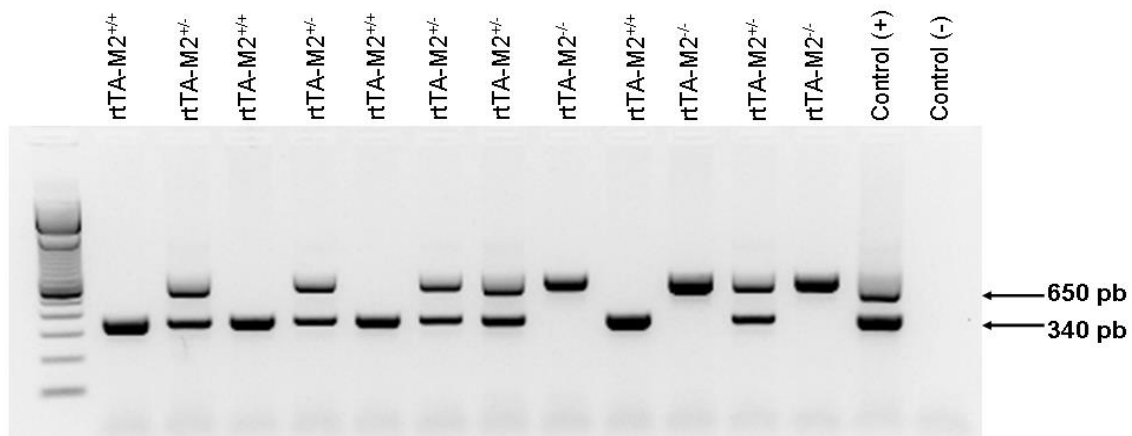


Figura 19. Amplificación de los fragmentos correspondientes a los dos posibles alelos Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}, WT o mutante, según la ausencia o presencia del rtTA-M2 en el alelo.

En el caso de que el gen de la Cre recombinasa se encuentre presente en alguno de los alelos o en los dos (Cre+), se genera mediante amplificación una banda de 625 pb. Si el gen no está presente en ninguno de los alelos (Cre-) no se produce ninguna amplificación genómica. Como control interno de esta PCR se añadieron

además los cebadores específicos para un fragmento del gen de la IL-2, que está siempre presente en el ADN genómico (gen *housekeeping*), y cuya amplificación genera una banda de 325 pb. De este modo, en el resultado de los animales WT para Cre, si la reacción de amplificación ha ocurrido correctamente, solo se observa la banda de 325 pb de la IL-2. Y en los animales Cre+ podemos observar dos bandas, la banda de 625 pb de Cre y la banda de 325 pb de la IL-2 (Figura 20).

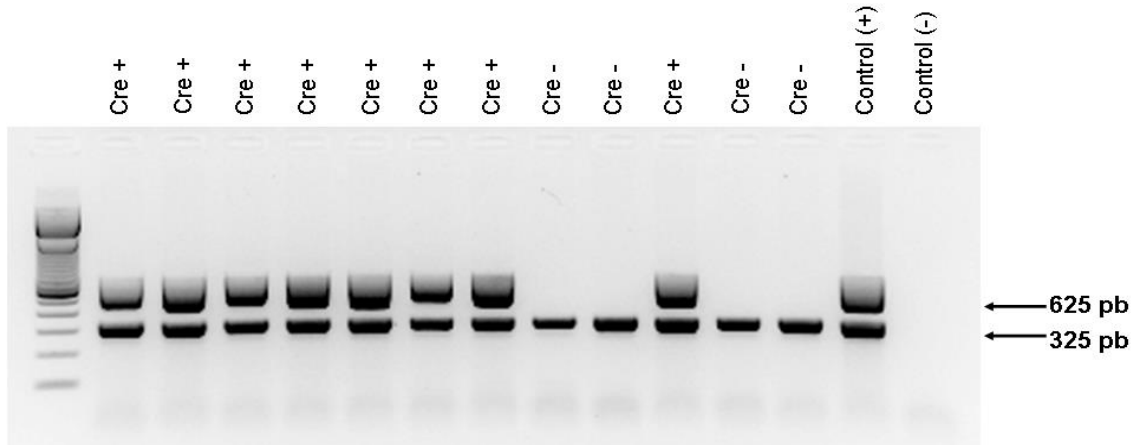


Figura 20. Amplificación de los fragmentos correspondientes al gen de Cre (625 pb) y de la IL-2 (325 pb).

Para la línea AM DOXI, además de las dos reacciones de amplificación anteriores, se realizó una tercera PCR para detectar la presencia de las secuencias *loxP* flanqueando al gen de la AM. El ADN de los animales con los dos alelos de la AM sin floxear (AM wt/wt) genera una única banda de aproximadamente 625 pb. El ADN genómico de los animales heterocigotos donde un alelo está floxeadado y el otro no (AM flox/wt) se generan mediante amplificación dos bandas, una de aproximadamente 625 pb y otra de unos 650 pb. Y la amplificación del ADN de los ratones con ambos alelos floxeadados (AM flox/flox) genera una única banda de aproximadamente 650 pb (Figura 21).

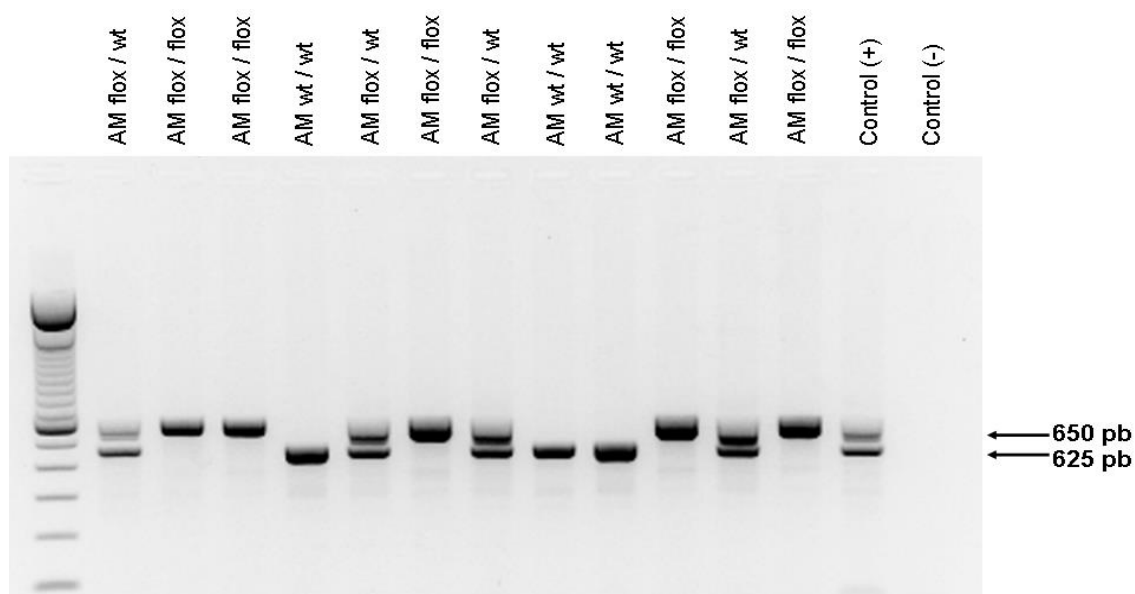


Figura 21. Amplificación de los fragmentos correspondientes a los dos posibles alelos del gen de la AM, según se encuentre o no floxeado.

6.2. ESTUDIO PILOTO: GENERACIÓN DE LOS RATONES KO

Dado que uno de los objetivos de este estudio era lograr un modelo KO total para el gen de la AM y existen ciertos tejidos en los que la barrera hemática podía dificultar el paso del compuesto inductor hasta las células, decidimos realizar un estudio piloto, con 15 animales de la línea AM DOXI, comparando distintas pautas de administración de doxiciclina (7 y 14 días) para comprobar la eficacia de la delección del gen de la AM tras la acción de la recombinasa Cre, y para confirmar que en los animales a los que no se les había administrado la solución de doxiciclina el gen permanecía intacto.

Se analizó el ADN genómico de 13 órganos distintos mediante PCR usando una polimerasa específica para la amplificación de secuencias de gran tamaño. Los resultados esperados eran que en los animales que no habían tomado doxiciclina el gen de la AM permaneciese intacto y en la amplificación se generase una única banda, de un tamaño aproximado de 2500 pb ($AM^{+/+}$); mientras que en los animales que sí habían tomado doxiciclina se produjese una delección total del gen de la AM ($AM^{-/-}$), generando una única banda de unos 600 pb, o una delección parcial ($AM^{+/-}$), generando dos bandas de 2500 y 600 pb.

Sin embargo, tras analizar los resultados se comprobó que en los animales que no habían tomado la doxiciclina se estaba produciendo una delección parcial espontánea del gen de la AM en prácticamente todos los tejidos corporales analizados. Por ello, decidimos incluir ratones de la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre, cuyo gen de la AM no está floxeado y por tanto no puede sufrir recombinación,

tratados con doxiciclina el tiempo máximo para comprobar que el gen permanecía intacto y podrían ser incluidos en un futuro como controles de la línea AM DOXI.

A continuación se muestran dos ejemplos representativos de geles de agarosa donde se separaron por electroforesis los productos de la reacción de amplificación del ADN genómico de colon (por ser el órgano diana del futuro experimento de colitis aguda) (Figura 22) y de cerebro (por ser el órgano de mayor dificultad de difusión de sustancias químicas debido a la presencia de la barrera hematoencefálica) (Figura 23).

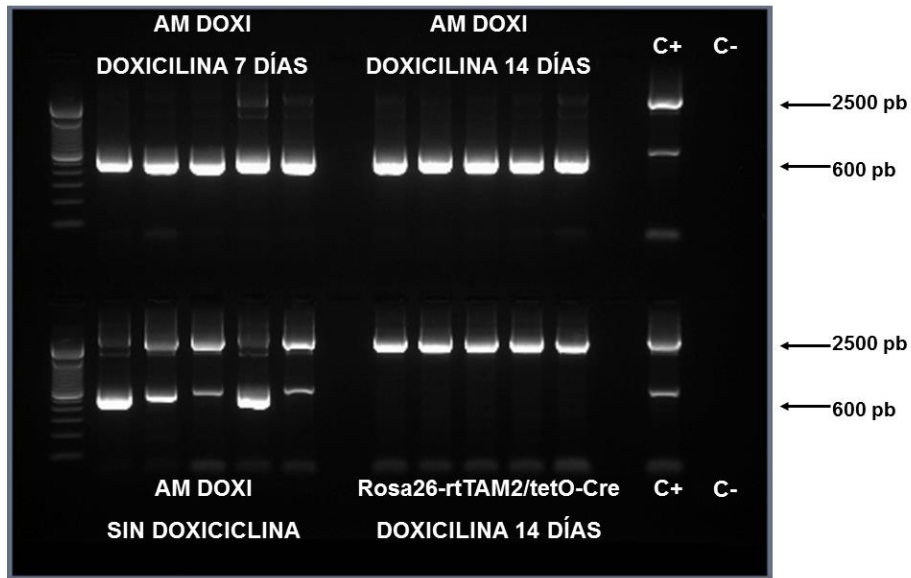


Figura 22. Amplificación del gen de la AM a partir de muestras de ADN genómico extraídas de colon. Como se aprecia en la figura, en todos los animales de la línea AM DOXI que tomaron doxiciclina se produjo la delección total del gen de la AM ($AM^{-/-}$) y solo se observa la banda de 600 pb. En todos los animales de la línea AM DOXI que no tomaron doxiciclina se produjo la delección parcial del gen ($AM^{+/-}$) y se observan dos bandas. Y en los animales de la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre, aunque tomaron la doxiciclina durante 14 días, el gen de la AM permaneció intacto ($AM^{+/+}$) y solo se observa la banda de 2500 pb.

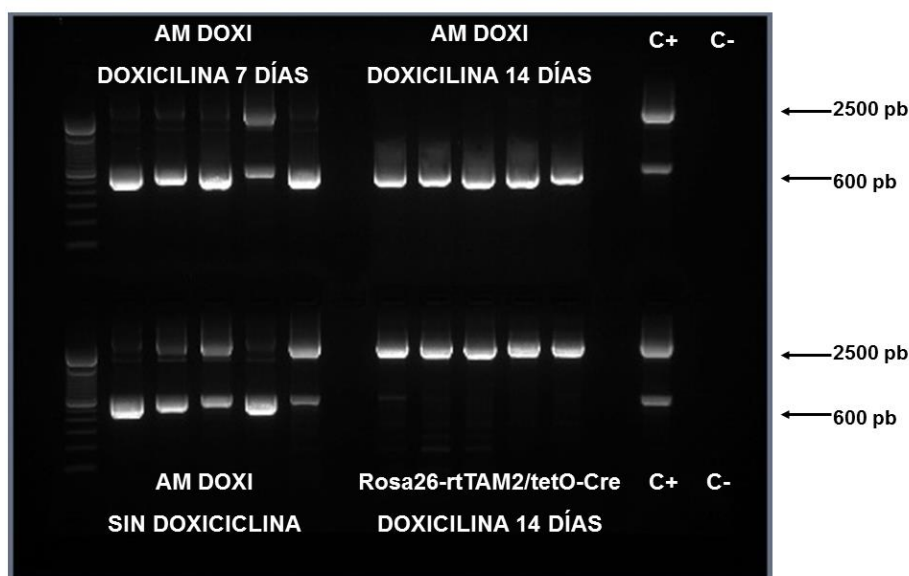


Figura 23. Amplificación del gen de la AM a partir de muestras de ADN genómico extraídas de cerebro. Como se aprecia en la figura, la administración de doxiciclina durante 7 días no es suficiente para lograr la delección total del gen de la AM en todos los individuos; mientras que en todos los animales de la línea AM DOXI que tomaron doxiciclina durante 14 días sí se produjo la delección total ($AM^{-/-}$) y solo se observa la banda de 600 pb. En todos los animales de la línea AM DOXI que no tomaron doxiciclina se produjo la delección parcial del gen ($AM^{+/}$) en 3 animales y una delección total del gen en dos de ellos. Y en los animales de la línea Rosa26-rtTAM2/tetO-Cre, aunque tomaron la doxiciclina durante 14 días, el gen de la AM permaneció intacto ($AM^{+/+}$) y solo se observa la banda de 2500 pb.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que, para lograr la delección total de gen de la AM en todo el organismo, era necesario mantener la administración de la solución de doxiciclina durante 14 días.

6.3. INDUCCIÓN DE LA COLITIS AGUDA

6.3.1. Evaluación de la severidad de la colitis aguda

Del total de la muestra de estudio (64 animales), tres de ellos fallecieron en las 24 horas posteriores al procedimiento de inducción de colitis aguda: una hembra WT del grupo control (NaCl), una hembra WT del grupo de tratamiento con TNBS y un macho KO del grupo control, probablemente a consecuencia de una reacción adversa a la anestesia o al propio procedimiento. Por lo tanto, en esos tres grupos el tamaño muestral pasó a ser de 7 animales, en vez de los 8 iniciales.

En el caso de los machos, la instilación rectal de NaCl disuelto en etanol al 50% no ocasionó ningún signo clínico destacable a los animales de ambos genotipos, salvo una ligera pérdida de peso (inferior al 10% del peso corporal) en las primeras 24-48 horas tras la instilación (Tabla 9 y Figura 24). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones del índice de severidad de los

machos WT y los machos KO que recibieron NaCl ($p>0,05$). La instilación rectal de TNBS provocó el desarrollo de una colitis que, de acuerdo con las puntuaciones del índice de severidad de la enfermedad (Tabla 8), podría clasificarse de leve a moderada; siendo más pronunciada en los machos KO (Tabla 9 y Figura 24). En el grupo de machos WT, solo se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con TNBS y el grupo control a día 5 de procedimiento ($1 \pm 0,33$ vs. 0 ; $p<0,05$). Sin embargo, en el grupo de machos KO se observaron diferencias estadísticamente significativas en las puntuaciones del índice de severidad entre el grupo tratado con TNBS y el grupo control a día 1 ($1,87 \pm 0,35$ vs. $0,71 \pm 0,8$; $p<0,01$), a día 2 ($1,5 \pm 0,42$ vs. $0,14 \pm 0,14$; $p<0,001$), a día 3 ($1,63 \pm 0,56$ vs. 0 ; $p<0,001$), a día 4 ($1,63 \pm 0,38$ vs. 0 ; $p<0,001$), y a día 5 ($1,88 \pm 0,35$ vs. 0 ; $p<0,001$). La colitis dio paso a la aparición de diarrea en forma de heces blandas en el grupo de machos WT hacia el tercer día del procedimiento, la cual se mantuvo hasta el quinto día. Por el contrario, en el grupo de machos KO la presencia de heces blandas se detectó desde el primer día y fue evolucionando con el paso del tiempo a heces líquidas hacia el tercer día en el 62,5% de la muestra, dos de los animales (25% de la muestra) mostraron signos de deshidratación, y con el quinto día se detectó la presencia de sangre en heces en esos mismos 2 animales. Al comparar las puntuaciones medias del índice de severidad entre los dos grupos de machos tratados con TNBS se observó que los machos KO obtuvieron puntuaciones significativamente más altas que los machos WT a día 1 ($1,87 \pm 0,35$ vs. $0,38 \pm 0,18$; $p<0,001$) y 2 de procedimiento ($1,5 \pm 0,42$ vs. $0,38 \pm 0,18$; $p<0,01$); sin embargo entre los días 3 y 5 no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

En el grupo de las hembras, al igual que en el grupo de machos, la instilación de NaCl en los grupos WT y KO no produjo ningún efecto significativo (Tabla 9 y Figura 25). De nuevo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones del índice de severidad de las hembras WT y las hembras KO que recibieron NaCl a ningún tiempo ($p>0,05$). La instilación de TNBS causó unos resultados similares a los anteriormente descritos, pero con diferencias mucho más marcadas entre los índices de severidad de la colitis de las hembras WT tratadas con TNBS y los de las hembras KO tratadas con TNBS (Tabla 9 y Figura 25). Las hembras WT a las que se les instiló TNBS desarrollaron algunos signos propios de una colitis leve, en la que empezaron a realizar deposiciones blandas al tercer día, en dos de ellas (28,57% de la muestra) la colitis evolucionó el quinto día a deposiciones semi-líquidas que permanecían adheridas a la zona perianal, y solo una de estas dos hembras requirió la administración de suero por mostrar signos de deshidratación (14,29% de la muestra). Sin embargo, al comparar las puntuaciones medias de las

hembras WT tratadas con TNBS y las hembras WT control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a ningún tiempo ($p > 0,05$), si bien, el quinto día las diferencias estuvieron próximas a alcanzar la significación ($1,29 \pm 0,18$ vs. 0 ; $p = 0,06$). Las hembras KO que recibieron el tratamiento con TNBS desarrollaron una colitis que podría clasificarse de moderada a severa, con las mayores puntuaciones de todos los grupos (machos y hembras). A día uno de procedimiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las puntuaciones medias del índice de severidad del grupo tratado con TNBS y del grupo control ($1,88 \pm 0,23$ vs. $0,63 \pm 0,18$; $p > 0,05$); sin embargo, a partir de ese momento se observaron diferencias estadísticamente muy significativas entre ambos grupos a día 2 ($2,25 \pm 0,37$ vs. $0,25 \pm 0,16$; $p < 0,001$), a día 3 ($3,25 \pm 0,75$ vs. 0 ; $p < 0,001$), a día 4 ($3,13 \pm 0,67$ vs. 0 ; $p < 0,001$), y a día 5 ($3,88 \pm 0,97$ vs. 0 ; $p < 0,001$). En el grupo de hembras KO tratadas con TNBS desde el primer día se observó la presencia de heces blandas, que para el tercer día habían evolucionado a heces totalmente líquidas. El 75% del grupo mostraba signos de deshidratación a ese tiempo; y para el quinto día de procedimiento se observó sangre en las heces del 50% de las hembras KO y en dos de ellas (25% de la muestra) se empezó a formar un prolapso rectal. Al comparar las puntuaciones medias del índice de severidad entre los dos grupos de hembras tratadas con TNBS se observó que las hembras KO obtuvieron puntuaciones significativamente más altas que las hembras WT a día 1 ($1,88 \pm 0,23$ vs. $0,14 \pm 0,38$; $p < 0,01$), a día 2 ($2,25 \pm 0,37$ vs. $0,14 \pm 0,14$; $p < 0,001$), a día 3 ($3,25 \pm 0,75$ vs. $0,48 \pm 0,20$; $p < 0,001$), a día 4 ($3,13 \pm 0,67$ vs. $1,00 \pm 0$; $p < 0,001$) y a día 5 de procedimiento ($3,88 \pm 0,97$ vs. $1,29 \pm 0,18$; $p < 0,001$).

Grupo	n	Índice de severidad de la colitis aguda				
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
♂ WT NaCl	8	$0,63 \pm 0,18$	$0,25 \pm 0,16$	0	0	0
♂ WT TNBS	8	$0,38 \pm 0,18$	$0,38 \pm 0,18$	$0,75 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,23$	$1 \pm 0,33$
♂ KO NaCl	7	$0,71 \pm 0,8$	$0,14 \pm 0,14$	0	0	0
♂ KO TNBS	8	$1,87 \pm 0,35$	$1,5 \pm 0,42$	$1,63 \pm 0,56$	$1,63 \pm 0,38$	$1,88 \pm 0,35$
♀ WT NaCl	7	$0,29 \pm 0,18$	$0,14 \pm 0,14$	0	0	0
♀ WT TNBS	7	$0,14 \pm 0,38$	$0,14 \pm 0,14$	$0,48 \pm 0,20$	1 ± 0	$1,29 \pm 0,18$
♀ KO NaCl	8	$0,63 \pm 0,18$	$0,25 \pm 0,16$	0	0	0
♀ KO TNBS	8	$1,88 \pm 0,23$	$2,25 \pm 0,37$	$3,25 \pm 0,75$	$3,13 \pm 0,67$	$3,88 \pm 0,97$

Tabla 9. Puntuaciones medias del índice de severidad de la colitis aguda en los distintos grupos a lo largo de los 5 días de duración del procedimiento. Los valores de las puntuaciones se expresan como la media de la puntuación obtenida por todos los animales del grupo \pm SEM.

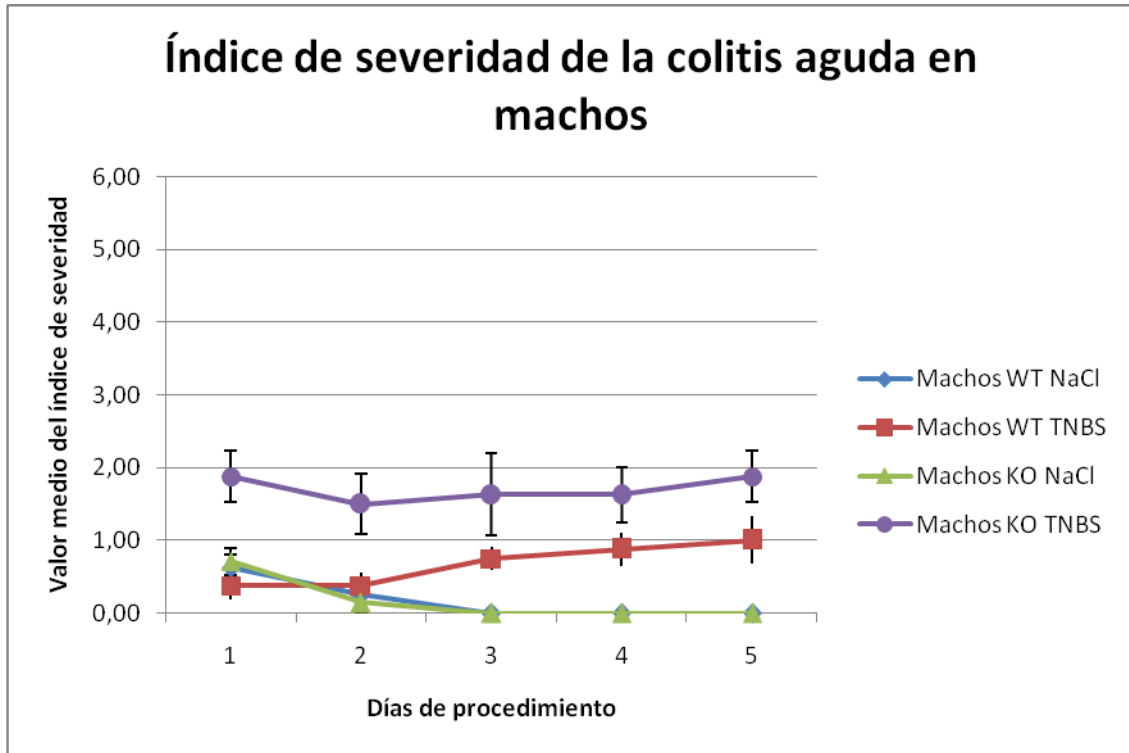


Figura 24. Evolución de las puntuaciones medias del índice de severidad en los cuatro grupos de machos incluidos en el procedimiento.

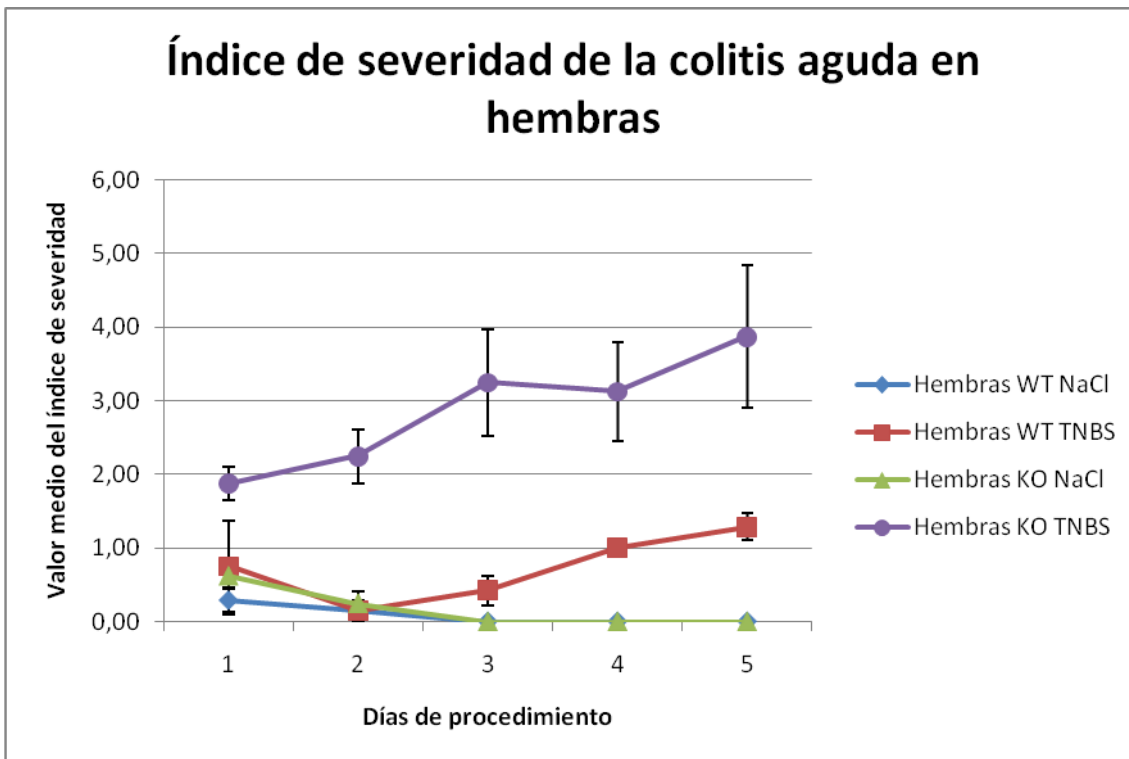


Figura 25. Evolución de las puntuaciones medias del índice de severidad en los cuatro grupos de hembras incluidos en el procedimiento.

Uno de los principales signos clínicos que permiten la evaluación del bienestar animal y el grado de severidad de la colitis, tanto en animales como en humanos, es el peso corporal. Por ello, los animales se pesaron antes de la instilación rectal y diariamente durante los 5 días de procedimiento. Como se observa en la Tabla 10 y en las Figuras 26 y 27, tanto en machos como en hembras, la instilación de NaCl en etanol al 50% no provocó la disminución del peso corporal de los animales.

Es interesante observar que en el grupo de machos, en condiciones basales, los animales KO tienen un peso significativamente superior al de los animales WT a pesar de tener la misma edad, tanto en los grupos control (29,60 g \pm 0,73 g vs. 25,28 g \pm 0,53 g; $p < 0,001$) como en los grupos tratados con TNBS (28,07 g \pm 0,57 g vs. 24,37 g \pm 0,55 g; $p < 0,01$) (Tabla 10 y Figura 26). En el caso de los grupos control, los pesos se mantuvieron estables a lo largo del procedimiento, y por tanto, los machos KO continuaron teniendo un peso medio significativamente superior que el de los machos WT ($p < 0,001$ durante los 5 días) (Tabla 10 y Figura 26). La instilación de TNBS por vía rectal en los machos WT ocasionó una ligera disminución de peso que en ningún día llegó a ser significativa respecto a los animales WT que habían recibido NaCl ($p > 0,05$) (Tabla 10 y Figura 26). En los ratones KO, el TNBS produjo una mayor pérdida de peso durante las primeras 48 horas de procedimiento, sin embargo, a partir del tercer día se iniciaba una recuperación en los valores del peso medio del grupo, que para el final del procedimiento habían incluso superado a la media del peso inicial. Al comparar los pesos medios de los ratones KO tratados y controles solo se observaron diferencias estadísticamente significativas a día 1 (26,16 g \pm 0,64 g vs. 29,67 g \pm 0,78 g; $p < 0,01$) (Tabla 10 y Figura 26). Al comparar los pesos medios de los dos grupos de machos tratados con TNBS se observó que aunque el peso basal de los machos KO era significativamente superior al de los machos WT ($p < 0,01$), la inducción de la colitis provocó una reducción del peso en los animales KO hasta que se igualó con el peso medio de los ratones WT en los días 1 (26,16 g \pm 0,64 g vs. 24,88 g \pm 0,55 g; $p > 0,05$) y 2 de procedimiento (27,30 g \pm 0,98 g vs. 25,19 g \pm 0,46 g; $p > 0,05$), para volver a ser significativamente superior en los días 3 (28,38 g \pm 1,09 g vs. 24,34 g \pm 0,47 g; $p < 0,05$), 4 (29,77 g \pm 1,08 g vs. 25,85 g \pm 0,58 g; $p < 0,01$) y 5 (30,57 g \pm 1,16 g vs. 26,11 g \pm 0,56 g; $p < 0,001$); a medida que se iniciaba su recuperación.

En el grupo de hembras, en el caso de los dos grupos control, no se observaron diferencias significativas en el peso de las hembras KO y WT a causa del procedimiento, solo a partir del día 4 las hembras KO muestran un peso medio significativamente superior al de las hembras WT, probablemente debido a un crecimiento más rápido (día 4: 23,74 g \pm 0,66 g vs. 21,08 g \pm 0,44 g; $p < 0,05$. Día 5: 24,13 g \pm 0,70 g vs. 21,19 g \pm 0,48 g; $p < 0,05$) (Tabla 10 y Figura 27). La instilación de

TNBS en las hembras WT no causó ninguna variación significativa del peso respecto a los controles WT en ningún momento del procedimiento ($p > 0.05$) (Tabla 10 y Figura 27). Sin embargo, la instilación de TNBS en las hembras KO sí produjo una reducción muy significativa de su peso medio en comparación con sus controles, las hembras KO que recibieron NaCl, durante los 3 primeros días posteriores a la instilación (Día 1: $19,37 \text{ g} \pm 0,66 \text{ g}$ vs. $22,87 \text{ g} \pm 0,65 \text{ g}$; $p < 0,01$. Día 2: $19,26 \text{ g} \pm 0,89 \text{ g}$ vs. $22,85 \text{ g} \pm 0,55 \text{ g}$; $p < 0,001$. Día 3: $19,80 \text{ g} \pm 1,16 \text{ g}$ vs. $22,44 \text{ g} \pm 0,67 \text{ g}$; $p < 0,001$), y que continuó siendo significativa hasta el final del procedimiento a pesar de una leve recuperación del peso gracias a la rehidratación lograda al administrar suero a los animales (Día 4: $21,13 \text{ g} \pm 1,13 \text{ g}$ vs. $23,74 \text{ g} \pm 0,66 \text{ g}$; $p < 0.05$. Día 5: $21,44 \text{ g} \pm 0,99 \text{ g}$ vs. $24,13 \text{ g} \pm 0,70 \text{ g}$; $p < 0.05$) (Tabla 10 y Figura 27). A diferencia de los machos KO tratados con TNBS, las hembras KO no lograron recuperar su peso basal durante los 5 días del procedimiento. Al comparar los pesos medios de los dos grupos de hembras tratadas con TNBS se observó que el peso medio de las hembras KO no era estadísticamente diferente del de las hembras WT, a excepción del día 2, momento en el que el peso medio de las hembras KO fue significativamente inferior al de las hembras WT ($19,26 \text{ g} \pm 0,89 \text{ g}$ vs. $21,85 \text{ g} \pm 0,50 \text{ g}$; $p < 0,05$).

Grupo	n	Peso medio (g)					
		Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
♂ WT NaCl	8	$25,28 \pm 0,53$	$25,92 \pm 0,58$	$25,88 \pm 0,57$	$25,78 \pm 0,59$	$26,26 \pm 0,51$	$26,07 \pm 0,52$
♂ WT TNBS	8	$24,37 \pm 0,55$	$24,88 \pm 0,55$	$25,19 \pm 0,46$	$25,34 \pm 0,47$	$25,85 \pm 0,58$	$26,11 \pm 0,56$
♂ KO NaCl	7	$29,60 \pm 0,73$	$29,67 \pm 0,78$	$29,85 \pm 0,72$	$30,15 \pm 0,63$	$30,45 \pm 0,66$	$30,62 \pm 0,86$
♂ KO TNBS	8	$28,07 \pm 0,57$	$26,16 \pm 0,64$	$27,30 \pm 0,98$	$28,38 \pm 1,09$	$29,77 \pm 1,08$	$30,57 \pm 1,16$
♀ WT NaCl	7	$20,71 \pm 0,32$	$21,55 \pm 0,27$	$21,59 \pm 0,26$	$21,07 \pm 0,31$	$21,08 \pm 0,44$	$21,19 \pm 0,48$
♀ WT TNBS	7	$21,62 \pm 0,48$	$21,51 \pm 0,41$	$21,85 \pm 0,50$	$21,75 \pm 0,48$	$21,89 \pm 0,51$	$22,30 \pm 0,50$
♀ KO NaCl	8	$22,55 \pm 0,66$	$22,87 \pm 0,65$	$22,85 \pm 0,55$	$22,44 \pm 0,67$	$23,74 \pm 0,66$	$24,13 \pm 0,70$
♀ KO TNBS	8	$22,01 \pm 0,57$	$19,37 \pm 0,66$	$19,26 \pm 0,89$	$19,80 \pm 1,16$	$21,13 \pm 1,13$	$21,44 \pm 0,99$

Tabla 10. Pesos medios en gramos de los distintos grupos antes de iniciar el procedimiento (Día 0) y a lo largo de los 5 días de duración del experimento. Los valores se expresan como la media del peso obtenido por todos los animales del grupo \pm SEM.

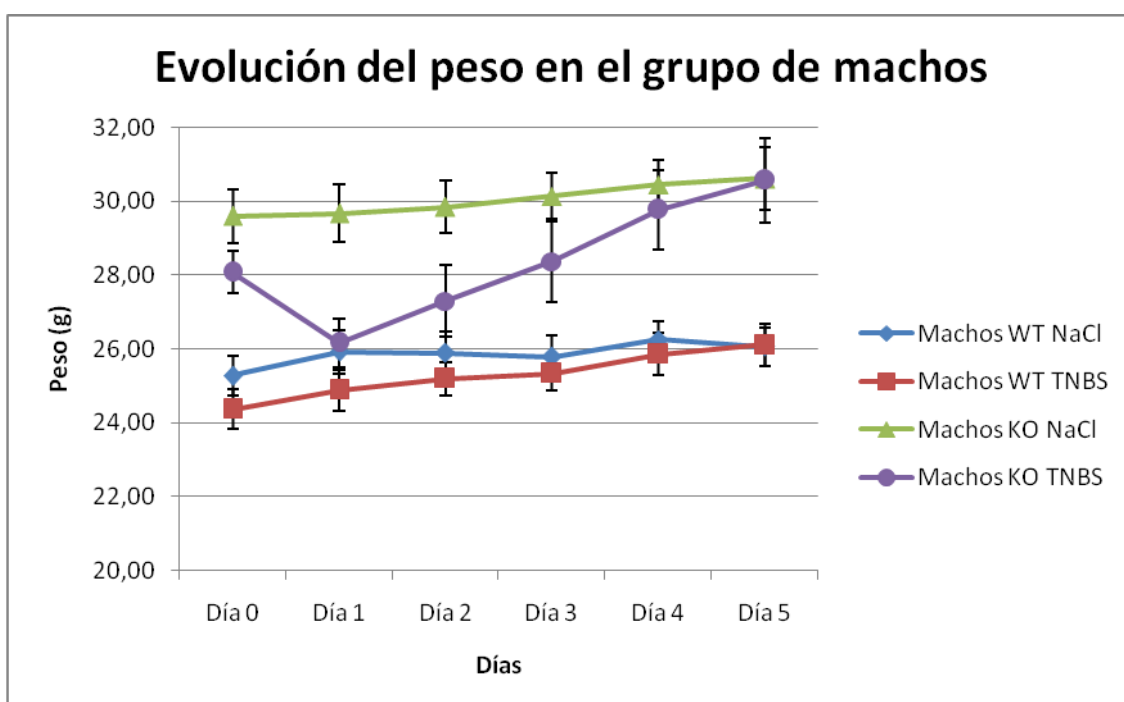


Figura 26. Evolución de los pesos medios de los cuatro grupos de machos incluidos en el procedimiento, desde el momento previo a la instilación hasta el final del experimento.

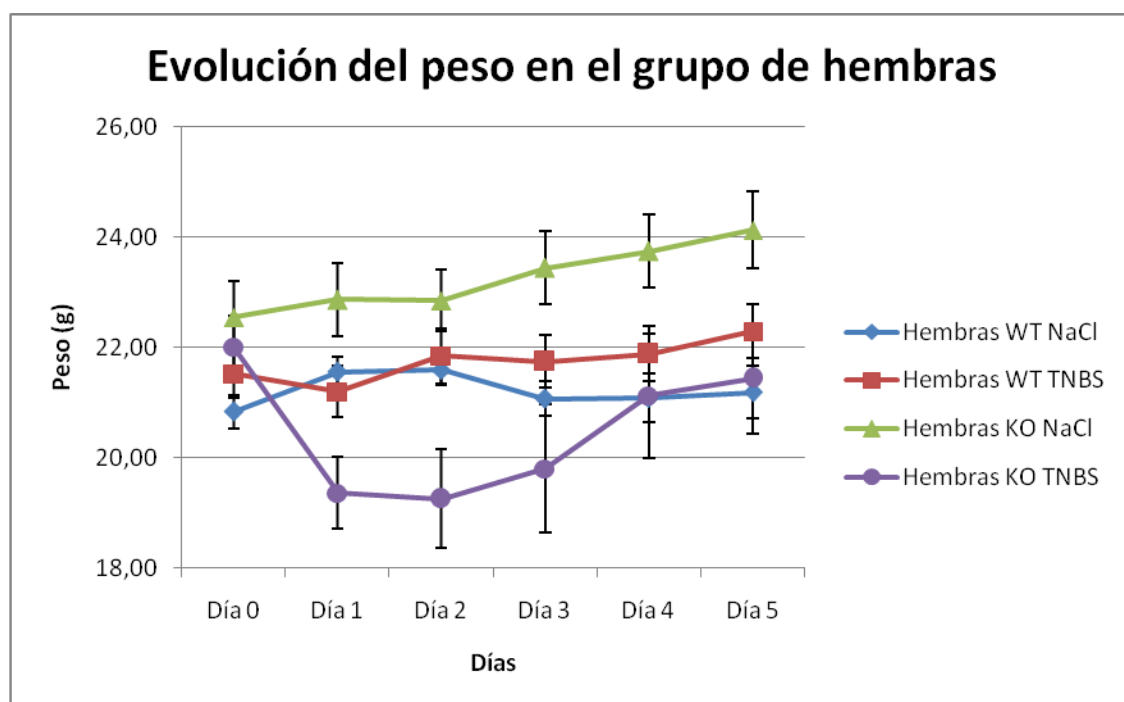


Figura 27. Evolución de los pesos medios de los cuatro grupos de hembras incluidas en el procedimiento, desde el momento previo a la instilación hasta el final del experimento.

Tras sacrificar a los animales se extrajo todo el colon y se recogieron los 5 cm terminales desde el ano, por ser la parte más dañada al haber instilado el TNBS en

esa zona. La inspección visual reveló que tanto en machos (Figura 28.A y 28.C) como en hembras (Figura 29.A y 29.C), la instilación de NaCl no había causado alteraciones macroscópicas, no se apreciaban lesiones y las heces contenidas en el tracto gastrointestinal presentaban la forma oval y la consistencia características. En los machos y hembras WT tratados con TNBS se observó que las heces eran informes y blandas (Figuras 28.B y 29.B). Por el contrario, en el grupo de ratones KO tratados con TNBS las heces eran líquidas, ocupaban toda la porción terminal del colon y en varias muestras se podía observar la presencia de sangre y otras anomalías en la pared gastrointestinal (Figura 28.D Y 29.D).

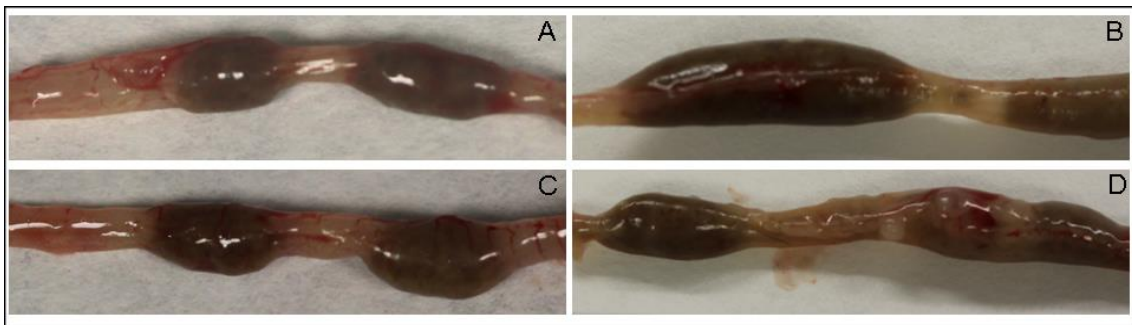


Figura 28. Fotografías representativas del colon de los animales experimentales de los grupos de machos WT control (A), WT TNBS (B), KO control (C) y KO TNBS (D). Tanto en (A) como en (C) pueden apreciarse la forma oval y el tamaño característicos de las heces de ratón. Sin embargo, en (B) se puede observar como la instilación con TNBS ha causado un aumento del tamaño de las heces. Por último, en (D) se observa que ante la ausencia de AM, al administrar TNBS las heces se vuelven informes y semi-líquidas.

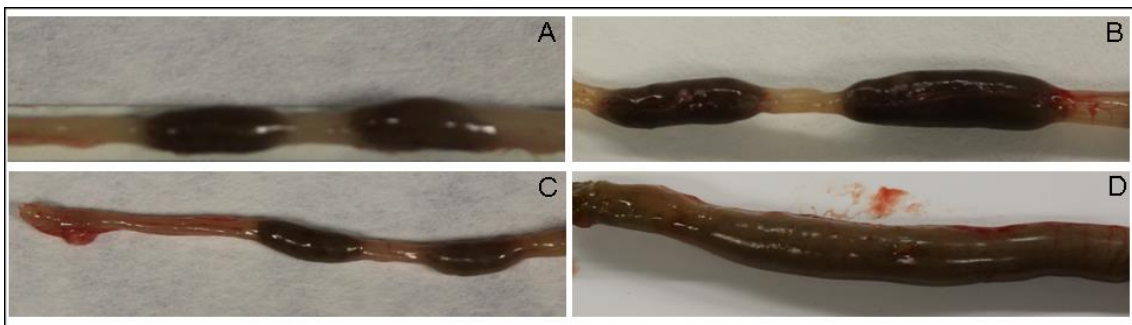


Figura 29. Fotografías representativas de la porción de colon terminal de los cuatro grupos de hembras incluidos en el procedimiento: las hembras WT control (A), WT TNBS (B), KO control (C) y KO TNBS (D). La instilación de NaCl en etanol al 50% no causa cambios en el aspecto macroscópico de las heces, como se aprecia en (A) y en (C). En (C) puede observarse como el TNBS causa en las hembras WT un aumento del volumen de las heces; de forma similar a lo observado en machos. Sin embargo, como se aprecia en (D), en ausencia de AM la misma dosis de TNBS no solo aumenta el volumen de las heces, sino que además las vuelve informes, sanguinolentas y totalmente líquidas, de modo que estas llenan por completo el tracto gastrointestinal.

Por otra parte, una vez eliminadas todas las heces contenidas en el colon, se pesaron las muestras en fresco, de modo que el peso del colon se consideró como otro indicador macroscópico de inflamación. A pesar de que todos los animales tenían la misma edad, no todos los animales pesaban lo mismo, por eso, se normalizó el peso de los 5 cm terminales de colon en función del peso corporal (Tabla 11). También se extrajo el bazo completo y se pesó, normalizando el valor obtenido en función del peso corporal, para determinar si debido al proceso inflamatorio se estaba produciendo algún cambio en este órgano (Tabla 11).

Grupo	n	Peso corporal (g)	Peso colon (mg)	Peso bazo (mg)	Peso colon/Peso corporal (%)	Peso bazo/Peso corporal (%)
♂ WT NaCl	8	26,07 ± 0,52	106,76 ± 8,26	71,16 ± 4,37	0,41 ± 0,03	0,27 ± 0,02
♂ WT TNBS	8	26,11 ± 0,56	123,05 ± 5,02	105,99 ± 17,00	0,47 ± 0,02	0,40 ± 0,06
♂ KO NaCl	7	30,62 ± 0,86	135,46 ± 7,73	73,57 ± 2,37	0,44 ± 0,03	0,24 ± 0,01
♂ KO TNBS	8	30,57 ± 1,16	155,86 ± 20,15	88,11 ± 6,38	0,51 ± 0,07	0,29 ± 0,02
♀ WT NaCl	7	21,19 ± 0,48	149,19 ± 9,07	96,24 ± 3,46	0,71 ± 0,05	0,45 ± 0,02
♀ WT TNBS	7	22,30 ± 0,50	148,91 ± 8,62	92,81 ± 6,45	0,67 ± 0,03	0,42 ± 0,03
♀ KO NaCl	8	24,13 ± 0,70	134,55 ± 6,93	87,23 ± 5,16	0,56 ± 0,03	0,36 ± 0,02
♀ KO TNBS	8	21,44 ± 0,99	213,05 ± 20,74	86,03 ± 9,36	1,03 ± 0,14	0,40 ± 0,03

Tabla 11. Peso medio corporal en gramos ± SEM de los distintos grupos al finalizar el procedimiento (Día 5). Peso medio en miligramos ± SEM del colon y el bazo de los distintos grupos. Y porcentaje de peso de estos órganos respecto al peso total del animal del que proceden.

En el grupo de machos no se encontraron diferencias significativas en el test de ANOVA de una vía para el porcentaje del peso medio del colon sobre el peso total entre ninguno de los grupos ($p > 0,05$) (Figura 30). Sin embargo, en los datos referentes al bazo se pudo comprobar que el tratamiento con TNBS causaba un aumento significativo en el peso del bazo respecto al peso corporal en los animales WT ($0,40\% \pm 0,06\%$ vs $0,27\% \pm 0,02\%$; $p < 0,05$); y que los animales KO tratados con TNBS tenían un bazo significativamente más pequeño que los machos WT que habían recibido el mismo tratamiento ($0,29\% \pm 0,02\%$ vs. $0,40\% \pm 0,06\%$; $p < 0,05$) (Figura 31).

En el grupo de hembras, el peso del colon en fresco normalizado en función del peso corporal fue superior en todos los grupos al encontrado en los machos (Figura 30). En este caso, el tratamiento con TNBS causó un aumento muy significativo del porcentaje del peso del colon en las hembras KO con respecto a sus controles (1,03% \pm 0,14% vs. 0,56% \pm 0,03%; $p < 0,01$) y un aumento de peso significativo frente a las hembras WT tratadas también con TNBS (1,03% \pm 0,14% vs. 0,67% \pm 0,03%; $p < 0,05$) (Figura 30). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría en el grupo de machos, no se observaron diferencias significativas entre los pesos medios del bazo de los cuatro grupos de hembras (Figura 31).

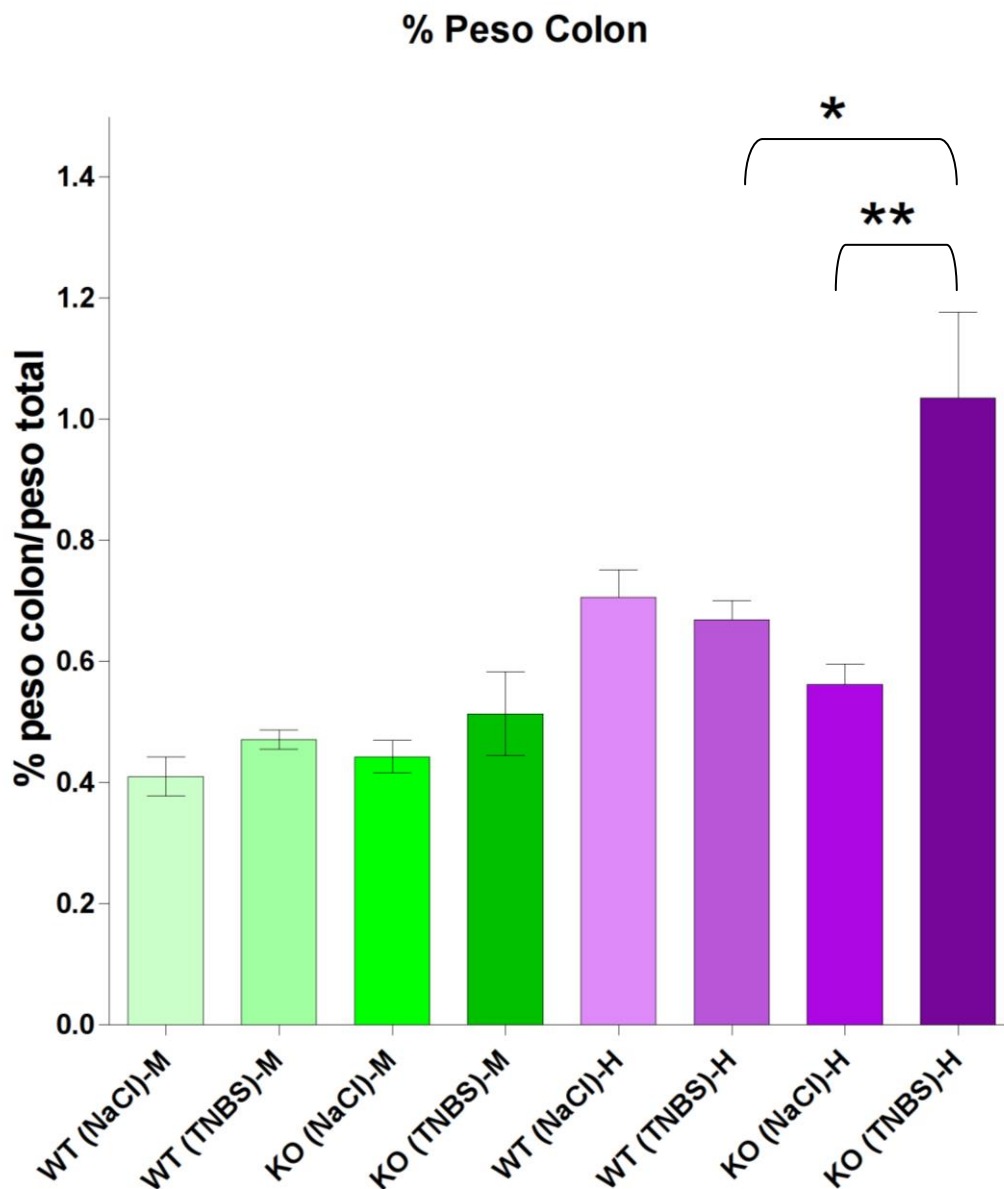


Figura 30. Gráfica del porcentaje del peso medio (mg) del colon de cada grupo normalizado en función del peso corporal \pm SEM. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se representan mediante asteriscos, de modo que un asterisco (*) equivale a una $p < 0,05$ y dos asteriscos (**) equivalen a una $p < 0,01$.

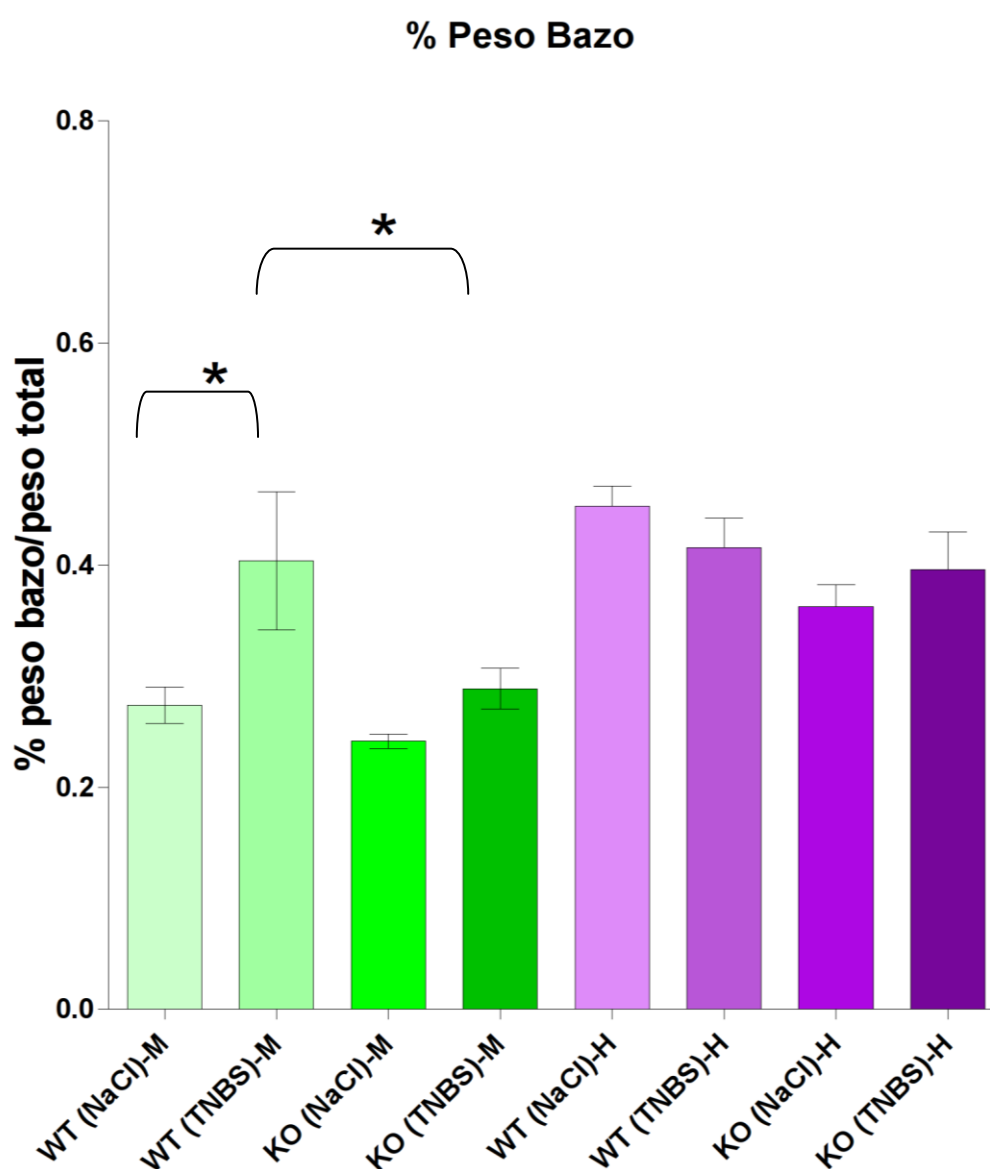


Figura 31. Gráfica del porcentaje del peso medio (mg) del bazo de cada grupo normalizado en función del peso corporal \pm SEM. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se representan mediante asteriscos, de modo que un asterisco (*) equivale a una $p < 0,05$.

6.3.2. Estudios histológicos

Para realizar los estudios de inflamación a nivel microscópico se recogió el centímetro central del fragmento de 5 cm de colon terminal de cada animal para su análisis histológico. Ese centímetro fue seccionado en tres partes, de modo que de cada animal se disponía de 3 muestras para analizar. Se hicieron cortes histológicos, que fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y examinados al microscopio óptico a distintos aumentos para evaluar los cambios inducidos por la colitis y la presencia o ausencia de AM a este nivel.

En los cortes histológicos de los machos tratados con NaCl no se observaron anomalías en la microarquitectura del colon. Inesperadamente, en el 85,71% de los machos KO controles se encontraron placas de Peyer de gran tamaño (más de 100 000 μm^2) (Figura 32), mientras que en los machos WT controles solo se observaron en el 50% de los casos; aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). En los animales que habían recibido el tratamiento con TNBS se observaron pequeñas zonas localizadas de infiltrados en la mucosa de los machos WT; mientras que en las preparaciones histológicas de los KO pudieron observarse, además de infiltrados pequeños y localizados como en los WT, extensas zonas de infiltración de linfocitos en el 37,5% de los casos (Figura 34).

En el caso de las preparaciones histológicas correspondientes al grupo de hembras, de nuevo se observaron placas de Peyer de gran tamaño en el 87,5% de la muestra de hembras KO control (Figura 33), mientras que en las hembras WT que recibieron NaCl solo se observaron en el 57,4% de los casos, sin que estas diferencias alcanzasen la significación estadística ($p>0,05$). La instilación de TNBS causó infiltraciones localizadas en las hembras WT (Figura 33). Sin embargo, en el grupo de hembras KO tratadas con TNBS se observaron infiltraciones de linfocitos extensas (Figura 34), con una destrucción de la microarquitectura del colon (Figura 33).

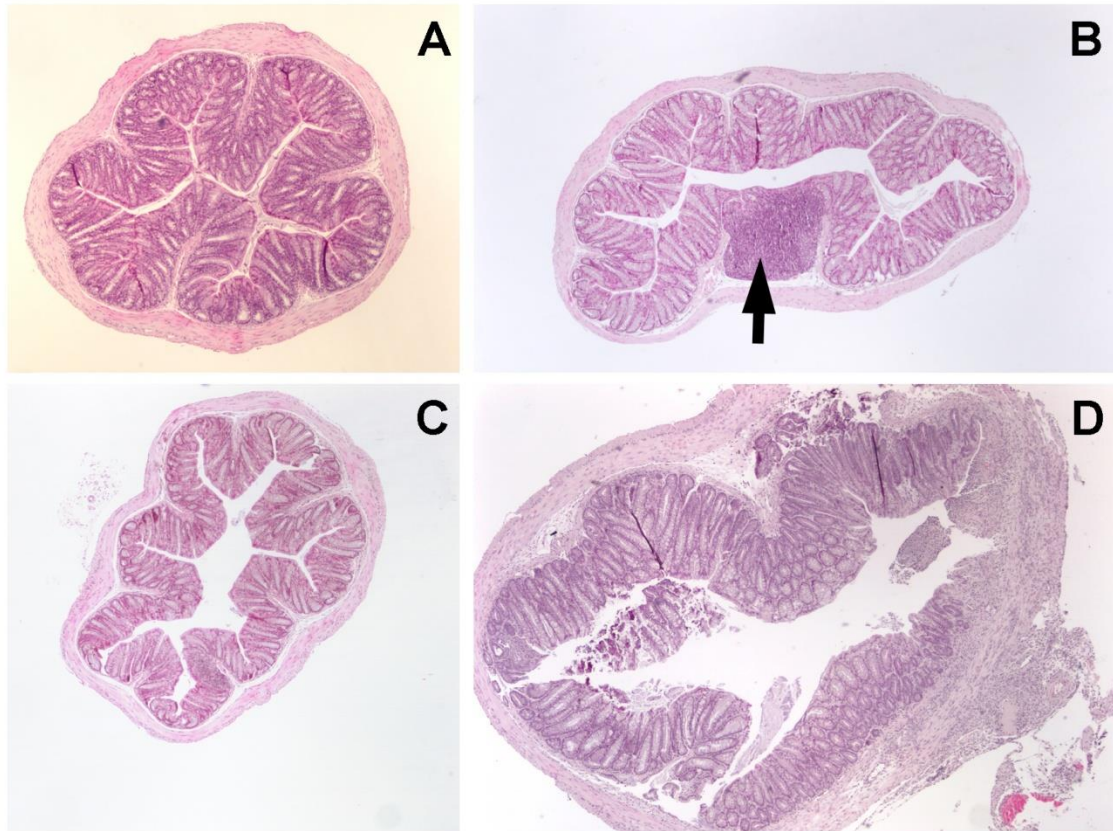


Figura 32. Imágenes de microscopía óptica (aumento 4x) de preparaciones de colon representativas de machos WT NaCl (A), machos KO NaCl (B), machos WT TNBS (C) y machos KO TNBS (D). En (A) y en (B) se aprecia la morfología normal del colon, pero en (B) existe, además, una placa de Peyer de gran tamaño (flecha). En (C) se observa que no se han producido cambios muy significativos respecto a la morfología normal del colon, solo hay pequeñas zonas de infiltración en la mucosa. Y en (D) se aprecia que parte de la arquitectura normal se ha destruido como consecuencia de la abundante infiltración en el tejido.

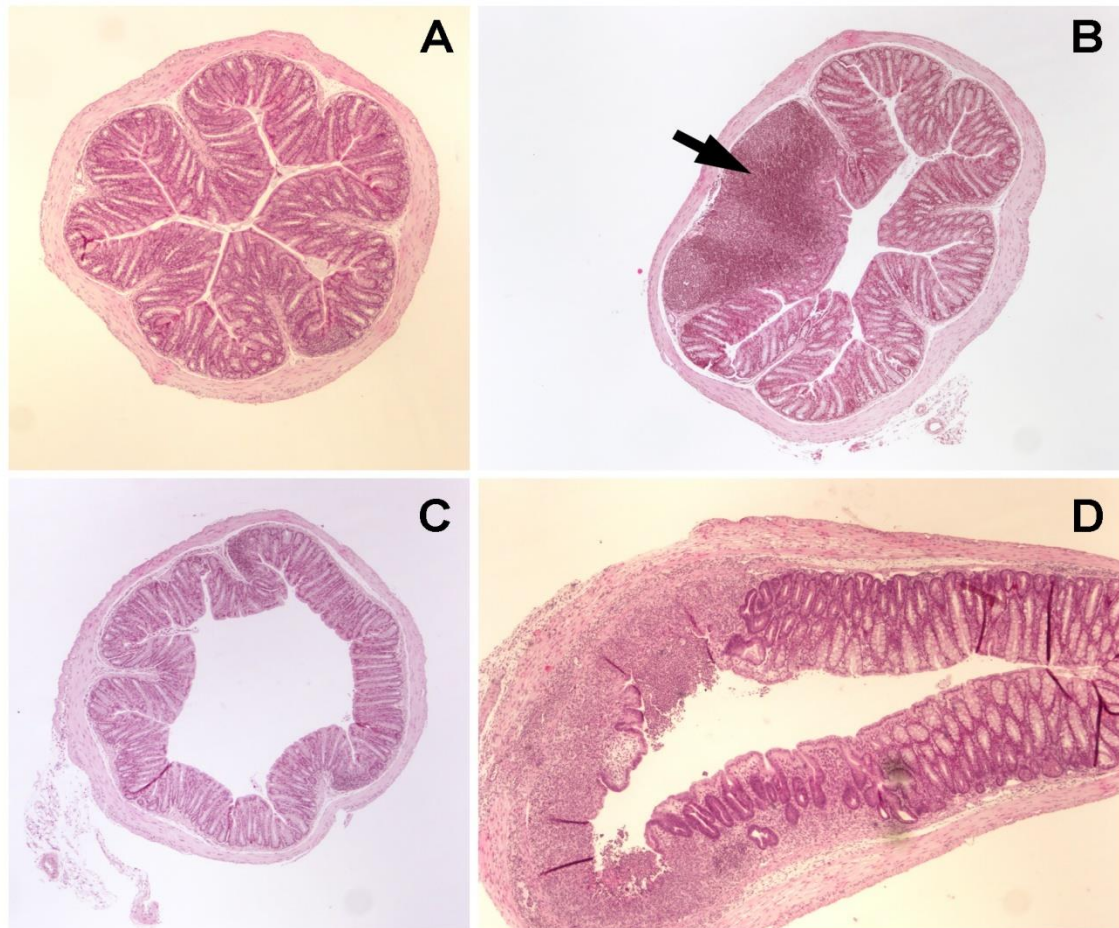


Figura 33. Imágenes de microscopía óptica (aumento 4x) de preparaciones de colon representativas de hembras WT NaCl (A), hembras KO NaCl (B), hembras WT TNBS (C) y hembras KO TNBS (D). En (A) y en (B) puede apreciarse la morfología normal del colon, pero en (B) también puede observarse una placa de Peyer de gran tamaño (flecha). En (C) aparecen ligeras zonas de infiltración de linfocitos. Y en (D) se observa una infiltración masiva que ocupa la mucosa y la submucosa del colon y que destruye la arquitectura típica del tejido en criptas.

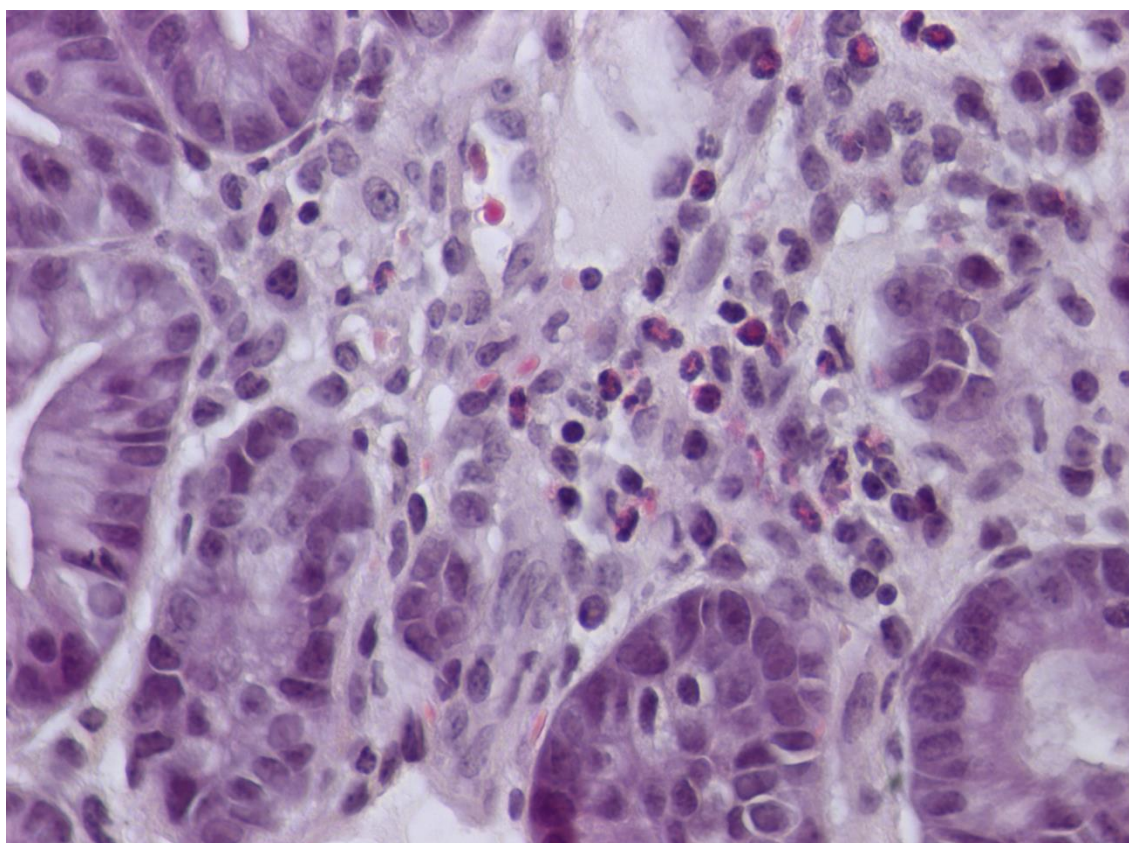


Figura 34. Imagen de microscopía óptica (aumento 60x) representativa de las infiltraciones observadas en los grupos de KO TNBS.

Sobre estas preparaciones histológicas se midieron los grosores de la mucosa y de la submucosa con el programa Fiji. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Grupo	Número de mediciones recogidas	Grosor de la mucosa (μm)	Grosor de la submucosa (μm)
♂ WT NaCl	437	265,10 \pm 2,32	14,65 \pm 3,82
♂ WT TNBS	429	253,80 \pm 1,90	15,39 \pm 5,22
♂ KO NaCl	231	249,40 \pm 2,93	8,76 \pm 4,02
♂ KO TNBS	354	312,20 \pm 2,05	14,33 \pm 5,20
♀ WT NaCl	206	247,30 \pm 3,05	20,22 \pm 5,32
♀ WT TNBS	281	264,40 \pm 2,51	23,44 \pm 2,91
♀ KO NaCl	376	220,10 \pm 2,26	21,62 \pm 3,06
♀ KO TNBS	333	382,50 \pm 6,03	65,19 \pm 14,28

Tabla 12. Medición del grosor de la mucosa y la submucosa en cortes histológicos. Se muestra el número de mediciones totales que se pudieron realizar en cada grupo de animales, así como el valor medio del grosor en micras de la mucosa y de la submucosa \pm sus correspondientes SEM.

El análisis histológico en el grupo de machos reveló que la instilación de TNBS causó un aumento muy significativo del grosor de la mucosa del colon en el grupo de animales KO frente a sus controles ($312,20 \mu\text{m} \pm 2,05 \mu\text{m}$ vs. $249,40 \mu\text{m} \pm 2,93 \mu\text{m}$; $p < 0,001$); mientras que en el grupo de animales WT no pareció ocasionar ninguna inflamación a nivel microscópico. Sorprendentemente se observó que los animales controles tenían un grosor significativamente mayor que los animales tratados con TNBS ($265,10 \mu\text{m} \pm 2,32 \mu\text{m}$ vs. $253,80 \mu\text{m} \pm 1,90 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Además, en los animales deficientes para AM, la inflamación a nivel de la mucosa era significativamente superior al de los animales WT ($312,20 \mu\text{m} \pm 2,05 \mu\text{m}$ vs. $253,80 \mu\text{m} \pm 1,90 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) (Figura 35.A). Respecto al engrosamiento de la submucosa, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ninguno de los grupos (Figura 35.B). De acuerdo con los datos, podemos asumir que las diferencias histológicas observadas en machos se deben a una mayor reacción inflamatoria a nivel de la mucosa.

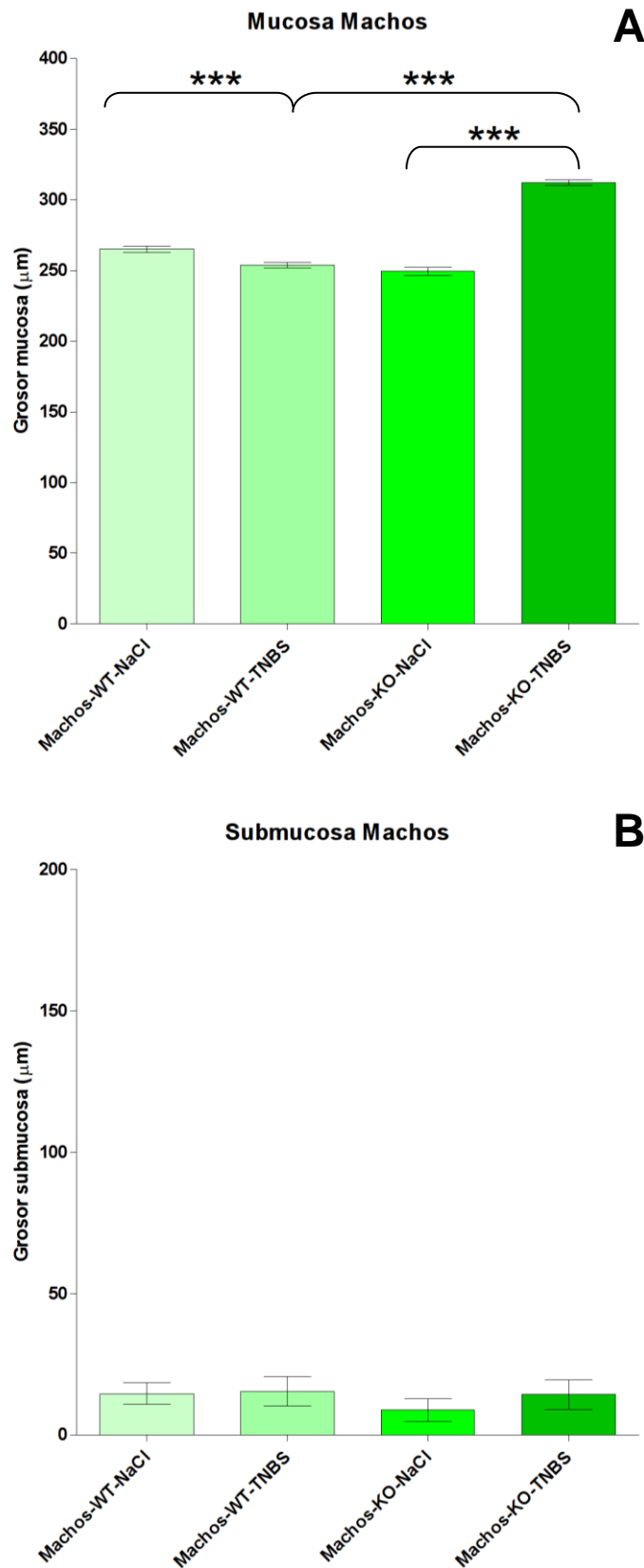


Figura 35. A) Grosor medio \pm SEM de la capa mucosa del colon de los cuatro grupos de machos incluidos en el procedimiento. B) Grosor medio \pm SEM de la capa submucosa del colon de los cuatro grupos de machos.

En el grupo de hembras, el análisis histológico de las preparaciones reveló que la instilación con TNBS causó un aumento muy significativo del grosor de la mucosa del colon tanto en el grupo de hembras WT ($264,40 \mu\text{m} \pm 2,51 \mu\text{m}$ vs. $247,30 \mu\text{m} \pm 3,05 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) como en el de hembras KO ($382,50 \mu\text{m} \pm 6,03 \mu\text{m}$ vs. $220,10 \mu\text{m} \pm 2,26 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) en comparación con sus respectivos controles. Además, al igual que ocurría en los machos, la ausencia de AM provocó una reacción de inflamación que engrosó la mucosa de las hembras KO de forma significativa al compararla con las hembras WT tratadas ($382,50 \mu\text{m} \pm 6,03 \mu\text{m}$ vs. $264,40 \mu\text{m} \pm 2,51 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) (Figura 36.A). A nivel de la submucosa no se observó que la administración de TNBS causase un engrosamiento significativo en el grupo de hembras WT respecto a sus controles ($23,44 \mu\text{m} \pm 2,91 \mu\text{m}$ vs. $20,22 \mu\text{m} \pm 5,32 \mu\text{m}$; $p > 0,05$), pero sí en el grupo de hembras KO respecto a sus controles ($65,19 \mu\text{m} \pm 14,28 \mu\text{m}$ vs. $21,62 \mu\text{m} \pm 3,06 \mu\text{m}$; $p < 0,01$). Además, a nivel de la submucosa también se observó que las hembras KO tenían un engrosamiento significativamente mayor de esta capa del colon ($65,19 \mu\text{m} \pm 14,28 \mu\text{m}$ vs. $23,44 \mu\text{m} \pm 2,91 \mu\text{m}$; $p < 0,01$) (Figura 36.B). Podemos concluir que en las hembras, la instilación de TNBS causa una reacción de inflamación a nivel de la mucosa, y que ante la ausencia de AM esta reacción inflamatoria se extiende a lo largo de toda la pared del colon, incluida la submucosa.

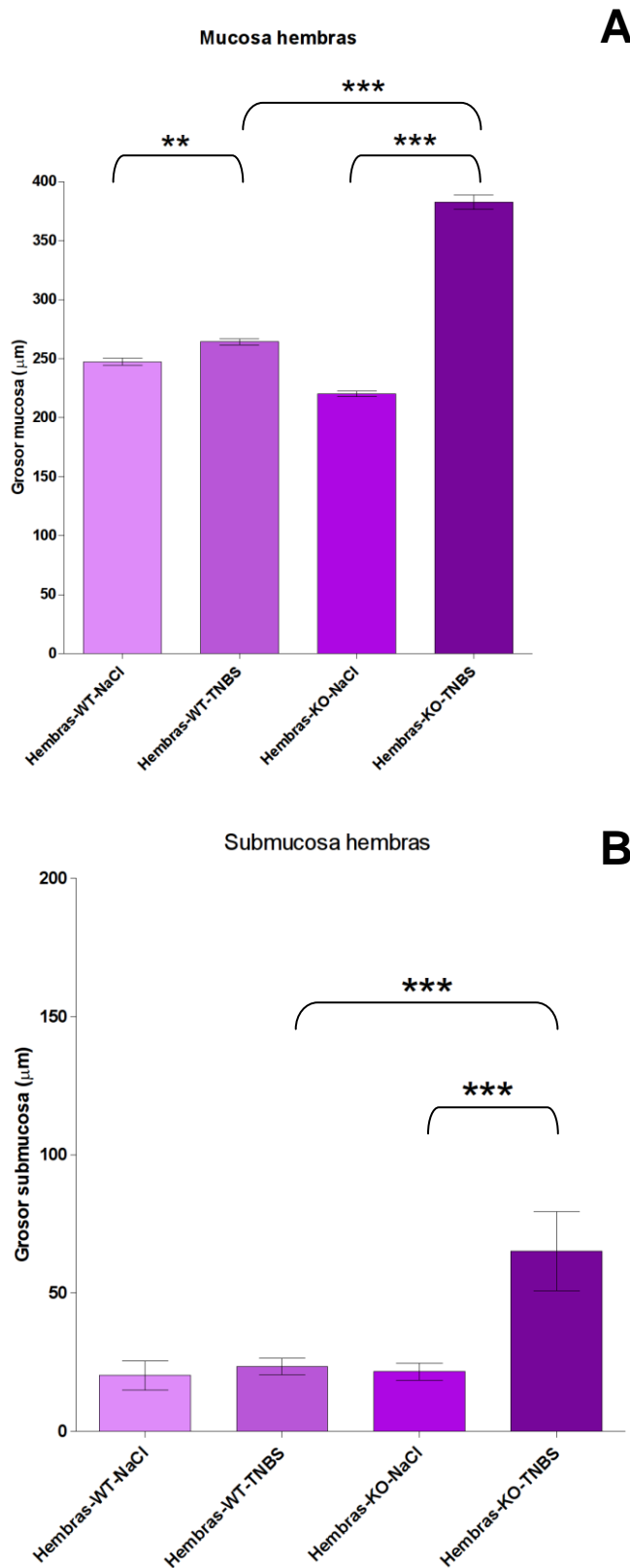


Figura 36. A) Grosor medio \pm SEM de la capa mucosa del colon de los cuatro grupos de hembras. B) Grosor medio \pm SEM de la capa submucosa del colon. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se representan mediante asteriscos, de modo que dos asteriscos (**) equivalen a una $p < 0,01$ y tres asteriscos (***) equivalen a una $p < 0,001$.

6.3.3. Evaluación de la infiltración leucocitaria

La evaluación de la infiltración de neutrófilos, monocitos y macrófagos en el tejido homogenizado se realizó de forma indirecta a través de la medición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) con un ensayo fluorimétrico. Los resultados obtenidos se normalizaron en función de la concentración total de proteínas presentes en los extractos de colon. Los resultados del ensayo se muestran a continuación en la Tabla 13. Debido a que la actividad de la MPO en los extractos de colon no sigue una distribución paramétrica, los datos se expresan como la mediana de la actividad de MPO y el análisis estadístico se realizó con el test de Kruskal-Wallis.

Grupo	n	Concentración total de proteína (mg/mL)	Actividad MPO (pmol/min/mL)
♂ WT NaCl	8	1561,53 ± 44,50	2,14 ± 2,80
♂ WT TNBS	8	1465,26 ± 39,99	2,10 ± 2,43
♂ KO NaCl	7	1655,75 ± 51,25	3,10 ± 1,26
♂ KO TNBS	8	1527,99 ± 36,21	2,71 ± 2,24
♀ WT NaCl	7	1577,34 ± 39,46	0,72 ± 1,10
♀ WT TNBS	7	1645,83 ± 64,52	2,39 ± 2,15
♀ KO NaCl	8	1667,27 ± 42,32	1,97 ± 0,91
♀ KO TNBS	8	1801,76 ± 35,43	3,06 ± 5,69

Tabla 13. Resultados de la concentración total media de proteína (mg/mL) ± SEM de los homogenizados de colon; y de la mediana de la actividad de MPO (pmol/min/mL) ± AIC presente en el tejido de cada grupo de estudio.

En el grupo de machos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de MPO en los homogenizados de colon de los distintos grupos ($p > 0,05$) (Figura 37).

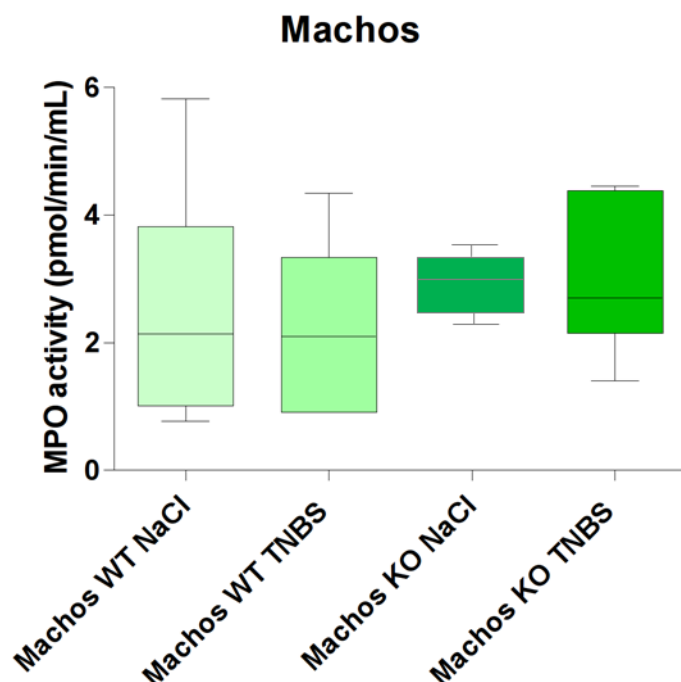


Figura 37. Diagrama de cajas de la actividad de MPO expresada en pmol/min/mL, y normalizada en función de la cantidad de proteína total extraída de los homogenizados de colon de los cuatro grupos de machos incluidos en el procedimiento.

En el grupo de hembras, los resultados del test de Kruskal-Wallis fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$). Al realizar las comparaciones múltiples mediante el test de Dunns se observó que la instilación de TNBS causaba una elevación significativa de la actividad de MPO en el colon del grupo de hembras WT ($2,39 \pm 2,15$ pmol/min/mL vs. $0,72 \pm 1,10$ pmol/min/mL; $p < 0,05$), y una elevación de la actividad MPO en el colon de las KO respecto a sus controles que no llegaba a ser significativa, probablemente debido a la elevada dispersión de los datos de este grupo ($3,06 \pm 5,69$ pmol/min/mL vs. $1,97 \pm 0,91$ pmol/min/mL; $p > 0,05$). Sorprendentemente, las hembras KO que habían recibido una instilación de NaCl presentaron una actividad de MPO significativamente superior al de las hembras WT controles ($1,97 \pm 0,91$ pmol/min/mL vs. $0,72 \pm 1,10$ pmol/min/mL; $p < 0,05$) (Figura 38).

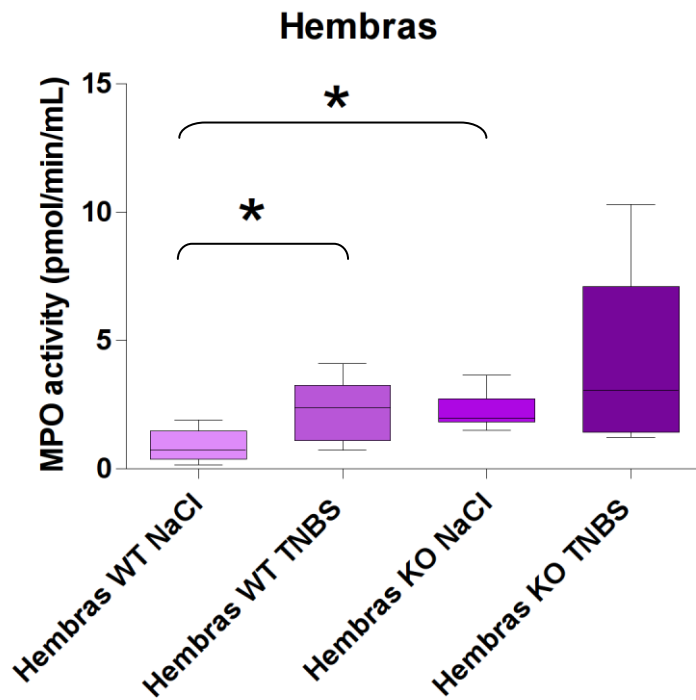


Figura 38. Diagrama de cajas de la actividad de MPO expresada en pmol/min/mL, y normalizada en función de la cantidad de proteína total extraída de los homogenizados de colon de los cuatro grupos de hembras incluidas en el procedimiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos se representan mediante asteriscos, de modo que un asterisco (*) equivale a una $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. GENERACIÓN DE RATONES KO TOTALES PARA ADRENOMEDULINA

La generación de un modelo de ratón KO total para AM era uno de los objetivos principales de este estudio. Debido a la íntima relación de la AM con el desarrollo vascular de la placenta y del embrión durante la gestación (164, 165), hasta ahora no había sido posible lograr un modelo de ratón adulto con el gen de la AM deletado en todo su organismo, puesto que la ausencia total de este péptido o de sus receptores resultaba en letalidad embrionaria (140-143). En todos los artículos publicados hasta el momento, para estudiar el papel de la AM en distintas funciones fisiológicas y en situaciones patológicas se había tenido que recurrir a la delección condicional-espacial del gen en distintos órganos y tejidos, dirigiendo la expresión de la recombinasa Cre con promotores específicos de esas zonas (149).

Sin embargo, estos modelos presentaban ciertas carencias, ya que, la AM se expresa en multitud de órganos y tejidos, y al ser un péptido circulante se transporta por la sangre unida al factor H (111). Por tanto, no puede descartarse el hecho de que aunque la expresión de AM se hubiese suprimido totalmente en un órgano concreto, ciertos niveles de esta hormona producida en otras zonas del organismo llegasen a ese órgano a través de la circulación.

Para lograr el objetivo de este trabajo, se decidió recurrir a un modelo genético de inducción temporal de la delección, de modo que la eliminación global del gen de la AM tuviese lugar en ratones adultos, cuyo desarrollo se hubiese completado. Para ello, se empleó una combinación del sistema Cre/loxP, cuya eficacia para deletar de forma condicional-espacial el gen de la AM ya había sido probada anteriormente (172), con el sistema de inducción mediado por tetraciclina tet-On (200).

La elección del sistema tet-On (rtTA-M2/tetO) como regulador de la expresión de Cre en este trabajo se basa en que, de acuerdo con la literatura publicada (ver más adelante), otros métodos de delección condicional-temporal no han demostrado ser tan eficaces.

El interés por los modelos temporales de inducción de recombinación génica ha ido en aumento en los últimos años, especialmente en relación a genes letales durante el desarrollo embrionario. Una de las primeras alternativas para lograr el control temporal de la expresión de Cre fue unir el gen de esta recombinasa al dominio de unión de distintos receptores de hormonas esteroideas, de modo que al añadir de forma exógena el ligando adecuado, se indujese la expresión de Cre en el momento

deseado. Varios receptores de hormonas esteroideas se han probado ya, incluyendo el receptor de glucocorticoides (214), el receptor de andrógenos (215), el receptor de progesterona (216), y los receptores de estrógenos humanos (217) y murinos (218). Todos estos receptores presentan ligeras modificaciones que permiten que su respuesta sea inducida de forma específica por ligandos artificiales con más eficacia que por las hormonas presentes de forma natural en el organismo. Probablemente, el modelo más extendido de todos ellos sea el modelo del receptor de estrógenos, del que han aparecido diversas variantes mutadas (219, 220) que reducen su afinidad por los estrógenos naturales y permiten su activación mediante la administración de tamoxifeno.

Sin embargo, a pesar de las modificaciones, y de que en muchos de estos trabajos no se menciona la tasa de recombinación basal en ausencia de ligando, a día de hoy se sabe que estos modelos presentan ciertos inconvenientes. Por ejemplo, el uso de la recombinasa Cre bajo el control del promotor de andrógenos suele reservarse para modelos de hembras, ya que, en machos se produce la recombinación aunque no se administre el ligando exógenamente (215). En el caso del modelo del receptor de estrógenos, grupos independientes como el de *Brake et al.* (221) han demostrado que existe una importante tasa de recombinación basal en los ratones no expuestos a tamoxifeno.

El estudio por PCR de la delección realizado en el presente trabajo confirma que con la administración de 2 mg/mL de doxiciclina en el agua de bebida durante 14 días se consigue eliminar totalmente el gen de la AM de todos los órganos corporales, incluidos aquellos con barreras hemáticas, como cerebro y testículo. Estos resultados son concordantes con los obtenidos previamente por el grupo de Cawthorne *et al.* (205), donde ya se observó que la administración oral de doxiciclina durante 7 días a esa dosis no era suficiente para que ocurriese la recombinación génica en el sistema nervioso central. A pesar de que algunos estudios desaconsejan suplementar la solución de doxiciclina con sacarosa (222) porque se aumenta significativamente el número de calorías ingeridas por los ratones, el estudio piloto llevado a cabo en nuestro laboratorio demuestra que a los animales requieren de un período de 24 a 48 horas de adaptación al sabor de la solución de doxiciclina (aunque esté endulzada), durante el cual consumen menos líquido y comida, y pierden peso. Es de suponer que si no se suplementase la doxiciclina con sacarosa, el fuerte sabor amargo de la misma provocaría que el período de adaptación y el estrés generado a los animales fuese mayor, y el consumo de doxiciclina sería menor que el previsto inicialmente.

De acuerdo con los datos publicados en estudios previos, el empleo del transactivador reverso mejorado, rtTA-M2, en lugar del transactivador reverso normal,

rtTA, debería aumentar la afinidad del mismo por la doxiciclina hasta 10 veces y suprimir toda recombinación basal en ausencia del antibiótico (200, 223, 224). El único trabajo donde se emplea este mismo modelo genético y en el que se habla de la existencia de una mínima recombinación en ausencia de doxiciclina es el publicado por el grupo de Bäckman *et al.* (206). Sin embargo, los datos de las PCR para la delección realizadas en este trabajo revelan, en contra de lo publicado anteriormente, que en ausencia de doxiciclina existe una recombinación parcial, y en algunos casos incluso total, del gen de la AM en la mayoría de los animales y órganos estudiados. Esto significa que el sistema de recombinación mediado por doxiciclina rtTA-M2/tetO-Cre presenta el fenómeno que se conoce como “leaky expression” (225), es decir, existe una expresión basal de recombinasa no mediada por doxiciclina, bien porque el gen rtTA-M2 no produce suficiente proteína represora que bloquee al promotor tetO, o porque el control del promotor tetO sobre el gen Cre es débil.

La presencia del fenómeno “leaky expression” obligó a cambiar el diseño del estudio e incluir como controles del modelo animales cuyo gen de la AM no se encontrase floxeado (AM wt/wt); en vez de animales con el gen floxeado (AM flox/flox) y que no hubiesen tomado doxiciclina, como suele ser habitual en otras publicaciones (200, 206). Esto habría supuesto una limitación del estudio. Sin embargo, tras revisar las publicaciones de Angelakis *et al.* (207) y de Larráyoiz *et al.* (208), y comprobar que la doxiciclina no solo provoca alteraciones de la microbiota intestinal (parte esencial del desarrollo de las IBD, y por tanto vital en nuestro modelo de colitis), sino que además modifica los patrones de expresión de varios genes mitocondriales, del retículo endoplasmático y de distintos componentes de matriz extracelular. Por lo tanto, parece obvio que el mejor control posible para este estudio eran ratones WT a los que también se les administrase la solución de doxiciclina. De este modo se puede asegurar que las diferencias observadas entre ratones KO y WT se deben exclusivamente a la ausencia de AM, y no a la actividad de la doxiciclina.

A pesar de estos problemas iniciales con los animales control, se consiguió el objetivo propuesto inicialmente: generar animales adultos KO para AM viables. Tras la inducción de la delección, los KO son totalmente normales y no muestran diferencias fenotípicas respecto a los animales WT, a excepción del peso corporal en los machos. Al comparar animales de la misma edad (16 semanas), se observa que los machos KO pesan una media de 4,51 g más que los animales WT. Sorprendentemente, esta diferencia no se observó en hembras a la edad de 16 semanas, lo cual supone el primer indicio de que la ausencia total de AM endógena puede tener efectos diferentes entre ambos sexos. Este patrón de diferencias específicas entre sexos ya ha sido descrito en estudios previos con otros modelos de KO, como los ratones deficientes

para el gen de la sintetasa de NO (226), para el gen del péptido natriurético atrial (227), o para la subunidad GluA1 del receptor de glutamato (228), entre otros. En el momento de realizar las necropsias en el estudio piloto para recoger muestras de las que obtener el ADN genómico, tampoco se observaron anomalías a nivel interno en los principales órganos corporales, ni la presencia de edemas, malformaciones vasculares o hemorragias internas como sucedía en los embriones (142).

7.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE COLITIS AGUDA EN RATONES KO PARA ADRENOMEDULINA

A día de hoy se sabe que los neuropéptidos producidos durante el curso de una respuesta inflamatoria son agentes anti-inflamatorios endógenos que participan en los procesos que conducen a la resolución de la inflamación y al mantenimiento de la tolerancia inmunitaria (229). El tratamiento exógeno con estas moléculas ha demostrado que disminuye la frecuencia, retrasa la aparición y reduce la gravedad de diferentes modelos experimentales establecidos de patologías de tipo inmunitario como la sepsis (230), la artritis reumatoide (231) o la diabetes tipo 1 (232). En esta línea, los efectos anti-inflamatorios de la AM ya se han observado en varios modelos de patologías de tipo inmunitarias, incluidas las IBD.

Trabajos previos habían demostrado que la administración exógena de AM recombinante tiene un efecto terapéutico beneficioso en los principales modelos de colitis animales (186, 187, 189, 196) y en los primeros casos de investigación traslacional a pacientes con CU severa refractaria a los tratamiento convencionales (197, 198). Los principales mecanismos a través de los cuales la AM ejerce su función protectora son la inhibición de una respuesta inmunitaria aberrante, el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial intestinal, la reducción de la formación de exudados inflamatorios, la aceleración de la velocidad de regeneración de las zonas ulceradas, y la protección y restauración de la función vascular mesentérica dañada.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado una asociación entre el papel de la AM endógena y el desarrollo de la patología intestinal de tipo inflamatorio.

En este Trabajo Fin de Máster se ha intentado corroborar dicha asociación comparando los resultados a nivel macroscópico, histológico y bioquímico de la inducción de una colitis aguda con TNBS entre ratones machos y hembras deficientes para AM y sus respectivos controles con el gen de la AM intacto. Como demuestran nuestros resultados, y de acuerdo con lo publicado en trabajos previos arriba citados, está claro que la AM tiene un papel protector frente al desarrollo de las IBD; de modo que en este modelo de colitis aguda inducida con TNBS, la ausencia de AM endógena provoca un inicio de la patología mucho más rápido, un aumento significativo de la

severidad de los signos clínicos observados (diarrea, deshidratación, anorexia y hemorragias) y provoca una respuesta inmunitaria aberrante, con un reclutamiento de linfocitos al colon desde los órganos linfoides periféricos que ocasiona daños inflamatorios extensos en la mucosa y la submucosa intestinales. Estos resultados se discuten a continuación.

7.2.1. La ausencia de adrenomedulina aumenta la severidad clínica del modelo de colitis aguda inducido por TNBS, acelerando el inicio y agravando la patología

De acuerdo con la metodología seguida por el grupo de González-Rey *et al.* (188) se instiló a cada animal de los grupos tratados 3 mg de TNBS disueltos en un volumen de 100 μ L de etanol al 50%, mientras que cada animal de los grupos control recibió el mismo volumen de NaCl disuelto en etanol al 50%. Nuestro trabajo demuestra que la instilación de TNBS causa el desarrollo de una colitis de severidad leve en los animales WT, de severidad moderada en los machos KO y de severidad entre moderada y alta en las hembras KO.

Si se comparan los resultados de la instilación de TNBS en los animales WT con los obtenidos por González-Rey *et al.* (188) puede comprobarse que en nuestro estudio los animales WT desarrollan una colitis mucho menos severa, sin pérdidas significativas de peso al final del estudio respecto a la situación basal. Además, en este trabajo el TNBS no disminuye la supervivencia en ninguno de los grupos, mientras que en los datos reportados por González-Rey *et al.* (188) se observa que el TNBS causa una mortalidad cercana al 60% en los animales tratados. Estas diferencias podrían deberse a dos causas o a la combinación de ambas:

La primera de ellas sería la cepa de los animales; ya que, en este trabajo los ratones pertenecen a la cepa C57BL/6J, mientras que González-Rey *et al.* emplean animales de la cepa Balb/c. Otros estudios ya han demostrado que la cepa empleada en ensayos de colitis puede influir en la severidad de la patología desarrollada por los ratones (233).

La segunda explicación posible sería que normalmente en estudios de colitis se emplean animales cuya edad está comprendida entre las 8 y las 10 semanas; sin embargo, debido al procedimiento de recombinación génica para inducir la delección del gen de la AM y al período de recuperación posterior de un mes (para que la microbiota bacteriana se restaurase tras el tratamiento con doxiciclina), los ratones empleados en este estudio contaban con 16 semanas. Lógicamente, al ser mayores, los ratones pesan más y la dosis de TNBS administrada en relación al peso corporal es menor. Esta segunda teoría parece quedar confirmada si consideramos que los

resultados de severidad obtenidos en este trabajo son más semejantes a los obtenidos por Kono *et al.* (194), donde instilan una dosis de 1,5 mg de TNBS (la mitad de nuestra dosis) a ratones Balb/c de 8 semanas.

A pesar de todo, parece indudable que aunque leve, la instilación intra-rectal de 3 mg de TNBS tiene un efecto en los animales WT, mientras que ese efecto es bastante más acusado en los animales KO. Por tanto, parece que se ha encontrado una dosis capaz de causar un daño mínimo a los animales con la AM intacta, pero que ante la ausencia de esta, desencadena una respuesta patológica significativamente mayor.

En machos, la ausencia de AM provoca que la patología se inicie de forma mucho más rápida y agresiva, observándose deposiciones blandas en las primeras 24 horas tras la instilación, que evolucionan a heces líquidas en más de la mitad de la muestra tras 72 horas, y donde se aprecia la presencia de sangre en heces en un cuarto de la muestra el último día de procedimiento. Sin embargo, en los animales WT se aprecian signos de colitis más leves, como deposiciones blandas, a partir del tercer día de procedimiento, momento en el que su índice de severidad comienza a aumentar y se aproxima al de los animales KO. De ahí que solo se observen diferencias estadísticamente significativas entre KO y WT tratados con TNBS durante las primeras 48 horas de estudio, después la colitis empieza a manifestarse también en los animales WT y la situación entre ambos grupos tiende a igualarse.

Por otro lado, además de retrasar la aparición de la enfermedad y reducir la gravedad de la misma, la presencia de AM endógena es capaz de prevenir la pérdida de peso corporal en los machos WT tratados con TNBS. A pesar de presentar heces blandas y de realizar un número mayor de deposiciones, los machos WT TNBS ganaron una media de 1,74 g en los cinco días que duró el procedimiento. Mientras que en las primeras 48 horas tras la instilación, los machos KO perdieron una media de 1,91 g de peso corporal. Si bien es cierto que pasado el punto crítico del tercer día estos animales recuperaron su peso basal, probablemente gracias a la administración de suero para rehidratarlos.

Estos mismos resultados se observaron en los grupos de hembras, pero con diferencias mucho más significativas entre los dos genotipos. Con diferencia, las hembras KO TNBS obtuvieron los mayores índices de severidad y mostraron las pérdidas de peso más importantes. En un primer momento, podría argumentarse que esto es debido a que las hembras, a pesar de tener la misma edad que los machos, tienen un peso corporal inferior, y por tanto están recibiendo una dosis de TNBS más elevada por unidad de peso corporal que los machos. Pero de ser esta la explicación, también se observaría el mismo comportamiento en el grupo de hembras WT TNBS;

sin embargo, no es así. Aunque las hembras WT TNBS mostraron algunos signos de colitis leve a partir del tercer día de procedimiento, como heces blandas o signos leves de deshidratación, en ningún caso las diferencias observadas con su correspondiente grupo control (hembras WT NaCl) fueron significativas, así como tampoco sufrieron pérdidas de peso (el grupo ganó de media algo más de medio gramo en los cinco días transcurridos de estudio). Por el contrario, las hembras KO tratadas con TNBS mostraron desde el primer día signos de colitis leve que empeoraron paulatinamente hasta llegar a una calificación próxima a severa de acuerdo con el índice empleado en este trabajo; de modo que tras 72 horas, tres cuartas partes de la muestra presentaban diarrea totalmente líquida; y para el quinto día de procedimiento, en la mitad de la muestra se observaba sangre en heces y en una cuarta parte los primeros indicios de la formación de un prolapso rectal. Además, el grupo de hembras KO TNBS perdió durante las primeras 48 horas tras la instilación una media de 2,75 g; pasado ese tiempo, aunque comenzaron a recuperar algo de peso gracias a las medidas paliativas administradas, el grupo no llegó a recuperar su peso basal al final del procedimiento.

Por tanto, los niveles de AM endógenos son capaces de retrasar el inicio de la colitis y disminuir la gravedad de la misma en ambos sexos; previniendo la pérdida de peso, las diarreas severas y la presencia de sangre en heces. Pero parecen tener un efecto mucho más beneficioso en las hembras. De todos los artículos revisados, solo en el trabajo de Talero *et al.* (189) se estudia las acciones de la AM en un modelo de colitis agudo y crónico inducido por TNBS en ratas machos y hembras; sin embargo, en ningún momento se menciona que existan diferencias de resultados entre ambos sexos.

Esta es, por tanto, una nueva prueba de que la ausencia de AM a nivel global tiene distintos efectos en machos y hembras. Una posible explicación a estas diferencias observadas en el grado de la patología asociadas al sexo sería la existencia de una conexión entre la AM y el sistema inmunitario mediada por hormonas sexuales, en concreto por estrógenos. De hecho, que la etiología de las IBD tiene una relación con la alteración de las hormonas sexuales femeninas ya ha sido demostrado, pues datos epidemiológicos recientes apuntan a que el consumo de anticonceptivos orales durante largos períodos de tiempo se considera un factor de riesgo en el desarrollo de estas patologías (13).

Gracias al estudio de la osteoporosis postmenopáusica, en las últimas décadas se ha hecho evidente que existe una fuerte conexión entre los niveles de estrógenos y el sistema inmunitario (234), y estos parecen mediar tanto en las respuestas inmunitarias humorales como celulares (235). Los estrógenos, al unirse a sus

receptores, son capaces de activar cascadas de transducción de señales que controlan determinados promotores diana, modificando la expresión de ciertos genes en los linfocitos T (236); por ello, en ausencia de estrógenos se produce un incremento de varias citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α o las IL-1, IL-7, IL-6 e IL-17. Además, la falta de estrógenos promueve la expansión de linfocitos T activos en el timo (237).

Por otro lado, la AM ha demostrado ser capaz de regular la secreción de otras muchas hormonas como la insulina (161), y se sabe que puede actuar a lo largo de todo el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (159), el cual a su vez también está íntimamente relacionado con los niveles de hormonas sexuales. Además, se sabe que existe una conexión entre la AM y el ciclo menstrual femenino, de modo que los niveles de AM plasmática aumentan durante la fase folicular, justo cuando los niveles de producción de estrógenos por parte de los folículos del ovario son máximos, y descienden durante la fase lútea, de forma paralela a los niveles de estrógenos (162).

Ante este escenario, aunque es solo una teoría, parece plausible plantearse que en las hembras KO la ausencia de AM podría causar de algún modo una disminución en la producción o en la actividad de los estrógenos que contribuyese al desarrollo de una desregulación inmunitaria de mayor gravedad que la observada en los machos.

7.2.2. La ausencia de adrenomedulina provoca un aumento de los parámetros macroscópicos de inflamación local y promueve la recirculación linfocitaria desde el bazo

El peso del colon en fresco, normalizado en función de su longitud o del peso corporal de los animales, se ha empleado en numerosas publicaciones como un indicador de inflamación local. Cuando tiene lugar una reacción inflamatoria se produce la formación de exudados inflamatorios (tanto líquido como células) que aumentan tanto el volumen, como el peso del órgano en cuestión.

De forma similar a los resultados de este trabajo descritos en el apartado anterior, pero en discrepancia con los resultados publicados por otros grupos como el de Talero *et al.* (189), la instilación de TNBS en machos y hembras WT no aumentó de forma significativa el peso de su colon. Sin embargo, lo que sí es concordante con los resultados publicados hasta la fecha es que los animales con una mayor concentración de AM, bien de procedencia exógena o endógena, presentan niveles de inflamación local significativamente inferiores (187, 189), aunque en nuestro trabajo las diferencias estadísticamente significativas solo se observaron en el grupo de hembras. Las hembras KO TNBS tenían un colon un 53,73% más pesado de media que el colon de las hembras con el gen de la AM intacto y, por tanto, podemos concluir que su

colon está significativamente más inflamado. Aunque en machos las diferencias observadas en el peso del colon normalizado en función del peso corporal no alcanzaron la significación estadística, sí se observa que existe una tendencia en la que los machos KO tienen un colon más pesado que el de los machos WT. Como las diferencias entre estos dos grupos son menores que las estimadas inicialmente para calcular el tamaño muestral, podría suponerse que al aumentar el número de animales en cada grupo sería posible alcanzar la significación estadística.

En cuanto a la respuesta inflamatoria a nivel sistémico, se decidió evaluar el peso del bazo en relación al peso total del cuerpo. El bazo es en mamíferos adultos un órgano linfoide secundario, cuya función principal es de tipo inmunológica, ya que es donde tiene lugar la maduración de linfocitos en respuesta a antígenos sanguíneos y donde sucede la recirculación linfocitaria (238). Cuando ocurre una respuesta inmunitaria, los linfocitos inmaduros llegan al bazo desde los órganos linfoides primarios (en mamíferos, el timo), una vez ahí terminan de madurar y si la respuesta inmunitaria se ha iniciado en otro órgano, salen del bazo, y por medio de la recirculación linfocitaria, van a otro órgano linfoide periférico como los ganglios linfáticos, el tejido linfoide asociado a piel (SALT, del inglés *skin associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, del inglés *mucosa associated lymphoid tissue*) o al tejido linfoide asociado a tracto digestivo (GALT, del inglés *gut associated lymphoid tissue*), dentro del cual se encuentran englobadas las placas de Peyer (238).

Aunque la esplenomegalia no es un trastorno muy común en los pacientes con IBD (239), existe la hipótesis mantenida por el grupo del Doctor Calzado (240) de que el absceso esplénico podría ser una de las manifestaciones precursoras a un brote de IBD, de modo que, de acuerdo con la teoría de la recirculación linfocitaria, primero se produciría un episodio de esplenomegalia a consecuencia del absceso esplénico originado por el reclutamiento y maduración de los linfocitos; y después, cuando los linfocitos se trasladaran al intestino, el bazo volvería a su situación basal y la inflamación comenzaría a nivel local.

Los resultados expuestos en este Trabajo Fin de Máster parecen concordar con esa hipótesis, pues en las hembras, donde la inflamación a nivel local es muy significativa, no se observaron indicios de esplenomegalia. Incluso las hembras KO, donde la colitis se inicia de forma muy temprana, tienen un bazo ligeramente más pequeño que el de las hembras WT, donde la patología empieza a manifestarse más tarde.

Por otra parte, se observa que el grupo de machos WT TNBS tienen un bazo significativamente mayor que los ratones KO y que sus respectivos controles (WT

NaCl). De hecho, si se comparan los datos de este estudio con los datos de la “Mice Phenotype Database” creada por “The Jackson Laboratory” (241), se puede comprobar que el porcentaje medio de peso del bazo respecto al peso corporal en machos C57BL/6J de 16 semanas se estima en torno al 0,26%, valor muy próximo al observado en los grupos de machos WT NaCl, KO NaCl y KO TNBS, pero que es casi la mitad del valor observado en machos WT TNBS. Por lo tanto parece que, efectivamente, la reacción inflamatoria en el bazo podría preceder a las manifestaciones clínicas intestinales, ya que, en aquellos grupos donde la respuesta inflamatoria a nivel local se inicia más pronto, se observa un tamaño del bazo normal; mientras que en los grupos donde la respuesta inflamatoria intestinal es más tardía se observa un mayor tamaño en el bazo.

Tomados en conjunto, todos estos datos confirman lo observado hasta el momento, que la ausencia de AM acelera el inicio de la patología y agrava los procesos inflamatorios a nivel macroscópico.

7.2.3. La ausencia de adrenomedulina aumenta de forma significativa las respuestas inflamatorias a nivel de la mucosa y la submucosa

El tubo digestivo tiene una estructura histológica muy característica y bien definida. A partir del esófago, la pared del tubo digestivo se compone de cuatro capas: la mucosa, que engloba al epitelio, a la lámina propia conjuntiva y a la *muscularis mucosae*; la submucosa, formada por tejido conjuntivo y donde se localizan los grandes vasos sanguíneos y linfáticos, el plexo nervioso de Meissner y el GALT (formado principalmente por las placas de Peyer); la muscular propia, formada en su mayor parte por músculo liso que se distribuye en dos capas entre las cuales encontramos el plexo de Auerbach; y finalmente la capa serosa, compuesta por tejido conjuntivo y el mesotelio peritoneal (238).

Los resultados de la evaluación a nivel microscópico del daño histológico causado por el TNBS son bastante similares a los observados por el grupo de Kono *et al.* (209). La instilación de este compuesto químico causa un aumento significativo del grosor de la mucosa del colon en todos los grupos tratados, tanto ratones WT como KO, y de ambos sexos, en comparación con sus respectivos controles.

Además, en este Trabajo Fin de Máster se demuestra que en ausencia de AM endógena se produce un daño a nivel histológico mayor, que de nuevo vuelve a ser más pronunciado en el grupo de hembras, y que es concordante con los signos clínicos y macroscópicos observados. Los machos KO TNBS presentaron una mucosa significativamente más gruesa, un 23% más grueso de media, que los WT TNBS. Y en

las hembras KO tratadas, se observó que la mucosa era aproximadamente un 45% de media más gruesa que la mucosa de las hembras WT TNBS.

Por otro lado, en ausencia de AM no solo se produce un engrosamiento significativo de la mucosa, sino que en la mayoría de los animales KO que recibieron el tratamiento con TNBS se observan extensas zonas de infiltrados de linfocitos y de exudados inflamatorios que destruyen por completo la microarquitectura del colon. Estos resultados no se observaron en el grupo WT, donde por el contrario, lo que se aprecian son focos aislados y pequeños de infiltración, pero se mantiene la estructura histológica característica del tejido.

Estas diferencias observadas a nivel histológico explican los resultados macroscópicos de severidad clínica e inflamación local presentados anteriormente. Al destruirse la mucosa intestinal se pierden los enterocitos, células que, además de actuar como barrera física de la mucosa, se encargan fundamentalmente de la absorción de agua, iones y vitaminas secretadas a la luz por la microbiota intestinal (además, el proceso de absorción de agua es el que origina que las heces tomen consistencia y se vuelvan sólidas); se pierden las células caliciformes que secretan el moco que protege la mucosa del contenido luminal; y se altera la microbiota intestinal. Por eso, los animales KO tienen más diarrea, sangre en heces, signos de anorexia y deshidratación, y su estado general es peor que el de los animales WT.

Tras observar las preparaciones histológicas, pudo comprobarse que en algunos animales la infiltración de hacía extensiva a la submucosa, donde también había acumulación de linfocitos y restos celulares, aunque en menor grado que en la mucosa. Por eso, se decidió medir también esta capa histológica para comprobar si los cambios observados eran significativos. El grupo de Ito *et al.* (213) ya había descrito en un modelo de ratones KO para el gen del IFN- γ un aumento significativo en el grosor de la submucosa de los animales que manifestaban signos clínicos de colitis aguda.

En el caso de este parámetro, y de forma contraria a lo publicado por Ito *et al.* (213), no se observó que la instilación con TNBS causase un aumento significativo del grosor de la submucosa en ninguno de los grupos WT TNBS. Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de machos KO y WT tratados, pero sí entre los grupos de hembras. En las hembras, la presencia de AM endógena es capaz de prevenir el aumento del grosor de la submucosa, de modo que las hembras KO tienen una submucosa engrosada en un 177,35% de media respecto a las hembras que mantienen sus niveles de AM intactos.

Por tanto, la AM endógena protege el colon a nivel microscópico durante un episodio de colitis aguda, disminuyendo los infiltrados de linfocitos y preservando la

microarquitectura del tejido, de modo que este puede seguir cumpliendo con sus funciones fisiológicas normales. En concordancia con lo observado a nivel macroscópico, las hembras KO TNBS presentan el mayor daño histológico, con las infiltraciones de linfocitos más extensas, lo que refuerza la hipótesis de un posible control de la AM sobre la actividad de los linfocitos mediada por los estrógenos. Si tomamos en consideración todos los datos presentados hasta el momento, parece obvio que la AM endógena actúa como un potente inmunomodulador, protegiendo al organismo frente a una respuesta inmunitaria aberrante, evitando una activación masiva de linfocitos y retrasando su reclutamiento hacia los tejidos periféricos desde el bazo.

Un resultado inesperado en este trabajo, y que no se encuentra mencionado en ningún artículo de la bibliografía consultada, fue la observación de placas de Peyer de gran tamaño (más de 100 000 μm^2) en los animales control de ambos grupos, siendo especialmente numerosas entre los animales KO que habían recibido NaCl.

Las placas de Peyer son nódulos linfoides secundarios que pertenecen al GALT. En el intestino grueso, y especialmente en el apéndice, son bastante abundantes y se localizan primordialmente en la submucosa, aunque en algunos casos pueden atravesar la *muscularis mucosae* y la lámina propia de la mucosa, invadiendo parte de esta otra capa del intestino (238). Dentro de las placas de Peyer, el tipo celular predominante son los linfocitos B, aunque entre el 10 y el 30% del total de linfocitos son linfocitos T, y también hay macrófagos y células presentadoras de antígenos (242). Se sabe que de 4 a 7 días después de la estimulación de una respuesta inmunitaria, los linfocitos B activados emigran desde el bazo hasta las placas de Peyer, momento en el cual estas adquieren un gran desarrollo (242). La penetración de los linfocitos a estos órganos linfoides periféricos tiene lugar desde las vénulas poscapilares. Las placas de Peyer tienen una forma muy característica consistente en una corona de varias capas de linfocitos y un centro claro (centro germinal) donde se produce la transformación de los linfocitos B activados que han llegado mediante recirculación linfocitaria en inmunoblastos, protoplasmocitos y células plasmáticas sucesivamente (242).

La diferencia en el número de placas de Peyer de gran tamaño observadas en nuestro estudio confirma una vez más el papel inmunoregulator de la AM, ya descrito desde 2006 por el grupo de Zudaire *et al.* (94). En el 87,71% de la muestra de machos KO control se observaron estas placas de Peyer de gran tamaño, frente al 50% de observaciones en el grupo de machos WT control. Dentro del grupo de hembras, los resultados se mantienen en la misma línea, de modo que se observaron placas de Peyer de gran tamaño en el 87,5% de la muestra de hembras KO NaCl, mientras que

en las hembras WT control solo se observaron en el 57,4% de los casos. Las diferencias en el número de observaciones no llegaron a ser estadísticamente significativas, probablemente a causa del bajo tamaño muestral analizado. Sin embargo, parece obvio que existe una tendencia, y que la AM endógena es capaz de modular y controlar el reclutamiento linfocitario a las placas de Peyer desde los órganos linfoides secundarios como el bazo.

Aunque la evaluación del daño histológico a nivel del colon de todos los grupos de estudio reveló resultados muy interesantes, y en algunos casos inesperados, deben reconocerse las limitaciones de un estudio histomorfométrico a la hora de extrapolar resultados a la población general.

Para realizar estimaciones cuantitativas en los tejidos de forma fiable e insesgada se deben emplear técnicas de estereología (243). Los métodos estereológicos permiten extraer gran cantidad de información tridimensional (número de partículas, longitud, superficie y volumen) a partir del estudio de preparaciones histológicas en dos dimensiones (244) siguiendo métodos estadísticos. Los estudios histomorfométricos, como el realizado en este Trabajo Fin de Máster, ofrecen una información más limitada, pudiendo medirse solo parámetros bidimensionales, y la interpretación de los resultados debe ser más cautelosa.

Sin embargo, por limitaciones de material y del propio estudio no pudo realizarse un análisis estereológico de las muestras. En cuanto a las limitaciones del material, se debe tener presente que para realizar este tipo de estudios, el procesamiento de los tejidos debe ser ligeramente diferente al convencional; de modo que las muestras queden embebidas en unas resinas especiales, en lugar de en parafina; y es necesario seguir un protocolo sistematizado a la hora de cortar los bloques (244). Y en lo referente a las limitaciones del propio estudio, el hecho de tener que destinar parte del colon a análisis bioquímicos, hizo que se perdiese parte del material para el estudio histológico; y en estereología es fundamental conocer el volumen total del tejido para poder realizar las estimaciones estadísticas oportunas (243).

A pesar de las limitaciones, el protocolo sistemático seguido a la hora de recoger las mediciones, y el alto número de datos en cada grupo proporcionan fiabilidad a los resultados morfométricos obtenidos en este trabajo.

7.2.4. La ausencia de adrenomedulina parece causar un aumento moderado de infiltrados de tipo leucocitario a nivel local

En este trabajo se midió la actividad de la enzima MPO como un indicador indirecto de la presencia de infiltrados de tipo leucocitario, especialmente de neutrófilos, a nivel local. Recordemos que la MPO es una enzima de la superfamilia de

las peroxidasas que usan como cofactor el grupo hemo y que se almacena dentro de los gránulos azurófilos de los leucocitos (212). La MPO se detecta dentro de los neutrófilos, monocitos y macrófagos que están en circulación, y cuando se produce una reacción de tipo inflamatorio puede detectarse su actividad en el tejido inflamado si se está produciendo una extravasación de leucocitos desde los vasos sanguíneos (238).

Sorprendentemente, los niveles de MPO detectados en nuestro estudio mediante métodos fluorimétricos son muy inferiores a los descritos por otros grupos como el de González-Rey *et al.* (188), el de Talero *et al.* (189) o el de Ito *et al.* (213). Además, la variabilidad intra-grupos fue muy elevada y la actividad de MPO no seguía una distribución normal, de forma contraria al comportamiento de los otros parámetros evaluados en este trabajo.

En un primer momento podría pensarse que esto se debe a un fallo en la metodología, o bien durante el procesamiento de las muestras que condujo a una destrucción de la MPO, o durante el ensayo fluorimétrico. Sin embargo, ambas teorías pueden ser descartadas.

Los resultados obtenidos en la medición de los niveles totales de proteína en los homogenizados de colon mediante la técnica del BSA fueron normales, por lo que no existe ningún indicio de que las muestras fuesen mal procesadas. Si el resto de proteínas presentes en el tejido se preservaron, es de suponer que también se conservó la MPO.

Por otro lado, tanto los controles positivos, como los resultados de la recta patrón, en el ensayo fluorimétrico para cuantificar la actividad de MPO presente en el tejido fueron concordantes con los esperados (según las indicaciones del fabricante del kit). Por lo que tampoco existió ningún problema en este punto.

De acuerdo con esto, podemos concluir que los niveles de MPO en nuestro estudio de colitis aguda inducida por TNBS son realmente muy inferiores a los descritos hasta el momento; aunque no podemos determinar la causa de este fenómeno con exactitud. Sin embargo, sí podemos corroborar que estos resultados son concordantes con los observados en las preparaciones histológicas, donde, como ya se señaló en el apartado de resultados, el tipo celular predominante en todos los infiltrados observados era el de los linfocitos.

Dentro del grupo de machos, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, ni entre grupos tratados y control, ni entre genotipos. En la mitad de los machos WT TNBS se detectó una actividad de MPO igual o inferior a 2,10 pmol/min/mL; mientras que en la mitad de los machos KO TNBS se detectó una actividad de MPO igual o inferior a 2,71 pmol/min/mL. Parece por tanto que sí existe

una cierta tendencia a observar niveles de actividad de MPO superiores dentro del grupo de ratones KO; es probable que la elevada variabilidad intra-grupos sea la causa de que esta diferencia no alcance la significación. De forma inesperada, el grupo de machos en el que se observó una mayor actividad de MPO fue en el de KO NaCl.

En el grupo de hembras, la instilación de TNBS sí causó un aumento significativo de la actividad de MPO en los homogenizados de colon de hembras WT frente a sus controles, de acuerdo a lo descrito por otros grupos que estudian modelos de colitis aguda (189); sin embargo, en el grupo de hembras KO la diferencia no alcanzó la significación. Tampoco fueron significativas las diferencias observadas entre hembras WT y KO tratadas con TNBS, a pesar de que los niveles de actividad de MPO fueron mayores en el grupo de hembras KO. De nuevo es probable que la alta variabilidad dentro de los grupos sea la responsable de que las diferencias no lleguen a ser significativas. Sorprendentemente, sí se observó un aumento significativo de la actividad de MPO en los homogenizados de colon de hembras KO control frente a las hembras WT control.

Este hallazgo inesperado de niveles de actividad de MPO tan elevados dentro de los dos grupos de ratones KO controles parece ir en contra de los datos obtenidos hasta el momento para estos dos grupos, puesto que en los controles no se aprecian signos clínicos de colitis, ni tampoco inflamación macroscópica o microscópica a nivel local.

Como se ha explicado anteriormente, la AM controla y lleva a cabo una gran variedad de acciones fisiológicas de gran importancia en todo el sistema cardiovascular (151), y es capaz de unirse de forma específica a receptores presentes en la membrana de las células endoteliales modificando su actividad y reforzando sus uniones (153). De hecho, en modelos de KO embrionarios ya se ha observado que la ausencia total de AM, de PAMP, o de sus receptores, causa fenotipos asociados a hiperpermeabilidad vascular, con fragilidad vascular, hemorragias extensas y edemas severos (140-143). Y estudios muy recientes de nuestro grupo (144) han confirmado que la actividad de la AM, a través de su receptor RAMP2, es clave y determinante para la integridad vascular y la homeostasis sistémica, también en ratones adultos.

El hecho de que la ausencia de la AM aumente los niveles de actividad de MPO en los homogenizados de colon de los animales KO control podría explicarse a la vista de lo que acaba de exponerse. La deficiencia de AM podría alterar la integridad vascular y provocar una mayor permeabilidad de los vasos del colon, permitiendo la extravasación de células sanguíneas que de otro modo no tendrían que estar presentes en los tejidos.

Por último, mencionar que a la vista de los resultados obtenidos en los controles KO, en este Trabajo Fin de Máster no puede concluirse de forma fiable si la mayor infiltración leucocitaria observada en los grupos con el gen de la AM deletado tratados con TNBS es producto de la colitis aguda, de algún tipo de malformación a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos, o de una combinación de ambas causas.

7.3. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

7.3.1. Estudios sobre la relación entre la adrenomedulina y la microbiota intestinal en la colitis aguda

Este es un estudio que nos habría gustado incluir en el presente trabajo, pero que por motivos de tiempo ha resultado imposible.

A día de hoy se sabe que la microbiota entérica interactúa de forma íntima con la mucosa intestinal y es esencial para el correcto desarrollo de las funciones fisiológicas digestivas (21). La alteración de la microbiota intestinal y el sobrecrecimiento de patobiontes en el colon son factores claves en el desarrollo de las patologías intestinales (1).

En un estudio piloto realizado en nuestro laboratorio (datos no publicados) para analizar la composición de la flora bacteriana presente en condiciones fisiológicas normales en las heces de 28 ratones adultos; de las mismas líneas usadas en este trabajo (8 machos y 8 hembras WT, 6 machos y 6 hembras KO) a los que se les había administrado a las 9 semanas una solución de doxiciclina a la misma dosis, 2 mg/mL en el agua de bebida durante 14 días; se comprobó que la ausencia de AM ocasiona cambios significativos en la microbiota intestinal de las hembras KO. Tras recoger de forma no invasiva las heces en fresco de cada ratón se procedió a analizar mediante PCR a tiempo real con cebadores específicos los cuatro órdenes predominantes de las bacterias del intestino: Enterobacteriales, Lactobacillales, Bacteroidales y Clostridiales (245). Los resultados se confirmaron posteriormente mediante análisis metagenómicos realizados por un laboratorio independiente. Los datos de las PCR demuestran que la deficiencia de AM en las hembras KO se asocia con una reducción significativa en los órdenes de Bacteroidales y Clostridiales en comparación con el grupo de hembras WT. Además, se observó un aumento significativo en el orden de Enterobacteriales de las hembras KO al compararlas tanto con las hembras WT, como con los machos KO. Sin embargo, no se observaron cambios significativos entre la composición bacteriana de la flora intestinal de los machos.

Este es el primer estudio en el que se demuestra los efectos de la ausencia de AM endógena sobre la composición de la microbiota; que apuntan a un efecto importante de este péptido, cuyo efecto antimicrobiano ya había sido descrito por

Zudaire *et al.* (94), en el control de las bacterias intestinales. Nuevamente, los efectos observados fueron más relevantes en las hembras, demostrando una nueva actividad que parecer ser diferente en función del sexo.

Por eso se necesitan más estudios que permitan profundizar en el conocimiento del impacto en el desarrollo y/o progresión de las enfermedades intestinales que puede causar la deficiencia de AM, no solo a través de los efectos descritos en el presente Trabajo Fin de Máster, sino también a través de su efecto sobre la composición de la microbiota intestinal.

Con tal propósito, sería necesario repetir el modelo de colitis aguda inducido por TNBS que se ha empleado en este estudio, añadiendo la composición de la microbiota como un nuevo parámetro a examinar. Para ello habría que recoger muestras de heces frescas de todos los ratones de forma no invasiva antes de la instilación intra-rectal de TNBS o NaCl, y de nuevo al final del procedimiento, recogiendo las muestras en el momento de extracción y limpieza del colon, comparando los resultados obtenidos entre los grupos WT con el gen de la AM intacto y los animales KO.

7.3.2. Traslación de resultados: posible relación entre niveles bajos de adrenomedulina y un peor pronóstico y respuestas al tratamiento en pacientes con IBD

A pesar del amplio espectro de fármacos disponibles a día de hoy para los pacientes de IBD, se sabe que un alto porcentaje no responde de forma adecuada a los tratamientos. Entre el 20 y 25% de los pacientes europeos afectados por estas patologías afirman no experimentar mejorías y padecer síntomas continuos a pesar de los tratamientos recibidos (7). Además, de acuerdo con datos epidemiológicos procedentes de los países nórdicos, aunque los pacientes respondan de forma adecuada al tratamiento en primera instancia, el 78% de los pacientes con CU (46) y el 93,1% de los pacientes con EC (48) acaba por desarrollar tolerancia a los fármacos y a manifestar nuevos brotes severos de enfermedad en los primeros 5 años tras el diagnóstico; siendo el porcentaje de nuevos brotes más alto entre las mujeres y los adultos jóvenes. Sin embargo, hasta ahora ha sido imposible determinar el porqué de estos hechos.

En los últimos años se han identificado numerosas mutaciones en las proximidades del gen de la AM (100-103). En 2011 el grupo de Cheung *et al.* (104) identificó un SNP en el gen de la AM, el rs4910118, que provoca que los individuos portadores homocigotos del alelo menor tengan unos niveles de AM circulante significativamente inferiores que los de las personas homocigotas para el alelo mayor

normal. Esto es especialmente interesante, ya que, los portadores del alelo menor podrían considerarse una especie de “modelo Knock-down” para AM en humanos.

Estudios previos publicados por nuestro grupo (108) demostraron que los individuos portadores del alelo menor, y que tienen unos niveles de AM endógenos significativamente más bajos, tienen una probabilidad 4,6 veces menor de desarrollar un tumor a lo largo de su vida que las personas con niveles de AM normales. Estos resultados son concordantes con los observados en estudios de tumorigenicidad con modelos animales en los que la AM se bloquea a nivel sistémico mediante el uso de anticuerpos monoclonales, de forma similar a lo que ocurriría en un modelo KO para AM. En todos estos trabajos, los animales con la AM bloqueada desarrollan menos tumores que sus respectivos controles con niveles de AM normales (246-248).

Este Trabajo Fin de Máster ha probado que los niveles endógenos normales de AM son capaces de proteger a los ratones WT frente a la inducción de una colitis aguda, y que por tanto, la AM presente en el organismo es vital a la hora de proteger el tracto digestivo frente a reacciones inflamatorias aberrantes.

A la vista de todos estos datos, resulta casi inevitable preguntarse si existe una correlación positiva entre ser portador del alelo menor del SNP rs4910118, y por lo tanto poseer niveles de AM significativamente inferiores que los de la población general, y padecer una IBD con una patología especialmente severa que no responde a los tratamientos convencionales.

Mediante un estudio de casos y controles en los que se detectase la presencia o ausencia del alelo menor del SNP mediante la técnica de PCR del doble error (“Double mismatch”) (108) con muestras de ADN genómico extraído de la fracción nucleada de la sangre, podría responderse a esta hipótesis.

7.3.3 Posibles tratamientos farmacológicos basados en el sistema de la adrenomedulina

Hasta ahora el grupo de Ashizuka *et al.* (197, 198) ha demostrado que la administración exógena de AM por vía intravenosa en pacientes con CU refractaria severa a los tratamientos estándar es capaz de inducir el estado de remisión clínica y de acelerar el proceso de reepitelización y regeneración de las áreas ulceradas.

Sin embargo, no debe olvidarse que la AM es un péptido con una infinidad de acciones fisiológicas. Estudios de colitis con modelos murinos ya demostraron que el tratamiento con AM mantenido a largo plazo puede ocasionar efectos secundarios no deseados (189). Y en los primeros casos en pacientes también se ha observado, que aunque leves, la AM administrada exógenamente causa disminuciones en la presión arterial sistémica (198).

Una alternativa a la administración exógena de AM recombinante podría ser tratar de aumentar la actividad de la AM que se haya presente de forma natural en el organismo. En estudios previos de nuestro grupo se consiguió identificar varias moléculas de pequeño tamaño capaces de aumentar o disminuir el efecto fisiológico de la AM (249).

Dados los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster, se deberían estudiar los posibles beneficios de la aplicación de los moduladores positivos de la AM endógena como una terapia alternativa, también basada en esta hormona, para el tratamiento de las enfermedades tipo IBD (250). La principal ventaja del uso de pequeñas moléculas moduladoras es que su producción es mucho más barata y sencilla que la obtención de hormonas recombinantes. Asumiendo que sus efectos terapéuticos podrían ser similares a los obtenidos con el tratamiento de AM vía intravenosa, la elección de su empleo como fármacos de las IBD sería preferente, por ser más económicos de cara a pacientes y sistemas sanitarios.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- 1. La generación de ratones KO para el gen de la AM es posible usando la tecnología Cre/loxP asociada a un sistema de recombinación temporal tet-On, donde la expresión de la recombinasa Cre se induzca tras administrar doxiciclina.
- 2. Una dosis de doxiciclina de 2 mg/mL administrada durante una semana no es suficiente para lograr la recombinación del gen de la AM en todos los órganos, por ello es necesario administrar la solución de doxiciclina durante un período de 14 días.
- 3. El sistema de inducción de la recombinación tet-On presenta el fenómeno de “leaky expression”, es decir, existe una tasa significativa de recombinación basal en ausencia de doxiciclina, aunque no influye para que los ratones tengan un desarrollo embrionario normal.
- 4. Los ratones KO para AM son viables y no presentan ningún tipo de anomalía ni de diferencia fenotípica respecto a sus controles WT, a excepción de un aumento de peso significativo en el caso de los machos.
- 5. En un modelo de colitis aguda causado por la instilación rectal de 3 mg de TNBS, la AM endógena es capaz de retrasar el desarrollo de la patología inflamatoria intestinal y de prevenir la aparición de signos clínicos graves como anorexia, diarrea severa, deshidratación y hemorragias.
- 6. La carencia de AM provoca una mayor inflamación local a nivel macroscópico y acelera la recirculación de linfocitos desde el bazo hasta los órganos linfoides periféricos del colon (placas de Peyer).
- 7. Tras la inducción de la colitis aguda, ante la ausencia total de AM se desencadena una respuesta inflamatoria aberrante que causa infiltraciones de linfocitos extensas, especialmente a nivel de la mucosa del colon, pero también de la submucosa, que acaban por destruir la microarquitectura típica del tejido en criptas; lo cual a su vez impide que este órgano mantenga sus funciones fisiológicas normales y genera una mayor gravedad de los signos clínicos.
- 8. Parece que la ausencia de AM provoca modificaciones a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos, aumentando su permeabilidad y permitiendo la

extravasación de leucocitos al tejido periférico; aunque no haya existido un daño previo que promueva la aparición de estos infiltrados.

- 9. La falta total de AM provoca efectos diferentes entre machos y hembras. En el caso de la colitis, su ausencia provoca efectos mucho más severos y graves en las hembras que en los machos, sugiriendo un papel protector más importante de esta hormona en el sexo femenino.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Leone V, Chang EB, Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2013;48(3):315-21. doi: 10.1007/s00535-013-0777-2. Epub 2013 Mar 12.
2. Ford AC, Moayyedi P, Hanauer SB. Ulcerative colitis. *BMJ.* 2013;346:f432.
3. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005;19 Suppl A:5A-36A.
4. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, et al. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med.* 1994;330(26):1841-5.
5. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987;317(26):1625-9.
6. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(1):110-9.
7. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, -EpiCom E. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis.* 2013;7(4):322-37.
8. Cheifetz AS. Management of active Crohn disease. *Jama.* 2013;309(20):2150-8.
9. 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;142(1):46-54.e42; quiz e30.
10. Rocchi A, Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Feagan B, Panaccione R, et al. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Can J Gastroenterol.* 2012;26(11):811-7.
11. Institute C. Available from: <http://cpmc.coriell.org/v/Report/Demo/UC/DemoNat>.
12. Lovasz BD, Golovics PA, Vegh Z, Lakatos PL. New trends in inflammatory bowel disease epidemiology and disease course in Eastern Europe. *Dig Liver Dis.* 2013;45(4):269-76.
13. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol.* 2013;5:237-47.
14. Matricon J. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease]. *Med Sci (Paris).* 2010;26(4):405-10. doi: 10.1051/medsci/2010264405.
15. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011;43(3):246-52.
16. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(11):2412-9.
17. Ananthakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG, Saeian K. Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: an ecologic analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(5):1138-45.
18. Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(4):524-35.
19. Zallot C, Quilliot D, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet C, Guéant-Rodriguez RM, Freling E, et al. Dietary beliefs and behavior among inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(1):66-72.
20. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut.* 2013;62(10):1505-10.
21. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307(5717):1915-20.
22. Vermeire S, Ferrante M, Rutgeerts P. Recent advances: Personalised use of current Crohn's disease therapeutic options. *Gut.* 2013;62(10):1511-5.
23. Speight RA, Mansfield JC. Drug advances in inflammatory bowel disease. *Clin Med.* 2013;13(4):378-82.
24. Rietdijk ST, D'Haens GR. Recent developments in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis.* 2013;14(6):282-7. doi: 10.1111/751-2980.12048.
25. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EM, Sartor RB, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut.* 2013;62(5):787-96. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302504. Epub 2013 Mar 8.
26. Weinstock JV, Elliott DE. Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. *Int J Parasitol.* 2013;43(3-4):245-51.
27. Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol.* 2008;14(3):354-77.

28. Moshkovska T, Mayberry JF. Duration of treatment with 5-aminosalicylic acid compounds. *World J Gastroenterol.* 2007;13(32):4310-5.
29. Nielsen OH. Sulfasalazine intolerance. A retrospective survey of the reasons for discontinuing treatment with sulfasalazine in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1982;17(3):389-93.
30. Sutherland L, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(2):CD000544.
31. Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(4):590-9; quiz 600.
32. Schroll S, Sarlette A, Ahrens K, Manns MP, Göke M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium in vitro. *Regul Pept.* 2005;131(1-3):1-11.
33. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1133-45.
34. Danese S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L, Rutgeerts P, Reinisch W. Review article: the role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis -- past, present and future. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(9):855-66. doi: 10.1111/apt.12284. Epub 2013 Mar 13.
35. Chang J, Girgis L. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. *Aust Fam Physician.* 2007;36(12):1035-8.
36. Guo Y, Lu N, Bai A. Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update. *Biomed Res Int.* 2013;2013:581631.(doi):10.1155/2013/581631. Epub 2013 Jan 21.
37. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2462-76.
38. Creed TJ, Norman MR, Probert CS, Harvey RF, Shaw IS, Smithson J, et al. Basiliximab (anti-CD25) in combination with steroids may be an effective new treatment for steroid-resistant ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18(1):65-75.
39. Creed TJ, Probert CS, Norman MN, Moorghen M, Shepherd NA, Hearing SD, et al. Basiliximab for the treatment of steroid-resistant ulcerative colitis: further experience in moderate and severe disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(10):1435-42.
40. Plevy S, Salzberg B, Van Assche G, Regueiro M, Hommes D, Sandborn W, et al. A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2007;133(5):1414-22.
41. Sandborn WJ, Colombel JF, Frankel M, Hommes D, Lowder JN, Mayer L, et al. Anti-CD3 antibody visilizumab is not effective in patients with intravenous corticosteroid-refractory ulcerative colitis. *Gut.* 2010;59(11):1485-92.
42. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, Feagan BG, Hanauer SB, Lawrance IC, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2005;353(18):1912-25.
43. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2005;353(4):362-8.
44. Van Assche G, Lewis JD, Lichtenstein GR, Loftus EV, Ouyang Q, Panes J, et al. The London position statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organisation: safety. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(9):1594-602; quiz 3, 603.
45. Rettke H, Staudacher D, Schmid-Büchi S, Habermann I, Spirig R, Rogler G. [Inflammatory bowel diseases: experiencing illness, therapy and care]. *Pflege.* 2013;26(2):109-18.
46. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Sauar J, Kjellefold Ø, Schulz T, et al. Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(7):543-50.
47. Binder V, Hendriksen C, Kreiner S. Prognosis in Crohn's disease--based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen. *Gut.* 1985;26(2):146-50.
48. 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;13(4):481-9.
49. Moradkhani A, Beckman LJ, Tabibian JH. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease: psychosocial, clinical, socioeconomic, and demographic predictors. *J Crohns Colitis.* 2013;7(6):467-73.
50. Otley AR, Griffiths AM, Hale S, Kugathasan S, Pfefferkorn M, Mezoff A, et al. Health-related quality of life in the first year after a diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(8):684-91.
51. Zhang CK, Hewett J, Hemming J, Grant T, Zhao H, Abraham C, et al. The influence of depression on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(8):1732-9.

52. Fuller-Thomson E, Sulman J. Depression and inflammatory bowel disease: findings from two nationally representative Canadian surveys. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(8):697-707.
53. Gradus JL, Qin P, Lincoln AK, Miller M, Lawler E, Sørensen HT, et al. Inflammatory bowel disease and completed suicide in Danish adults. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(12):2158-61.
54. Siegel CA. Review article: explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(1):23-32.
55. Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology.* 2001;121(2):255-60.
56. Present DH. How to do without steroids in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6(1):48-57; discussion 8.
57. Siegel CA. Lost in translation: helping patients understand the risks of inflammatory bowel disease therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(12):2168-72.
58. McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(2):131-7.
59. Trikudanathan S, McMahon GT. Optimum management of glucocorticoid-treated patients. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(5):262-71.
60. Ali T, Lam D, Bronze MS, Humphrey MB. Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Am J Med.* 2009;122(7):599-604.
61. Cravo M, Guerreiro CS, dos Santos PM, Brito M, Ferreira P, Fidalgo C, et al. Risk factors for metabolic bone disease in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(12):2117-24.
62. Lewis NR SB. Guidelines for osteoporosis in inflammatory bowel disease and coeliac disease. 2007; 14:[1-16 pp.].
63. Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet.* 2009;374(9701):1617-25.
64. Dayharsh GA, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Zinsmeister AR, Witzig TE, et al. Epstein-Barr virus-positive lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Gastroenterology.* 2002;122(1):72-7.
65. Torres J, Buche S, Delaporte E, Colombel JF. Skin side effects of inflammatory bowel disease therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(5):1086-98.
66. Singh H, Nugent Z, Demers AA, Bernstein CN. Increased risk of nonmelanoma skin cancers among individuals with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1612-20.
67. Sands BE. The risks and benefits of early immunosuppression and biological therapy. *Dig Dis.* 2012;30 Suppl 3:100-6.
68. Salama M, Lawrance IC. Stevens-Johnson syndrome complicating adalimumab therapy in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15(35):4449-52.
69. Caccaro R, Savarino E, D'Incà R, Sturniolo GC. Noninfectious interstitial lung disease during infliximab therapy: case report and literature review. *World J Gastroenterol.* 2013;19(32):5377-80.
70. Lu DG, Ji XQ, Liu X, Li HJ, Zhang CQ. Pulmonary manifestations of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):133-41.
71. Dave M, Purohit T, Razonable R, Loftus EV. Opportunistic infections due to inflammatory bowel disease therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(1):196-212.
72. Ford AC, Peyrin-Biroulet L. Opportunistic infections with anti-tumor necrosis factor- α therapy in inflammatory bowel disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(8):1268-76.
73. Hofland RW, Thijsen SF, Verhagen MA, Schenk Y, Bossink AW. Tuberculosis during TNF- α inhibitor therapy, despite screening. *Thorax.* 2013;68(11):1079-80.
74. Azzopardi N, Ellul P. Risk factors for osteoporosis in Crohn's disease: infliximab, corticosteroids, body mass index, and age of onset. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(6):1173-8.
75. Cornish J, Tan E, Teare J, Teoh TG, Rai R, Clark SK, et al. A meta-analysis on the influence of inflammatory bowel disease on pregnancy. *Gut.* 2007;56(6):830-7.
76. Inlyckyji A, Blanchard JF, Rawsthorne P, Bernstein CN. Perianal Crohn's disease and pregnancy: role of the mode of delivery. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(11):3274-8.
77. Reddy D, Murphy SJ, Kane SV, Present DH, Kornbluth AA. Relapses of inflammatory bowel disease during pregnancy: in-hospital management and birth outcomes. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(5):1203-9.
78. Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M. Pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease following exposure to 5-aminosalicylic acid drugs: a meta-analysis. *Reprod Toxicol.* 2008;25(2):271-5.
79. Ng SW, Mahadevan U. Management of inflammatory bowel disease in pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9(2):161-73; quiz 74. doi: 10.1586/eci.12.103.

80. Gisbert JP, Chaparro M. Safety of anti-TNF agents during pregnancy and breastfeeding in women with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(9):1426-38.
81. Rodd C, Lang B, Ramsay T, Alos N, Huber AM, Cabral DA, et al. Incident vertebral fractures among children with rheumatic disorders 12 months after glucocorticoid initiation: a national observational study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(1):122-31.
82. Burnham JM. Inflammatory diseases and bone health in children. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(5):548-53.
83. Ezri J, Marques-Vidal P, Nydegger A. Impact of disease and treatments on growth and puberty of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion.* 2012;85(4):308-19.
84. Culver EL, Travis SP. How to manage the infectious risk under anti-TNF in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets.* 2010;11(2):198-218.
85. Comar M, Delbue S, Lepore L, Martelossi S, Radillo O, Ronfani L, et al. Latent viral infections in young patients with inflammatory diseases treated with biological agents: prevalence of JC virus genotype 2. *J Med Virol.* 2013;85(4):716-22.
86. Nakase H, Chiba T. TNF-alpha is an important pathogenic factor contributing to reactivation of cytomegalovirus in inflamed mucosa of colon in patients with ulcerative colitis: lesson from clinical experience. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(4):550-1.
87. Fuchs I, Abu-Shakra M, Sikuler E. Hepatitis B and C reactivation with tumor necrosis factor inhibitors: synopsis and interpretation of screening and prophylaxis recommendations. *Isr Med Assoc J.* 2013;15(6):303-7.
88. Bernheim O, Colombel JF, Ullman TA, Laharie D, Beaugerie L, Itzkowitz SH. The management of immunosuppression in patients with inflammatory bowel disease and cancer. *Gut.* 2013;62(11):1523-8.
89. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis.* 2010;4(1):28-62.
90. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ, Gastroenterology PPCoACo. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(2):465-83; quiz 4, 84.
91. Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(1):112-24.
92. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(2):553-60.
93. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev.* 2000;21(2):138-67.
94. Zudaire E, Portal-Núñez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):237-44.
95. Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol.* 2004;56(1):5-27.
96. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* 2004;556(1-3):53-8.
97. Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem.* 2004;279(8):7264-74.
98. Lopez J, Martinez A. Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 221.* 2002;221:1-92.
99. Perez-Castells J, Martin-Santamaria S, Nieto L, Ramos A, Martinez A, de Pascual-Teresa B, et al. Structure of Micelle-Bound Adrenomedullin: A First Step Toward the Analysis of Its Interactions with Receptors and Small Molecules. *Biopolymers.* 2012;97(1):45-53.
100. Ishimitsu T, Hosoya K, Tsukada K, Minami J, Futoh Y, Ono H, et al. Microsatellite DNA polymorphism of human adrenomedullin gene in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension.* 2001;38(1):9-12.
101. Ishimitsu T, Tsukada K, Minami J, Ono H, Ohru M, Hino J, et al. Microsatellite DNA polymorphism of human adrenomedullin gene in type 2 diabetic patients with renal failure. *Kidney Int.* 2003;63(6):2230-5.
102. Ong KL, Tso AW, Leung RY, Cherny SS, Sham PC, Lam TH, et al. A genetic variant in the gene encoding adrenomedullin predicts the development of dysglycemia over 6.4 years in Chinese. *Clin Chim Acta.* 2011;412(3-4):353-7. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.007. Epub Nov 12.
103. Glubb DM, McHugh PC, Deng X, Joyce PR, Kennedy MA. Association of a functional polymorphism in the adrenomedullin gene (ADM) with response to paroxetine. *Pharmacogenomics J.* 2010;10(2):126-33. doi: 10.1038/tj.2009.33. Epub Jul 28.

104. Cheung BM, Ong KL, Tso AW, Leung RY, Cherny SS, Sham PC, et al. Plasma adrenomedullin level is related to a single nucleotide polymorphism in the adrenomedullin gene. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(4):571-7. doi: 10.1530/EJE-11-0513. Epub 2011 Jul 28.
105. Hirose T, Totsune K, Nakashige Y, Metoki H, Kikuya M, Ohkubo T, et al. Influence of adrenomedullin 2/intermedin gene polymorphism on blood pressure, renal function and silent cerebrovascular lesions in Japanese: the Ohasama study. *Hypertens Res.* 2011;34(12):1327-32.
106. Wong HK, Ong KL, Leung RY, Lam TH, Thomas GN, Lam KS, et al. A single nucleotide polymorphism of interleukin-6 gene is related to plasma adrenomedullin levels. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(4):504-9. doi: 10.1111/cen.12078. Epub 2013 Apr 6.
107. Wong HK, Ong KL, Leung RY, Cheung TT, Xu A, Lam TH, et al. Plasma level of adrenomedullin is influenced by a single nucleotide polymorphism in the adiponectin gene. *PLoS One.* 2013;8(8):e70335. doi: 10.1371/journal.pone.0070335. Print 2013.
108. Martinez-Herrero S, Martinez A. Cancer protection elicited by a single nucleotide polymorphism close to the adrenomedullin gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E807-10. doi: 10.1210/jc.2012-4193. Epub 2013 Feb 28.
109. Shimosawa T, Fujita T. Adrenomedullin as a potent antioxidative and antiatherosclerotic substance. *Drug News Perspect.* 2005;18(3):185-9.
110. Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pío R, An WG, Neckers L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000;14(6):848-62.
111. Pio R, Elsasser TH, Martinez A, Cuttitta F. Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microscopy Research and Technique.* 2002;57(1):23-7.
112. Dupuis J, Caron A, Ruël N. Biodistribution, plasma kinetics and quantification of single-pass pulmonary clearance of adrenomedullin. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(1):97-102.
113. Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochemical Journal.* 2004;383:413-8.
114. Juaneda C, Dumont Y, Chabot JG, Fournier A, Quirion R. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol.* 2003;474(2-3):165-74.
115. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, et al. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):233-46.
116. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998;393(6683):333-9.
117. Qi T, Christopoulos G, Bailey RJ, Christopoulos A, Sexton PM, Hay DL. Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function. *Mol Pharmacol.* 2008;74(4):1059-71.
118. Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol Endocrinol.* 2007;21(4):783-96.
119. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, et al. Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(9):4412-7.
120. Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckström M, Tóth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation.* 1998;97(11):1062-70.
121. Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, et al. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res.* 2002;91(7):618-25.
122. Kureishi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Nakano T, Kanaide H. Adrenomedullin decreases both cytosolic Ca²⁺ concentration and Ca(2+)-sensitivity in pig coronary arterial smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212(2):572-9.
123. Ikeda U, Kanbe T, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Adrenomedullin augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *Circulation.* 1996;94(10):2560-5.
124. Shimosawa T, Matsui H, Xing G, Itakura K, Ando K, Fujita T. Organ-protective effects of adrenomedullin. *Hypertens Res.* 2003;26 Suppl:S109-12.
125. Looi YH, Kane KA, McPhaden AR, Wainwright CL. Adrenomedullin acts via nitric oxide and peroxynitrite to protect against myocardial ischaemia-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 2006;148(5):599-609.

126. Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, et al. Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension*. 2000;36(1):83-8.
127. Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272(39):24125-8.
128. Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, et al. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(11):6823-6.
129. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, et al. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest*. 1999;104(5):647-56.
130. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, et al. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res*. 2001;89(1):63-70.
131. Fernandez-Sauze S, Delfino C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin PM, et al. Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int J Cancer*. 2004;108(6):797-804.
132. Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, et al. Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation*. 2004;109(2):242-8.
133. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest*. 2008;118(1):40-50.
134. Parameswaran N, Nambi P, Brooks DP, Spielman WS. Regulation of glomerular mesangial cell proliferation in culture by adrenomedullin. *Eur J Pharmacol*. 1999;372(1):85-95.
135. Oehler MK, Norbury C, Hague S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene*. 2001;20(23):2937-45.
136. Shichiri M, Hirata Y. Regulation of cell growth and apoptosis by adrenomedullin. *Hypertens Res*. 2003;26 Suppl:S9-14.
137. Kano H, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ikeda M, et al. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1996;14(2):209-13.
138. Iwasaki H, Eguchi S, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 1998;139(8):3432-41.
139. Iwasaki H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin stimulates proline-rich tyrosine kinase 2 in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 2001;142(2):564-72.
140. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation*. 2001;104(16):1964-71.
141. Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, et al. Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation*. 2002;105(1):106-11.
142. Dackor RT, Fritz-Six K, Dunworth WP, Gibbons CL, Smithies O, Caron KM. Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the calcitonin receptor-like receptor gene. *Mol Cell Biol*. 2006;26(7):2511-8.
143. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, et al. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest*. 2008;118(1):29-39.
144. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, et al. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation*. 2013;127(7):842-53. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000756. Epub 2013 Jan 25.
145. Dackor R, Fritz-Six K, Smithies O, Caron K. Receptor activity-modifying proteins 2 and 3 have distinct physiological functions from embryogenesis to old age. *J Biol Chem*. 2007;282(25):18094-9.
146. Plück A. Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system. *Int J Exp Pathol*. 1996;77(6):269-78.
147. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn*. 2006;235(3):759-67.
148. Owen C, Czopek A, Agouni A, Grant L, Judson R, Lees EK, et al. Adipocyte-specific protein tyrosine phosphatase 1B deletion increases lipogenesis, adipocyte cell size and is a minor regulator of glucose homeostasis. *PLoS One*. 2012;7(2):e32700.
149. Fernandez AP, Serrano J, Tessarollo L, Cuttitta F, Martinez A. Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(34):12581-6.

150. Julian M, Cacho M, Garcia MA, Martin-Santamaria S, de Pascual-Teresa B, Ramos A, et al. Adrenomedullin: a new target for the design of small molecule modulators with promising pharmacological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;40(8):737-50.
151. Nicholls MG. Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1247-53.
152. Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, et al. Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat. *Hypertension*. 1999;33(2):689-93.
153. Wangenstein R, Quesada A, Sainz J, Duarte J, Vargas F, Osuna A. Role of endothelium-derived relaxing factors in adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Eur J Pharmacol*. 2002;444(1-2):97-102.
154. Yang BC, Lippton H, Gumusel B, Hyman A, Mehta JL. Adrenomedullin dilates rat pulmonary artery rings during hypoxia: role of nitric oxide and vasodilator prostaglandins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28(3):458-62.
155. Nishikimi T, Yoshihara F, Mori Y, Kangawa K, Matsuoka H. Cardioprotective effect of adrenomedullin in heart failure. *Hypertens Res*. 2003;26 Suppl:S121-7.
156. Wong HK, Cheung TT, Cheung BM. Adrenomedullin and cardiovascular diseases. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2012;1(5).
157. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kangawa K, Nakao K. Adrenomedullin in cardiovascular disease: a useful biomarker, its pathological roles and therapeutic application. *Curr Protein Pept Sci*. 2013;14(4):256-67.
158. Jougasaki M, Wei CM, Aarhus LL, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 2):F657-63.
159. Nishikimi T. Adrenomedullin in the kidney-renal physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem*. 2007;14(15):1689-99.
160. Samson WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:363-89.
161. Zudaire E, Cuttitta F, Martínez A. Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul Pept*. 2003;112(1-3):121-30.
162. Marinoni E, Di Iorio R, Villaccio B, Letizia C, Aragona C, Schimberni M, et al. Follicular fluid adrenomedullin concentrations in spontaneous and stimulated cycles: relationship to ovarian function and endothelin-1 and nitric oxide. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):125-8.
163. Kobayashi K, Kubota T, Aso T, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Immunoreactive adrenomedullin (AM) concentration in maternal plasma during human pregnancy and AM expression in placenta. *Eur J Endocrinol*. 2000;142(6):683-7.
164. Garayoa M, Bodegas E, Cuttitta F, Montuenga LM. Adrenomedullin in mammalian embryogenesis. *Microsc Res Tech*. 2002;57(1):40-54.
165. Hayashi KG, Hosoe M, Sakumoto R, Takahashi T. Temporo-spatial expression of adrenomedullin and its receptors in the bovine placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:62.(doi):10.1186/477-7827-11-62.
166. Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y, Yamashita A, Sumiyoshi A, Asada Y. Immunohistological localization and possible functions of adrenomedullin. *Hypertens Res*. 2003;26 Suppl:S33-40.
167. Rossowski WJ, Cheng BL, Jiang NY, Coy DH. Examination of somatostatin involvement in the inhibitory action of GIP, GLP-1, amylin and adrenomedullin on gastric acid release using a new SRIF antagonist analogue. *Br J Pharmacol*. 1998;125(5):1081-7.
168. Serrano J, Alonso D, Fernández AP, Encinas JM, López JC, Castro-Blanco S, et al. Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech*. 2002;57(2):76-90.
169. Kis B, Abrahám CS, Deli MA, Kobayashi H, Niwa M, Yamashita H, et al. Adrenomedullin, an autocrine mediator of blood-brain barrier function. *Hypertens Res*. 2003;26 Suppl:S61-70.
170. Saita M, Shimokawa A, Kunitake T, Kato K, Hanamori T, Kitamura K, et al. Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats. *Am J Physiol*. 1998;274(4 Pt 2):R979-84.
171. Miyashita K, Itoh H, Arai H, Suganami T, Sawada N, Fukunaga Y, et al. The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential. *Endocrinology*. 2006;147(4):1642-53.
172. Fernandez AP, Serrano J, Martinez-Murillo R, Martinez A. Lack of Adrenomedullin in the Central Nervous System Results in Apparently Paradoxical Alterations on Pain Sensitivity. *Endocrinology*. 2010;151(10):4908-15.
173. Martínez A, Elsasser TH, Muro-Cacho C, Moody TW, Miller MJ, Macri CJ, et al. Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: a potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology*. 1997;138(12):5597-604.

174. Chen YX, Li CS. Prognostic value of adrenomedullin in septic patients in the ED. *Am J Emerg Med.* 2013;31(7):1017-21.
175. Martinez A. A new family of angiogenic factors. *Cancer Letters.* 2006;236(2):157-63.
176. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, et al. Vascular Endothelial Adrenomedullin-RAMP2 System Is Essential for Vascular Integrity and Organ Homeostasis. *Circulation.* 2013;127(7):842-53.
177. Garcia-Honduvilla N, Cifuentes A, Manuel Bellon J, Bujan J, Martinez A. The angiogenesis promoter, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), improves healing in both normoxic and ischemic wounds either alone or in combination with autologous stem/progenitor cells. *Histology and Histopathology.* 2013;28(1):115-25.
178. Fukuda K, Tsukada H, Oya M, Onomura M, Kodama M, Nakamura H, et al. Adrenomedullin promotes epithelial restitution of rat and human gastric mucosa in vitro. *Peptides.* 1999;20(1):127-32.
179. Lainchbury JG, Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormonal, and renal effects of short-term adrenomedullin infusion in healthy volunteers. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2000;85(3):1016-20.
180. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Oya H, Kyotani S, et al. Haemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Heart.* 2000;84(6):653-8.
181. Nagaya N, Goto Y, Satoh T, Sumida H, Kojima S, Miyatake K, et al. Intravenous adrenomedullin in myocardial function and energy metabolism in patients after myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 2002;39(5):754-60.
182. Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Hemodynamic, hormone, and urinary effects of adrenomedullin infusion in essential hypertension. *Hypertension.* 2000;36(4):588-93.
183. Troughton RW, Frampton CM, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Differing thresholds for modulatory effects of adrenomedullin infusion on haemodynamic and hormone responses to angiotensin II and adrenocorticotrophic hormone in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond).* 2001;101(1):103-9.
184. Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, Nagaya N, Noguchi T, Yamada N, et al. The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;56(4):413-9.
185. Nagaya N, Satoh T, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki F, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 2000;101(5):498-503.
186. Ashizuka S, Ishikawa N, Kato J, Yamaga J, Inatsu H, Eto T, et al. Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides.* 2005;26(12):2610-5. Epub 005 Jun 23.
187. Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H, Kitamura K. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol.* 2009;53(10):573-81. doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00159.x.
188. Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut.* 2006;55(6):824-32. Epub 2006 Jan 9.
189. Talero E, Sanchez-Fidalgo S, de la Lastra CA, Illanes M, Calvo JR, Motilva V. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides.* 2008;29(11):2001-12. doi: 10.1016/j.peptides.2008.07.013. Epub Jul 29.
190. Talero E, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Illanes M, Motilva V. Role of Different Inflammatory and Tumor Biomarkers in the Development of Ulcerative Colitis-associated Carcinogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2011;17(3):696-710.
191. Talero E, Alvarez de Sotomayor M, Sanchez-Fidalgo S, Motilva V. Vascular contribution of adrenomedullin to microcirculatory improvement in experimental colitis. *Eur J Pharmacol.* 2011;670(2-3):601-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.09.032. Epub Sep 19.
192. MacManus CF, Campbell EL, Keely S, Burgess A, Kominsky DJ, Colgan SP. Anti-inflammatory actions of adrenomedullin through fine tuning of HIF stabilization. *FASEB J.* 2011;25(6):1856-64. doi: 10.096/fj.10-170316. Epub 2011 Feb 24.
193. Hayashi Y, Narumi K, Tsuji S, Tsubokawa T, Nakaya MA, Wakayama T, et al. Impact of adrenomedullin on dextran sulfate sodium-induced inflammatory colitis in mice: insights from in vitro and in vivo experimental studies. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(11):1453-62. doi: 10.007/s00384-011-1254-0. Epub 2011 Jun 15.
194. Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, et al. Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *J Crohns Colitis.* 2010;4(2):161-70. doi: 10.1016/j.crohns.2009.09.006. Epub Nov 26.
195. Kono T, Omiya Y, Hira Y, Kaneko A, Chiba S, Suzuki T, et al. Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J Gastroenterol.* 2011;46(10):1187-96. doi: 10.007/s00535-011-0438-2. Epub 2011 Aug 2.

196. Kaneko A, Kono T, Miura N, Tsuchiya N, Yamamoto M. Preventive Effect of TU-100 on a Type-2 Model of Colitis in Mice: Possible Involvement of Enhancing Adrenomedullin in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:384057.(doi):10.1155/2013/384057. Epub 2013 Nov 19.
197. Ashizuka S, Inatsu H, Kita T, Kitamura K. The First Clinical Pilot Study of Adrenomedullin Therapy in Refractory Ulcerative Colitis: the Initial Six Cases. *Gastroenterology*. 2012;142(5):S353-S.
198. Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K. Adrenomedullin: A Novel Therapy for Intractable Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013;19(2):E26-E7.
199. Kono T, Ashida T, Maemoto A, Chiba S, Ebisawa Y, Chisato N, et al. Effect of Japanese Kampo Daikenchuto on chronic TNBS-induced colitis by up-regulation of CGRP, adrenomedullin and their receptor components expressions in rat colon. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008;14(1):S35-S.
200. Duerr J, Gruner M, Schubert SC, Haberkorn U, Bujard H, Mall MA. Use of a new-generation reverse tetracycline transactivator system for quantitative control of conditional gene expression in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):244-54.
201. Sun Y, Chen X, Xiao D. Tetracycline-inducible expression systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(4):235-46.
202. Genotyping Protocols Database [Internet]. Available from: http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:0::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:4615,006965.
203. Bertin G, Poujeol C, Rubera I, Poujeol P, Tauc M. In vivo Cre/loxP mediated recombination in mouse Clara cells. *Transgenic Res*. 2005;14(5):645-54.
204. Rao P, Monks DA. A tetracycline-inducible and skeletal muscle-specific Cre recombinase transgenic mouse. *Dev Neurobiol*. 2009;69(6):401-6.
205. Cawthorne C, Swindell R, Stratford IJ, Dive C, Welman A. Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol Tech*. 2007;18(2):120-3.
206. Bäckman CM, Zhang Y, Malik N, Shan L, Hoffer BJ, Westphal H, et al. Generalized tetracycline induced Cre recombinase expression through the ROSA26 locus of recombinant mice. *J Neurosci Methods*. 2009;176(1):16-23.
207. Angelakis E, Million M, Kankoe S, Lagier JC, Armougom F, Giorgi R, et al. Abnormal Weight Gain and Gut Microbiota Modifications Are Side Effects of Long-Term Doxycycline and Hydroxychloroquine Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3342-7.
208. Larráyoiz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, Martínez A. Molecular effects of doxycycline treatment on pterygium as revealed by massive transcriptome sequencing. *PLoS One*. 2012;7(6):e39359.
209. Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, et al. Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *Journal of Crohns & Colitis*. 2010;4(2):161-70.
210. Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, et al. Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol*. 2007;27(6):2215-28.
211. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
212. Yamada M, Kurahashi K. Regulation of myeloperoxidase gene expression during differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1984;259(5):3021-5.
213. Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(2):330-8.
214. Brocard J, Feil R, Chambon P, Metzger D. A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(17):4086-90.
215. Li H, Zhou X, Davis DR, Xu D, Sigmund CD. An androgen-inducible proximal tubule-specific Cre recombinase transgenic model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(6):F1481-6.
216. Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schütz G. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(8):1404-11.
217. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):752-7.
218. Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol*. 1998;8(24):1323-6.
219. Feil R, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10887-90.
220. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(22):4324-7.

221. Brake RL, Simmons PJ, Begley CG. Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice. *Genet Mol Res.* 2004;3(4):456-62.
222. Hojman P, Eriksen J, Gehl J. Tet-On induction with doxycycline after gene transfer in mice: sweetening of drinking water is not a good idea. *Anim Biotechnol.* 2007;18(3):183-8.
223. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):7963-8.
224. Zhou H, Liu Y, He F, Mo L, Sun TT, Wu XR. Temporally and spatially controllable gene expression and knockout in mouse urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(2):F387-95.
225. Delerue F, White M, Ittner LM. Inducible, tightly regulated and non-leaky neuronal gene expression in mice. *Transgenic Res.* 2014;23(2):225-33.
226. Dachtler J, Hardingham NR, Fox K. The role of nitric oxide synthase in cortical plasticity is sex specific. *J Neurosci.* 2012;32(43):14994-9.
227. Wong PG, Armstrong DW, Tse MY, Brander EP, Pang SC. Sex-specific differences in natriuretic peptide and nitric oxide synthase expression in ANP gene-disrupted mice. *Mol Cell Biochem.* 2013;374(1-2):125-35.
228. Procaccini C, Maksimovic M, Aitta-Aho T, Korpi ER, Linden AM. Reversal of novelty-induced hyperlocomotion and hippocampal c-Fos expression in GluA1 knockout male mice by the mGluR2/3 agonist LY354740. *Neuroscience.* 2013;250:189-200.
229. Sun YL, Zhang XY, Sun T, He N, Li JY, Zhuang Y, et al. The anti-inflammatory potential of neuropeptide FF in vitro and in vivo. *Peptides.* 2013;47:124-32.
230. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol.* 2006;168(6):1921-30.
231. Gonzalez-Rey E, Chorny A, O'Valle F, Delgado M. Adrenomedullin protects from experimental arthritis by down-regulating inflammation and Th1 response and inducing regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2007;170(1):263-71.
232. Herrera JL, Fernández-Montesinos R, González-Rey E, Delgado M, Pozo D. Protective role for plasmid DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1070:337-41.
233. Knod JL, Crawford K, Dusing M, Frischer JS. Mouse strain influences angiogenic response to dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Surg Res.* 2014.
234. D'Amelio P. The immune system and postmenopausal osteoporosis. *Immunol Invest.* 2013;42(7):544-54.
235. d'Elia HF, Carlsten H. The impact of hormone replacement therapy on humoral and cell-mediated immune responses in vivo in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2008;68(6):661-7.
236. Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett.* 2006;238(1):1-14.
237. Ryan MR, Shepherd R, Leavey JK, Gao Y, Grassi F, Schnell FJ, et al. An IL-7-dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(46):16735-40.
238. AC V. Estudiar Histología. Texto dibujado de Histología Especial. Navarra: Ulzama Digital; 2004.
239. Rozen P, Flatau E, Schujman E, Gefel A. Variability of splenomegaly in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1977;67(5):498-93.
240. Calzado S, Navarro M, Puig I, Font B. Splenic abscess as the first manifestation of Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2010;4(6):703-4.
241. Mice Phenotype Database [Internet]. Available from: <http://phenome.jax.org/db/qp?rtn=views/measplot&brieflook=22743&projhint=Jaxpheno2>.
242. R. P. Citología e Histología Vegetal y Animal. 3 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2002.
243. Kubínová L, Janáček J, Karen P, Radochová B, Difato F, Krekule I. Confocal stereology and image analysis: methods for estimating geometrical characteristics of cells and tissues from three-dimensional confocal images. *Physiol Res.* 2004;53 Suppl 1:S47-55.
244. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96(5):379-94.
245. Ellis CL, Ma ZM, Mann SK, Li CS, Wu J, Knight TH, et al. Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57(5):363-70.
246. Karpinich NO, Kechele DO, Espenschied ST, Willcockson HH, Fedoriw Y, Caron KM. Adrenomedullin gene dosage correlates with tumor and lymph node lymphangiogenesis. *FASEB J.* 2013;27(2):590-600. doi: 10.1096/fj.12-214080. Epub 2012 Oct 25.

247. Nouguerede E, Berenguer C, Garcia S, Bennani B, Delfino C, Nanni I, et al. Expression of adrenomedullin in human colorectal tumors and its role in cell growth and invasion in vitro and in xenograft growth in vivo. *Cancer Med.* 2013;2(2):196-207. doi: 10.1002/cam4.51. Epub 2013 Jan 29.
248. Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, et al. Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J.* 2009;23(10):3424-35.
249. Martinez A, Julian M, Bregonzio C, Notari L, Moody TW, Cuttitta F. Identification of vasoactive nonpeptidic positive and negative modulators of adrenomedullin using a neutralizing antibody-based screening strategy. *Endocrinology.* 2004;145(8):3858-65.
250. Garcia MA, Martin-Santamaria S, Cacho M, de la Llave FM, Julian M, Martinez A, et al. Synthesis, biological evaluation, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of small-molecule positive modulators of adrenomedullin. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2005;48(12):4068-75.