

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina**



**MECANISMOS DE DISFUNCIÓN DE LA BARRERA
MUCOSA E INFLAMACIÓN EN EL COLON DE RATAS
TRAS EXPOSICIÓN AL ESTRÉS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ángel Ponferrada Díaz

Bajo la dirección de los doctores:
Juan Carlos Leza Cerro, Luis Alberto Menchén Viso, Carlos Pérez de
Oteyza

Madrid, 2006

- **ISBN: 978-84-669-2948-6**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**MECANISMOS DE DISFUNCIÓN DE LA BARRERA
MUCOSA E INFLAMACIÓN EN EL COLON DE RATAS
TRAS EXPOSICIÓN A ESTRÉS**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por
Angel Ponferrada Díaz

Directores de Tesis

Prof. Juan Carlos Leza Cerro

Dr. Luis Alberto Menchén Viso

Prof. Carlos Pérez de Oteyza

AGRADECIMIENTOS

Quisiera en primer lugar agradecer al Profesor Pedro Lorenzo el haberme acogido en su grupo de investigación y permitirme realizar en su Departamento esta Tesis. Quiero agradecer además su amabilidad, cariño y vocación de formar investigadores.

A los profesores Juan Carlos Leza y Carlos Pérez de Oteyza por la inestimable ayuda que han prestado en la dirección de esta Tesis. Muchas gracias por vuestra ayuda y experiencia, y sobre todo por vuestra amistad, paciencia y comprensión.

Al Doctor Luis Menchén, pieza fundamental en la dirección de esta Tesis al aportar excelentes ideas. Muchas gracias por tu ejemplo de superación, ayuda en todos los sentidos y sobre todo, por tu amistad.

A la Profesora Maria Ángeles Moro y al Profesor Ignacio Lizasoain. Gracias a su ayuda, amistad y apoyo, en todos los sentidos, ha podido realizarse este trabajo.

A los becarios del grupo, con quienes he compartido tan buenos momentos y que tanto me han ayudado en los experimentos y a resolver todas mis dudas acerca del trabajo de laboratorio: Marta Pereira, Borja García-Bueno, Beatriz Pérez-Nievas, Cristina Romera, Jesús Pradillo, Olivia Hurtado, José Madrigal, David Fernandez y Jesús Morales. Muchas gracias, de verdad. Y por supuesto a la persona más importante, mi compañero de fatigas y experimentos, Javier Caso. Sobran las palabras, este trabajo es tanto tuyo como mío.

Al Dr. Arturo colon, por su ayuda e ideas que han contribuido al inicio y desarrollo de esta Tesis. Gracias por tu amistad.

Al Dr. Luis Alou y su equipo por la ayuda con los experimentos de microbiología en el cultivo e identificación de los gérmenes implicados en la translocación.

A todo el personal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, en especial al Dr. Pedro Menchén, Cecilia González-Asanza, Venancio González-Lara, Ignacio Marín y a mis compañeros de residencia, por las facilidades que me han proporcionado para poder compaginar el trabajo de laboratorio con la actividad clínica asistencial durante mis inolvidables años de residencia.

Al Jefe de Servicio de Aparato Digestivo del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Dr. Enrique Cos Arregui, y al tutor de residentes, Dr. Rafael Bañares Cañizares, por su apoyo en todos los sentidos, comprensión y sobre todo, su amistad.

Y por último, las personas que más amo y más importantes en mi vida, mi mujer Mariana, mi hijo Jorge y mi familia, que han mostrado una comprensión y sacrificio fundamentales para permitirme realizar esta Tesis. Gracias por regalarme parte del tiempo que os debía dedicar. Sin vosotros no hubiera podido realizar ni acabar este trabajo. A vosotros os lo dedico.

Para Mariana y Jorge, los tesoros de mi vida
A mis padres y hermano, por inculcarme el espíritu de trabajo

ABREVIATURAS

- AA: Ácido araquidónico.
- ACTH: Hormona corticotropina.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos.
- AML: Anticuerpos antimúsculo liso.
- AMPc: Adenilato monofosfato cíclico.
- ANAs: Anticuerpos antinucleares.
- 5-ASA: 5-aminosalicilatos.
- ATP: Adenosin-trifosfato.
- AZA: Azatioprina.
- BH₄: Tetrahidrobiopterina.
- CC: Corticoides.
- CCR: Carcinoma Colorrectal.
- Células NK: Células Natural-Killer.
- CEP: Colangitis esclerosante primaria.
- CI: Colitis Indeterminada.
- COX: Ciclooxigenasa.
- COX-1: Ciclooxigenasa-isoforma constitutiva.
- COX-2: Ciclooxigenasa-isoforma inducible.
- CRH: Factor liberador de corticotropina.
- CU: Colitis Ulcerosa.
- DSS: Dextrano sulfato sódico.
- DTT: DL-ditiotreitol.
- EC: Enfermedad de Crohn.
- EDRF: Factor relajante derivado del endotelio.
- EDTA: Ácido etilen-diamina tetra-acético.
- EEM: error estándar de la media.
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
- EGTA: Ácido etilen glicol-bis(aminoetil eter) N,N,N'-tetraacético.
- EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
- eNOS: Sintasa de oxido nítrico-isoforma endotelial.
- EROs: Especies reactivas de oxígeno.
- FAD: Flavin-adenin-dinucleótido.
- Fe²⁺: Ión ferroso.
- Fe³⁺: Ión férrico.
- FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.
- FMN: Flavin-mono-nucleótido.
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- GMPc: Guanilato monofosfato cíclico.
- HAA: Eje Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal.
- Hb: Hemoglobina.
- HCl: Ácido Clorhídrico.
- Hcto: Hematocrito.

- HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico.
- 15-HETE: Ácido 15-hidroxiicosatetranoico.
- 9-HODE: Ácido 9-Hidroxiioctadecadienoico.
- 13-HODE: Ácido 13- Hidroxiioctadecadienoico.
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
- ICAM: molécula de adhesión intercelular.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- I κ B: Inhibidor del factor nuclear kappa β .
- IKK: kinasa inhibidora de I κ B.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IL: Interleuquina.
- IL-1ra: Antagonista del receptor de IL-1.
- iNOS: Sintasa de oxido nítrico-isoforma inducible.
- kDa: Kilodaltons.
- LPS: Lipopolisacaridos.
- LT: Leucotrienos.
- MAP kinasa: kinasa de la proteína activadora-mitógena.
- M-CSF: Factor estimulantes de colonias de monocitos.
- MDA: Malondialdehído.
- MMPs: Metaloproteinasas de matriz.
- 6-MP: 6-Mercaptopurina.
- MPO: Mieloperoxidasa.
- nNOS: Sintasa de oxido nítrico-isoforma neuronal.
- NADPH: Nicotin-adenin-dinucleótido fosfato reducido.
- NFAT: Factor nuclear de linfocitos T activados.
- NF- κ B: Factor nuclear kappa-B.
- NF-IL-6: Factor nuclear para la expresión de interleuquina 6.
- NO: Oxido nítrico.
- N₂O₃: Trióxido de nitrógeno.
- NOS: Oxido nítrico sintasa.
- NOS-2: Sintasa de oxido nítrico-isoforma inducible.
- O₂: Oxígeno molecular.
- O₂⁻: Anión superóxido.
- OH \cdot : Radical hidroxilo.
- ONOO⁻: Peroxinitrito.
- ONOOH: Ácido peroxinitroso.
- PAF: Factor activador plaquetario.
- pANCAs: Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo-patrón perinuclear.
- PCR: Proteína C reactiva.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PG: Prostaglandina.
- 15d-PGJ₂: 15-deoxi-delta12,14-PGJ₂.
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- POMC: Proopiomelanocortina.
- PPARs: Factores activadores de la producción de peroxisomas.
- PPRE: Elementos de respuesta de proliferador de peroxisomas.
- PSTI: Inhibidor de la secreción de la tripsina pancreática.

- S10d: Grupo de ratas sometidas a estrés por inmovilización en sesiones de 6 horas durante 10 días.
- S5d: Grupo de ratas sometidas a estrés por inmovilización en sesiones de 6 horas durante 5 días.
- S6h: Grupo de ratas sometidas a estrés por inmovilización durante una sesión de 6 horas.
- SII: Síndrome de Intestino Irritable.
- SNA: Sistema nervioso autónomo.
- SNE: Sistema nervioso entérico.
- SNP: Sistema nervioso parasimpático.
- SNS: Sistema nervioso simpático.
- SP: Sustancia P.
- TACE: Enzima convertidora de TNF- α .
- TCR-V β : Receptor de los linfocitos T-porción variable de la cadena β .
- TGF- β ; Factor de crecimiento transformante beta.
- TLCK: N ^{α} -p-tosil-L-lisina-clorometil cetona.
- TLRs: receptores "Toll-Like".
- TNBS: Ácido trinitrobencenosulfónico.
- TNF α : Factor de necrosis tumoral α .
- TX: Tromboxano.
- TZDs: Tiazolindionas.
- UFC: Unidades formadoras de colonias.
- VCAM: molécula de adhesión celular-vascular.
- VIP: Péptido intestinal vasoactivo.
- VSG: Velocidad de sedimentación globular.
- ZO: "Zonula occludens".

ÍNDICE

Abreviaturas	4
INTRODUCCIÓN	13
1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. COLITIS ULCEROSA (CU)	14
1.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN	14
1.2. EPIDEMIOLOGIA	16
1.2.1. Raza	17
1.2.2. Edad y sexo	17
1.3. ETIOPATOGENIA	17
1.3.1. Factores genéticos	17
1.3.2. Factores ambientales externos	19
1.3.3. Factores microbianos	22
1.3.4. Factores inmunológicos	24
1.3.5. Visión integrada de la patogenia de la Colitis Ulcerosa	30
1.4. CLÍNICA DE LA COLITIS ULCEROSA	31
1.4.1. Sintomatología intestinal de la Colitis Ulcerosa	31
1.4.2. Manifestaciones extraintestinales de la Colitis Ulcerosa	32
1.4.3. Complicaciones de la Colitis Ulcerosa	37
1.4.4. Evaluación de la gravedad clínica de la Colitis Ulcerosa	40
1.5. DIAGNÓSTICO DE LA COLITIS ULCEROSA	42
1.5.1. Criterios biológicos	43
1.5.2. Criterios radiológicos	44
1.5.3. Criterios endoscópicos	44
1.5.4. Criterios histológicos	45
1.6. HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO DE LA CU	48
1.7. TRATAMIENTO DE LA COLITIS ULCEROSA	49
1.7.1. 5-Aminosalicilatos	49
1.7.2. Corticoides	50
1.7.3. Inmunosupresores	51
1.7.4. Fármacos anti-TNF α	52
1.7.5. Tratamiento quirúrgico	52

2. MEDIADORES INFLAMATORIOS Y ANTIINFLAMATORIOS EN LA COLITIS ULCEROSA	54
2.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO)	55
2.1.1. Bioquímica del óxido nítrico	55
2.1.2. Síntesis del NO en el aparato digestivo	56
2.1.3. Mecanismo de acción del NO	60
2.1.4. Papel fisiológico del NO en el organismo	61
2.1.5. Papel fisiopatológico del NO en el organismo	64
2.2. DERIVADOS EICOSANOIDES	66
2.2.1. Síntesis de Prostaglandinas (PG)	66
2.2.2. Mecanismo de acción de las PG	69
2.2.3. Papel fisiológico de la PG en el organismo	69
2.2.4. Papel fisiopatológico de los eicosanoides en la CU	71
2.3. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS	72
2.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	75
2.5. AMINAS BIÓGENAS	76
2.6. NEUROPEPTIDOS	76
2.7. QUININAS	76
2.8. COMPLEMENTO	77
2.9. FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO	77
2.10. PROTEASAS	77
2.11. MEDIADORES ANTIINFLAMTORIOS EN LA CU	78
2.11.1. Receptores activadores de la producción de peroxisomas	78
2.11.2. Citoquinas antiinflamatorias	82
3. EL ESTRÉS	84
3.1. CONCEPTO Y DEFINICIONES	84
3.2. CONSECUENCIAS GENERALES DEL ESTRÉS	86
3.3. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS	88
3.4. EFECTO DEL ESTRÉS EN EL APARATO DIGESTIVO: EFECTO SOBRE EL CURSO CLINICO DE LA EII HUMANA	91

3.5. EFECTO DEL ESTRÉS EN EL APARATO DIGESTIVO DE MODELOS ANIMALES	97
3.5.1. Modelos de estrés animal	97
3.5.2. Efecto del estrés en el tracto gastrointestinal	99
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	100
1. ANTECEDENTES INMEDIATOS	101
2. HIPÓTESIS	105
3. OBJETIVOS	106
MATERIAL Y MÉTODOS	107
1. MODELO EXPERIMENTAL: ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN	108
2. RECOGIDA DE MUESTRAS	109
3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	111
3.1. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS: PÉRDIDA DE PESO	113
3.2. ANÁLISIS DE DAÑO MACROSCÓPICO EN MUCOSA DE COLON	113
3.3. INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES	113
3.4. DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA	114
3.5. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO NITROSATIVO POR ESTRÉS	114
3.6. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO POR ESTRÉS	115
3.7. TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF- κ B COMO INDUCTOR DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO POR ESTRÉS	115
3.8. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VÍA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS	115
3.9. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS	116
3.10. ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA	

POR ESTRÉS	117
3.11. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA INDUCIDA POR ESTRÉS	118
3.12. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ ₂ /PPAR- γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS.	118
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	119
4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA	119
4.2. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS iNOS, COX-1, COX-2 Y PPAR- γ POR WESTERN-BLOT	120
4.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA OXIDO NITRICO SINTASA	121
4.4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PGE ₂ Y PGJ ₂ EN HOMOGENEIZADOS DE COLON	122
4.5. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNA p65 EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS Y NUCLEARES DE CÉLULAS EPITELIALES DE COLON	122
4.6. DETERMINACION D ELA PRODUCCIÓN DE IgA EN HOMOGENEIZADO DE COLON	124
4.7. MEDICIÓN DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	124
4.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEÍCO	125
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	125
RESULTADOS	126
1. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS: PÉRDIDA DE PESO	127
2. ANÁLISIS DE DAÑO MACROSCÓPICO EN MUCOSA DE COLON	128
3. LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA TRAS ESTRÉS	128
4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA	129
5. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO NITROSATIVO POR ESTRÉS	130
5.1. EXPRESIÓN DE iNOS EN MUCOSA DE COLON	130

5.2. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD NOS EN MUCOSA DE COLON	131
6. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO POR ESTRÉS	133
6.1. EXPRESIÓN DE COX-1 Y COX-2 EN MUCOSA DE COLON	133
6.2. PRODUCCIÓN DE PGE ₂ EN MUCOSA DE COLON	134
7. PAPEL DEL NF-κB EN MUCOSA COLÓNICA TRAS ESTRÉS	135
8. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VÍA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS	136
8.1. PRODUCCIÓN DE PGJ ₂ EN MUCOSA DE COLON	136
8.2. EXPRESIÓN DE PPAR- γ EN MUCOSA DE COLON	136
9. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRES	138
9.1. ESTUDIO DE PERMEABILIDAD PARACELULAR A MACROMOLÉCULAS	138
9.2. ESTUDIO ULTRAMICROSCÓPICO DE LAS UNIONES INTERCELULARES DE LAS CÉLULAS EPITELIALES	138
10. TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS	139
11. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA DE COLON DE ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS	143
12. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ₂/PPAR-γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS	144
DISCUSIÓN	157
1. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LA PÉRDIDA DE PESO	159
2. DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA	159
3. INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO POR ESTRÉS	160
4. TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF- κ B COMO INDUCTOR DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO	162

5. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VÍA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS	162
6. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS	164
7. ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS	165
8. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA DE COLON DE ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS	166
9. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ₂/PPAR-γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS	167
CONCLUSIONES	172
BIBLIOGRAFÍA	174

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. COLITIS ULCEROSA.

1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) representa un conjunto heterogéneo de enfermedades crónicas que afecta al tubo digestivo, englobando principalmente a la Colitis Ulcerosa (CU), la Enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis Indeterminada (CI).

Tienen una etiología desconocida, aunque cada día se conoce más sobre su patogenia. Su curso es impredecible soliendo evolucionar alternando períodos de actividad (brotes o recidivas) y períodos de remisión, experimentando aproximadamente la mitad de los pacientes una recidiva cada año (OMGE Research Committee Team, 1993). Tampoco son enfermedades estáticas en cuanto a su localización anatómica. Así, el 70% de los pacientes con colitis distal y el 35% de los que presentan proctosigmoiditis, experimentan una progresión en sentido proximal hacia una colitis extensa o pancolitis (Pajares García et al, 1987; Martínez Salmerón et al, 1993).

Las dos formas clásicas de presentación poseen unas características específicas que permiten diferenciarlas entre sí. La EC se caracteriza por tratarse de un proceso inflamatorio que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo desde la boca hasta el ano, de forma focal, asimétrica y segmentaria con zonas de respeto de mucosa. Puede afectar a todas las capas de la pared intestinal de forma transmural, con el consiguiente desarrollo de fisuras, fistulas y abscesos. Por el contrario, en la CU la inflamación afecta exclusivamente al colon de forma continua en dirección proximal desde el ano, y limitándose a la capa mucosa. Además, el curso clínico, pronóstico, respuesta al tratamiento médico, necesidad de tratamiento quirúrgico y tasa de recurrencia postquirúrgica son distintos en ambas entidades (Farmer et al, 1985; Lanholz et al, 1994).

Los estudios de los efectos del estrés psicosocial sobre el curso de la EII han sido mejor caracterizados en la CU, por lo que este trabajo se centrará más en los cambios acontecidos en la mucosa colónica como consecuencia de él.

Según la extensión anatómica se clasifica la CU en (Jayanthi et al, 1993):

- *Proctitis Ulcerosa*: La enfermedad se limita al recto, desde margen anal interno hasta unos 15 cm desde el esfínter anal. Representa aproximadamente el 30-42% de los casos.
- *Proctosigmoiditis*: La inflamación se extiende hasta sigma.
- *Colitis distal o izquierda*: La inflamación afecta a recto, sigma y colon descendente hasta ángulo esplénico. Estas dos últimas representan hasta el 44-48% de los casos.
- *Colitis extensa*: La inflamación se extiende por colon transversal hasta ángulo hepático.
- *Pancolitis o colitis total*: Afecta todo el colon hasta ciego. Ambas representan el 9-17% de los casos.

Según el curso evolutivo, la CU se clasifica en:

- *Crónica-Recidivante*: Es la forma más frecuente representando un 70% del total. Se caracteriza por la alternancia de periodos de actividad sintomática con otros de remisión. Puede evolucionar tanto hacia la forma aguda fulminante como a la crónica continua.
- *Crónica-Continua*: Constituye un 20% y se produce cuando un brote se extiende más allá de seis meses a pesar de tratamiento, con recidivas frecuentes y seguidas de cortos intervalos de mejoría. Suele acompañarse de complicaciones locales.
- *Aguda-Fulminante*: Supone el 10%, siendo la forma más grave de presentación. Comienza de manera brusca con diarrea abundante y rectorragia, pudiéndose acompañar de megacolon tóxico e incluso debutar con un cuadro de perforación colónica de alta mortalidad. Suele ocurrir en el seno de una pancolitis, siendo excepcional en las rectitis.

En el reciente 13^{er} Congreso Mundial de Gastroenterología celebrado en Montreal se ha establecido la Clasificación de Montreal para la CU (Silverberg et al, 2005), que tiene en cuenta la extensión y gravedad. Según la *extensión (E)* se distinguen 3 grupos ya que supone modificaciones de la posología del tratamiento y el riesgo de neoplasia es distinto entre ellos: proctitis, colitis distal y colitis extensa o pancolitis, abandonándose el término proctosigmoiditis por lo confuso de donde poner el límite de

la afectación. En el caso de la *gravedad (S)* se distinguen cuatro grandes grupos: 0 o en remisión, 1 o leve, 2 o moderado y 3 o grave, sugiriéndose continuar con el uso de la clasificación de Truelove-Witts para su estadificación (Tabla 1).

Según la extensión (E):
<ul style="list-style-type: none"> • E1: Proctitis ulcerosa: Afectación limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea) • E2: Colitis izquierda o distal: Afectación limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico). • E3: Colitis extensa o pancolitis: Afectación que se extiende más allá del ángulo esplénico.
Según la gravedad (S):
<ul style="list-style-type: none"> • S0: Colitis en remisión o silente: No hay síntomas de la enfermedad. • S1: Colitis leve: Cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia, ni aumento de la VSG (según Índice de Truelove-Witts). • S2: Colitis moderada: Criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves (según Índice de Truelove-Witts). • S3: Colitis grave: Seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afectación sistémica grave.

Tabla 1: Clasificación de Montreal para la CU.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La CU es una enfermedad de distribución universal pero cuya incidencia ha presentado tradicionalmente importantes variaciones geográficas, existiendo zonas de alta incidencia (Estados Unidos, Australia y Norte de Europa) con entre 6 y 15 casos por 100.000 habitantes, y de baja (Asia y América del Sur) con una incidencia 10 veces menor (Rusell y Stockbrugger, 1996). En la actualidad, en nuestro país las tasas rondan entre 0,6 a 8 casos por 100.000/año con un valor medio de 3,8 (Pajares y Gisbert, 2001). Además, el llamado gradiente norte-sur se ha hecho cada vez más discreto siendo la incidencia de EC y CU en Asturias semejante a la de los países del norte de Europa (Saro Gismera et al, 2003; Rodrigo et al, 2004). En cualquier caso, resulta difícil

establecer la incidencia y prevalencia real de EII por la diversidad de los métodos diagnósticos empleados en los distintos estudios.

1.2.1. Raza y etnia.

Es más frecuente en la raza blanca y en los judíos Ashkenazi centroeuropeos (Gilat et al, 1986), siendo mínima en la raza negra (Mayberry y Rhodes, 1984).

1.2.2. Edad y sexo.

La mayor parte de los enfermos inician su enfermedad entre los 15 y los 40 años, con un segundo pico de aparición entre los 55 y los 65 años (Ruiz, 1998). En nuestro país hay dos picos máximos de incidencia, uno entre los 25 y 35 años y otro entre los 65-75 años, siendo la edad media de los enfermos de 43,95 (IC 95%:42,48-45,42). Este hecho es de gran importancia para la evolución y el pronóstico, ya que a mayor precocidad del debut, peor suele ser la evolución.

La enfermedad tiende a ser más frecuente en mujeres, aunque muchas otras series no han demostrado diferencias entre ambos sexos (Jewel, 1998; Rodrigo et al, 2004).

1.3 ETIOPATOGENIA.

Las causas principales de la CU continúan siendo una incógnita, aunque cada vez se conoce más su patogenia. En términos generales, se considera que existe un factor iniciador (un factor medioambiental en un sujeto genéticamente predispuesto) que provoca una pérdida de la tolerancia inmunológica a la flora intestinal saprófita, induciendo una respuesta inflamatoria prolongada e inapropiada en la mucosa cólica (Fiocchi ,1998; Papadakis y Targan, 1999; Panés, 2001; Hugot et al, 2001; Farrell y Peppercorn, 2002). A continuación pasaremos a comentar cada uno de los factores implicados:

1.3.1 Factores genéticos.

La probabilidad de que un familiar de un paciente con CU o EC desarrolle la enfermedad es diez veces superior a la del resto de la población. Se estima que entre el 10 y el 20% de los pacientes con CU tienen al menos un familiar de primer grado

afectado por la enfermedad. Sin embargo, la concordancia en gemelos monocigotos del 6-14% es menor que en el caso de la enfermedad de Crohn (44-55%) (Mayberry y Rhodes, 1984; Orholm et al, 2000). Igualmente, se ha observado que existen más enfermos con CU entre familiares de EC que al revés, lo que hace sospechar que ambas enfermedades comparten una herencia poligénica que confiere a sus portadores una mayor sensibilidad a factores externos que precipitan el desarrollo de EII (Meucci et al, 1992).

Se han implicado varios genes que intervienen en la regulación de la inmunidad: genes de la región del complejo mayor de histocompatibilidad, de receptores de linfocitos T e inmunoglobulinas, del sistema del complemento y de citoquinas y moléculas de adhesión (Ahmad et al, 2001). En relación a esto, se han asociado ciertas variaciones alélicas en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y otros genes con la CU y con su comportamiento evolutivo:

- En pacientes japoneses y de origen judío se ha demostrado una asociación positiva con el alelo 1502 del antígeno leucocitario humano (HLA-DRB1*1502), un alelo poco frecuente en caucásicos (Asakura et al, 1982; Stokkers et al, 1999).
- En población caucásica se ha sugerido asociación con HLA-DRB1*0103, DRB1*1309*1320*1325*1329 (DR13), DRB1*0401 y DRB1*1502 que podrían limitar un subgrupo con enfermedad más extensa, con mayor riesgo de colectomía y de manifestaciones extraintestinales (Roussomoustakaki et al, 1996; Bouma et al, 1999; Ahmad et al, 2003; Annese et al, 2005).
- También se ha demostrado una asociación negativa con HLA-DR4 (Mansfield et al, 1994).
- Parece existir una asociación significativa entre la presencia del alelo 2 del gen del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra*2) y la CU, en particular con formas extensas y con mayor riesgo de colectomía. Aunque la asociación es de escasa magnitud y supone un riesgo mínimo para un individuo determinado, debido a su mayor frecuencia en caucásicos puede contribuir a un mayor riesgo poblacional (Mansfield et al, 1994; Bioque et al, 1996). En España un estudio determinó una mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes con pANCA subclínico y genotipos 1 y 2 de IL-1ra (Papo et al, 1999).

- Una variación alélica del gen que codifica IκB se ha asociado en un estudio español a enfermedad extensa y refractaria (De la Concha et al, 2000).
- Una interacción entre IBD5 y NOD2/CARD15 y polimorfismos de NOD1/CARD4 parecen aumentar la susceptibilidad a CU (McGovern et al, 2003; 2005).

1.3.2 Factores ambientales externos.

El hecho de que la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos sea menor en CU que en EC nos da una idea de la importancia de los factores medioambientales en la aparición de esta enfermedad. Varios son los factores estudiados hasta ahora:

I. Tabaco.

En las primeras observaciones ya se constató la mayor frecuencia de CU entre no fumadores (Harries et al, 1982). Se han descrito riesgos relativos de desarrollar CU de hasta un 4,4 en ex fumadores, 1 en no fumadores y 0,6 en fumadores activos (Lindberg et al, 1988). Otros autores destacan un efecto beneficioso para la CU (Calkins, 1989). Así, se ha observado que el abandono del uso tabáquico puede asociarse a la aparición del primer brote de CU, que tiene un efecto protector para la CU activa y que puede ser útil para el mantenimiento de la remisión. Incluso, según algún estudio, la exposición en niños al humo del tabaco es factor protector para el desarrollo de CU (Sandler et al, 1992).

Aunque no está claro qué sustancias químicas presentes en el humo del tabaco son las causantes de esta asociación, la evidencia de la utilidad de los parches transdérmicos de nicotina asociados a la terapia convencional en la CU leve-moderada (Pullan et al, 1994) orienta a que pueda ser ésta la principal implicada. Se han sugerido como mecanismos responsables, el efecto inhibitorio sobre los linfocitos T colaboradores tipo 2 (predominantes en la respuesta inmune celular de la CU), el incremento de la producción colónica de mucina y la capacidad de alterar la motilidad intestinal. Otros estudios, sin embargo, no han demostrado tal utilidad.

II. Dieta.

Puesto que lo que ingerimos supone la mayoría de los antígenos no bacterianos presentes en el tubo digestivo, parece lógico suponer que la dieta

pueda tener influencia sobre la susceptibilidad de desarrollar CU. Existen varios estudios caso-control en los que se han examinado diversos hábitos dietéticos, aunque en general presentan numerosos sesgos que dificultan la interpretación de sus resultados.

Se ha asociado el consumo de hidratos de carbono refinados (en EC, sin que se haya demostrado relación en CU) y la “comida rápida” (Probert et al, 1996a), el reciclaje de aceite y el uso de distintos tipos de aceites implicados en la cadena del ácido araquidónico como factores de riesgo (Chuah et al, 1992). Por otro lado hay datos que sugieren un posible efecto beneficioso la suplementación dietética con ácidos grasos poliinsaturados (Beluzzi et al, 2000).

La fibra, en relación con la producción de ácidos grasos de cadena corta (fundamentalmente butirato) tendría un efecto protector, y se ha mostrado eficaz para mantener la remisión en pacientes con CU (Fernández-Bañares et al, 1999).

La retirada de los lácteos se ha relacionado con una mejoría en el curso clínico de la enfermedad, mientras que su reintroducción se asocia a una reaparición de los síntomas, y parece existir asociación entre la sensibilización a las proteínas de la leche de vaca en la infancia y el desarrollo posterior de CU (Glassman et al, 1990). Sin embargo, no existe ningún fundamento científico para prohibir el consumo de productos lácteos a los pacientes con EC y CU, ya que hasta ahora ningún componente de la leche ha demostrado ser favorecedor de la inflamación intestinal, ser capaz de desencadenar un brote o causar la enfermedad. Bien es cierto que un determinado porcentaje de personas no son capaces de asimilar totalmente la lactosa de forma que en el colon puede provocar diarrea o gases. Por esta razón, se recomienda limitar el consumo de leche durante los brotes sólo si este consumo de leche aumenta claramente su diarrea.

III. Anticonceptivos orales.

El uso de anticonceptivos orales también parecía aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad. En estudios iniciales parecía que el riesgo es mayor en los casos de consumo reciente (en los 6 meses previos al brote) y prolongado de los mismos (más de 6 años), así como aquellos que poseen un alto contenido en estrógenos. Ese riesgo incluso disminuye significativamente al suspenderlos (Persson et al, 1993; Boyko et al, 1994). Por el contrario, un metaanálisis y

estudios posteriores sólo han encontrado una asociación muy discreta o nula (Godet et al, 1995; Corrao et al, 1998; García Rodríguez et al, 2005).

IV. Antiinflamatorios no esteroideos.

Al igual que los anteriores, inicialmente se les consideraba responsables del desencadenamiento de exacerbaciones de CU e incluso ocasionar un primer brote de la misma (Evans et al, 1997). Se han sugerían como posibles mecanismos de esta asociación: La capacidad de los AINEs de aumentar la permeabilidad intestinal y por tanto, facilitar la captación de antígenos, la disminución de la producción de prostaglandinas y la depleción de ATP en la mucosa colónica y el aumento de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular. Sin embargo, un estudio de cohortes posterior no ha demostrado tal asociación (Bonner et al, 2004).

V. Apendicectomía y amigdalectomía.

La extirpación quirúrgica del apéndice en la infancia ha demostrado ser un factor protector de la enfermedad en estudios caso-control (Koutroubakis y Vlachonikolis, 2000) y poblacionales (Anderson et al, 2001); En este último estudio se observó que el riesgo es menor sólo en aquellos pacientes a los que se realizó apendicectomía por apendicitis o linfadenitis mesentérica y no en los que se llevaba a cabo de forma accidental o por dolor abdominal inespecífico. Esto sugiere que el hecho de padecer una patología inflamatoria en la infancia o juventud, más que la apendicectomía en sí, es el factor protector frente al desarrollo posterior de CU.

La amigdalectomía se ha asociado en la EC como favorecedor de su curso evolutivo (menos recidivas, mayor extensión y menor gravedad) pero no en CU (Pérez-Miranda et al, 1994).

VI. Infecciones perinatales e infantiles.

El papel de diversos agentes infecciosos como activadores de la inflamación proceso de base es un tema controvertido. Así se han estudiado el *Mycobacterium paratuberculosis*, *citomegalovirus*, *rotavirus*, *reovirus "like"* y diversos RNA

virus. Parece que los procesos inflamatorios e infecciosos perinatales favorecen la aparición posterior de EII. La lactancia materna podría tener un papel protector al estimular el crecimiento y desarrollo de la mucosa intestinal y aumentar los niveles de Ig A (Saro y Ruiz, 2002).

VII. Estrés psicológico.

El estrés es un factor que se ha implicado en el inicio de reagudizaciones hasta en el 40% de los pacientes con CU. Incluso se ha sugerido una división entre pacientes con CU susceptibles o no al estrés psicológico, definida por la ausencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos con patrón perinuclear (pANCA) en los primeros (Maunder et al, 2000). Dado que es el motivo de esta Tesis, se desarrollará posteriormente este tema más ampliamente.

1.3.3 Factores microbianos.

Una de las teorías etiopatogénicas más atractivas sugiere la posibilidad de que la enfermedad se produzca como consecuencia de la acción de agentes bacterianos, adquiridos o que forman parte de la propia flora intestinal, que por diversos mecanismos desencadenan una respuesta inmunológica anómala sobre una mucosa colónica cuya barrera defensiva ha sido previamente dañada. El sistema inmune de estos pacientes es incapaz de autolimitar el daño inicial provocando la exacerbación de la respuesta inflamatoria y la cronificación del proceso; todo ello como consecuencia de una activación anormal de las células del sistema inmunitario, con la consiguiente producción y liberación de una gran variedad de mediadores: citoquinas, productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), factores de crecimiento y transformación, proteínas del sistema de complemento y especies reactivas de oxígeno como el óxido nítrico (NO), cuya reacción con el anión superóxido (O_2^-), produce peroxinitrito ($ONOO^-$).

Es conocido que el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias gramnegativas es capaz de inducir por sí mismo la expresión y actividad de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS-2), capaz de producir citotoxicidad directa a través de la generación de altas concentraciones de NO.

Asimismo se ha sugerido que determinados superantígenos bacterianos pueden participar en el inicio, exacerbación o reactivación de la EII al activar potentemente a los linfocitos T, induciendo una respuesta Th1. Esto se produce como consecuencia de una unión cruzada entre el dominio externo de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y la porción variable de la cadena β del receptor de los linfocitos T (TCR-V β), fuera de los sitios específicos para antígenos convencionales y sin requerir la intervención previa de células presentadoras de antígeno. En estudios experimentales se ha descrito un aumento en el número de linfocitos T en la lámina propia y en el epitelio intestinal que ocasiona un incremento de la permeabilidad epitelial y de la producción de citoquinas, cambios que pueden prevenirse mediante la utilización de anticuerpos anti-IFN γ y anti-TNF α o de IL-10 y TGF β (McKay, 2001).

También estos microorganismos podrían ser capaces de desencadenar inflamación colónica mediante la alteración del metabolismo de las células epiteliales del colon. Es conocido que las bacterias anaerobias de la flora intestinal normal son capaces de transformar mediante reacciones de fermentación, hidratos de carbono y proteínas de la dieta, en ácidos grasos de cadena corta, el principal recurso de energía de los colonocitos. Se ha postulado que la deficiencia de esta fuente de energía pueda conducir al desarrollo de colitis, habiéndose demostrado una sobreproducción de sulfuro de hidrógeno (tóxico para el epitelio colónico por competencia con los ácidos grasos de cadena corta) debida a un exceso de bacterias patógenas capaces de reducir el azufre en muestras fecales de pacientes con CU (Campieri y Gionchetti, 2001).

El colon contiene en condiciones normales una gran concentración de hasta 400 especies diferentes de bacterias, entre las que se incluyen microorganismos potencialmente patógenos a los que podría atribuirse la responsabilidad en individuos genéticamente predispuestos, de iniciar y perpetuar la CU. Hechos que apoyan esta teoría son:

- Estudios en animales modificados genéticamente que desarrollan colitis cuando son expuestos a microorganismos que forman parte habitual de la flora comensal del colon, pero no lo hacen en un medio completamente libre de gérmenes (Taurog et al, 1994).

- La existencia de un gradiente de concentración de microorganismos desde el recto hasta el polo cecal que resulta superponible a la clásica extensión retrógrada que caracteriza la afectación inflamatoria de la CU.
- La alta prevalencia de aparición de anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo con patrón perinuclear (pANCA) en el suero de estos pacientes. Este autoanticuerpo reacciona de forma cruzada con antígenos del citoplasma de mastocitos de la mucosa colónica, del cuerpo ciliar en el ojo, y lo que resulta más representativo, con proteínas propias de bacterias comensales como *Bacteroides caccae* y *Escherichia coli* (Cohavy et al, 2000), lo que pone de manifiesto el contacto del sistema inmunitario con componentes de la microflora intestinal normal en la respuesta inmune genéticamente determinada capaz de generar pANCA en la CU. Por otra parte, este hallazgo apoya el hecho demostrado de la mayor prevalencia de aparición de pANCA en pacientes con EC limitada al colon (Vasiliauskas et al, 1996).
- El descenso significativo del número de bacterias anaerobias y de *Lactobacillus* en pacientes con EII activa comparados con EII sin actividad (Fabia et al, 1993).
- Otra evidencia se encuentra en el desarrollo de reservoritis tras una colectomía total. A diferencia de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar en los que se realiza la misma intervención y no desarrollan esta complicación, los pacientes con CU muestran una susceptibilidad, quizás genética, a desarrollar inflamación del reservorio ileal tras la colonización del mismo por parte de la flora bacteriana comensal. Además, el tratamiento con antibióticos se ha demostrado eficaz en el tratamiento de esta complicación (Katz, 2005).

En relación a tipo de agente cabe destacar la implicación de *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia* como posibles causas de CU, y se ha asociado a la toxina de *Clostridium difficile* con brotes agudos de la enfermedad (Campieri y Gionchetti, 2001).

1.3.4 Factores inmunológicos.

La multitud de manifestaciones extraintestinales de base autoinmune que pueden acompañar a estas enfermedades y el hecho de que estos pacientes respondan a tratamientos de base inmunosupresora, como la azatioprina o los glucocorticoides entre otros, pone de manifiesto la importancia capital del sistema inmune en la patogenia de la CU.

I. Inmunidad humoral:

En la CU predomina la respuesta inmune dependiente de anticuerpos como consecuencia de la liberación de IL-4, IL-5 e IL-10 y de un importante infiltrado por células plasmáticas en la lámina propia (Kett et al, 1987; Fiocchi, 1998). Los pacientes con EII muestra un aumento del número de células plasmáticas con capacidad de sintetizar y secretar inmunoglobulinas (Ig), que generan de forma predominante una sobreproducción de IgG. Incluso las dos formas principales de EII, pueden ser diferenciadas en función de la subclase de IgG producida en mayor rango: IgG1, con capacidad de activar el complemento, en el caso de la CU y la IgG2 en la EC (Kett et al, 1987).

Los pacientes con EII presentan una gran variedad de autoanticuerpos. Destaca la presencia de anticuerpos séricos y tisulares contra un antígeno común a proteínas del epitelio colónico, del citoesqueleto o del citoplasma de neutrófilos, que se expresan tanto en las células epiteliales del colon como en las localizaciones habitualmente implicadas en las manifestaciones extraintestinales. El antígeno diana mejor caracterizado es la isoforma 5 de la tropomiosina, proteína colónica de 40 kDa reconocida exclusivamente por anticuerpos de tipo IgG aislados del colon de pacientes con CU. Anticuerpos monoclonales contra este antígeno han identificado epítomos compartidos en el colon humano, la piel, el epitelio biliar, los ojos y las articulaciones, localizaciones habituales de manifestaciones extraintestinales de la enfermedad (Bhagat y Das, 1994; Das, 1999). Por otro lado destacan los pANCA, presentes hasta en el 80% de los pacientes con CU y que son más frecuentes en familiares sanos y en formas más agresivas de la enfermedad (Saxon et al, 1990).

II. Inmunidad celular:

Se han descrito multitud de anomalías en la función de los linfocitos T, tanto a nivel sistémico como a nivel intestinal en los pacientes con EII. Se postula que la principal alteración inmunológica que da lugar a la inflamación colónica en la CU es una activación anómala de determinadas subpoblaciones de linfocitos T, produciéndose una expansión clonal de linfocitos T CD4⁺ que se mantiene en el tiempo. Ello sugiere una respuesta continua a los mismos antígenos a lo largo de toda la historia natural de la enfermedad y provoca una hiperreactividad de la

mucosa hacia bacterias comensales de la luz colónica que se mantiene en el tiempo (Probert et al, 1996b).

En la CU existe una respuesta predominante de linfocitos T-cooperadores de tipo 2 (Th-2) que se asocia a una hiperproducción de IL-5, que facilita la respuesta inmune humoral, e IL-10, que podría actuar como citoquina antiinflamatoria (Fuss et al, 1996). Estudios realizados en animales modificados genéticamente han mostrado además que IL-10 y el factor de crecimiento tumoral, producidos por ciertas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ están implicados de forma crítica en la tolerancia a antígenos de la luz intestinal (Groux et al, 1997; Liu et al, 2000). Por su parte, los linfocitos T-cooperadores con respuesta de tipo 3 (Th-3) son capaces de reestablecer el equilibrio entre linfocitos T reguladores y efectores. En un estudio se han estimulado con la ingesta oral de determinados antígenos, consiguiendo inducir tolerancia con resolución de la inflamación del colon (Neurath et al, 1996). Este es el papel que parecen tener los probióticos como tratamiento de la CU.

Las citoquinas son moléculas con importancia capital en los procesos inflamatorios permitiendo monitorizar la actividad clínica de la enfermedad y, lo que es más importante, su manipulación puede conducir al desarrollo de nuevas perspectivas terapéuticas. Más que sus niveles, lo realmente importante en la patogenia de estos procesos es el equilibrio entre citoquinas con acciones opuestas. Así, existe una sobreproducción de IL-1 por parte de células mononucleares de la mucosa en la CU. Sus efectos biológicos están determinados por un equilibrio con los niveles del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), una molécula que en condiciones normales ocupa el receptor de IL-1 sin dar lugar a fenómenos proinflamatorios. Se ha evidenciado la existencia de un desequilibrio entre IL-1 e IL-1ra en la EII. En este caso ambas se encuentran aumentadas, pero IL-1ra nunca es producida en cantidades suficientes como para neutralizar los niveles extremadamente elevados de la IL-1. Como resultado de este desequilibrio se produce la inflamación intestinal. Además como ya se comentó anteriormente, es característica la asociación entre el alelo IL-1ra*2 y la aparición de CU, especialmente en formas de mayor gravedad (Kam et al, 1995; Bioque et al, 1996; Rogler y Andus, 1998).

Otra citoquina importante en el desarrollo de CU es la IL-4 al detectarse en la mucosa colónica de estos pacientes (Inoue et al, 1999). También se ha descrito una diferente respuesta a la IL-2 de los linfocitos T de la mucosa, de forma que en la CU responden débilmente mientras que en el caso de la EC muestran una hiperreactividad marcada (Kusugami et al, 1989).

El papel del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en la CU ha sido un tema ampliamente debatido. Se encuentra elevado en la sangre, tejido colónico y deposiciones de pacientes con CU sugiriéndose incluso su papel como marcador de la enfermedad (Braegger et al, 1992; Murch SH et al, 1993 y 1991). Asimismo, se ha demostrado un incremento de la expresión de su receptor tipo 2 implicado en las alteraciones del epitelio intestinal características de la inflamación colónica de esta enfermedad (Mizoguchi et al, 2002). Por otro lado, los resultados positivos del tratamiento de la CU refractaria con Infliximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra esta citoquina (Rutgeerts et al, 2005), ponen de manifiesto su importancia.

En lo referente a la regulación de la síntesis de citoquinas cabe destacar el papel de factores de transcripción como el factor nuclear κ B (NF- κ B), que se unen a las regiones promotoras del genes productores de citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α en linfocitos, monocitos y células epiteliales intestinales. En condiciones normales el NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a I κ B α e I κ B β impidiendo su paso al núcleo celular. Al estimularse esta vía se produce una fosforilación mediada por quinasas de I κ B lo que causa su rápida degradación por el proteasoma quedando libre el NF- κ B. La forma activa del NF- κ B es un heterodímero constituido por la subunidad p65 (también llamada relA) y la subunidad p50. Tras su liberación de I κ B, el NF- κ B transloca al núcleo donde se fija a regiones específicas en los promotores de los genes diana. El gen responsable de la síntesis de I κ B presenta una secuencia en su región promotora κ B a la que se une NF- κ B produciendo de esta forma I κ B que se une a NF- κ B haciéndole pasar al citoplasma finalizando de esta forma su acción (para rev. ver Barnes y Karin, 1997) –Figura 1-.

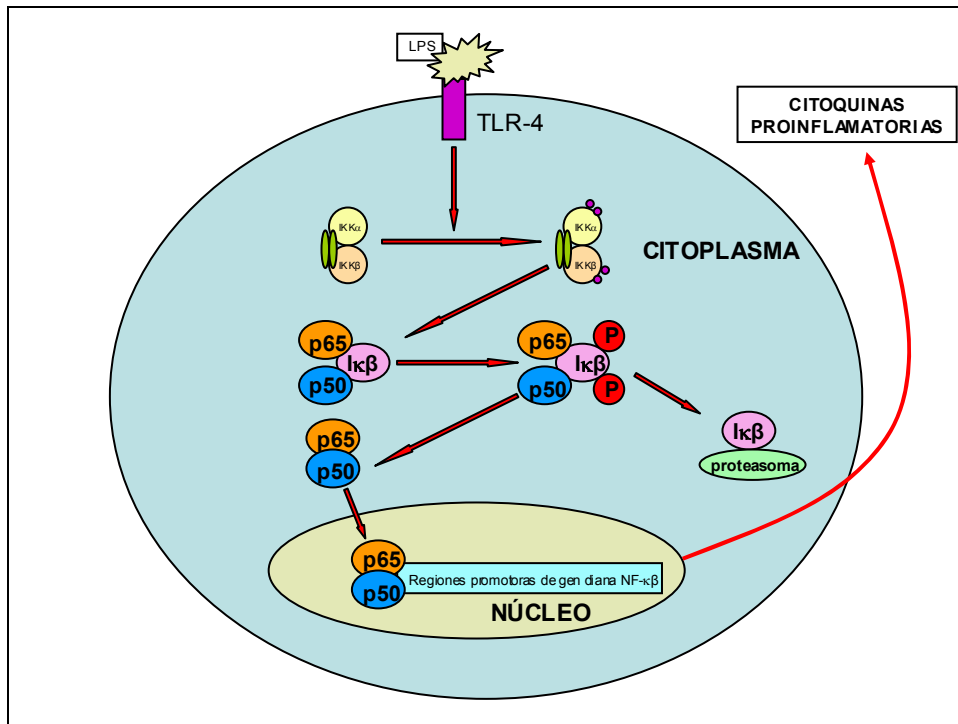


Figura 1: Vía de activación de NF-κB tras la acción de señales activadoras sobre la superficie celular a través de TLR4.

El NF-κB tiene una actividad muy aumentada en la EII (Neurath et al, 1998). A su vez, la activación del propio NF-κB parece estimulada por gran cantidad de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-18 y TNF-α, lo que constituiría un mecanismo de autopropagación que continuaría el proceso inflamatorio. Asimismo, puede activarse por antígenos bacterianos a través de unos receptores transmembrana implicados en el reconocimiento de microorganismos denominados “toll-like receptors” (TLRs). La isoforma TLR4 ha sido uno de los más estudiados, que reconoce la porción del lípido A del lipopolisacárido de las bacterias gram negativas y durante los episodios de inflamación intestinal se expresa en células epiteliales intestinales, macrófagos y células dendríticas. Su estimulación conduce a la activación del factor NF-κB, con la subsiguiente inducción de genes proinflamatorios (MacDonnald et al, 1999) –Figura 1-. Recientemente se ha determinado, un alelo del gen de TLR4, el Thr399Ile, que se asocia significativamente a la CU (Torok et al, 2004). Otras isoformas reconocen otras moléculas y participan en distintos procesos: TLR1 y TLR6 participan en la activación de macrófagos por bacterias gram positivas, TLR2 reconoce lipoproteínas y peptidoglicanos, TLR5 la flagelina y el

TLR9 el ADN bacteriano (Cario y Podolsky, 2000; Akira et al, 2001, Bauer et al, 2001).

Por otra parte, otras células inmunes no específicas también intervienen en la etiopatogenia de la CU:

- Existe sobreproducción medular de monocitos en relación con el aumento de demanda de macrófagos en el foco inflamatorio.
- Los polimorfonucleares neutrófilos producen sustancias claves en la amplificación de la inflamación y en el daño tisular de la EII.
- Hay una activación de mastocitos, con el consiguiente incremento de niveles de histamina en la mucosa y por tanto, aumento de secreción intestinal.
- Los enterocitos y colonocitos humanos pueden expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y actuar como células presentadoras de antígeno, expresar receptores de citoquinas, secretar IL-7 (que activa células mononucleares de la lámina propia), TNF- α , quemoquinas y factores estimulantes de colonias (Selby et al, 1983). Se ha sugerido que los colonocitos en la CU muestran una capacidad defectuosa de inducir linfocitos T supresores: mientras que en condiciones normales las células epiteliales activan de manera preferente linfocitos T supresores CD8⁺ (lo cual contribuye a la tolerancia antigénica), los colonocitos de pacientes con CU activan principalmente linfocitos T colaboradores CD4⁺, dando lugar quizás a una amplificación de la respuesta inmune (Mayer y Eisenhardt, 1990).
- Se han descrito cambios cuantitativos y cualitativos en las neuronas del sistema nervioso entérico, aunque no está claro si son causa o consecuencia de la inflamación (Kubota et al, 1992).
- La producción de proteínas de la matriz extracelular por parte de los fibroblastos intestinales en la EII es anómala. Ello conlleva la proliferación de las capas musculares, el engrosamiento parietal o el desarrollo de estenosis que caracterizan a estas enfermedades (Stallmach et al, 1992).
- Las células endoteliales del colon con EII presentan una capacidad de fijar leucocitos marcadamente aumentada en comparación con células endoteliales

de intestino sano como consecuencia de un aumento de moléculas de adhesión. Ello contribuye en gran medida a la infiltración leucocitaria del foco inflamatorio al favorecer el paso de éstos desde el compartimiento intravascular al espacio intersticial. Desde el punto de vista terapéutico, un enfoque prometedor es el bloqueo de alguna de estas moléculas para impedir el acúmulo de leucocitos en el intestino inflamado (Grisham y Granger, 1999).

1.3.5 Visión integrada de la patogenia de la CU.

La CU se produce como consecuencia de la acción, en sujetos genéticamente predispuestos, de determinados factores medioambientales y de las bacterias que componen la microflora intestinal normal que desencadenan una serie de eventos, que dan lugar a la pérdida de tolerancia y activación tanto del sistema inmune intestinal como de otras células.

La respuesta inmune celular induce la activación de linfocitos T efectoras, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, etc. La respuesta humoral da lugar a la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. A través de la secreción de mediadores solubles y de la expresión de moléculas de adhesión se produce una amplificación de la síntesis y secreción de anticuerpos y autoanticuerpos, citoquinas, factores de crecimiento, eicosanoides, neuropéptidos, enzimas proteolíticas, radicales libres y óxido nítrico, que lleva al desarrollo de inflamación intestinal y daño tisular que caracterizan a esta enfermedad (Figura 2).

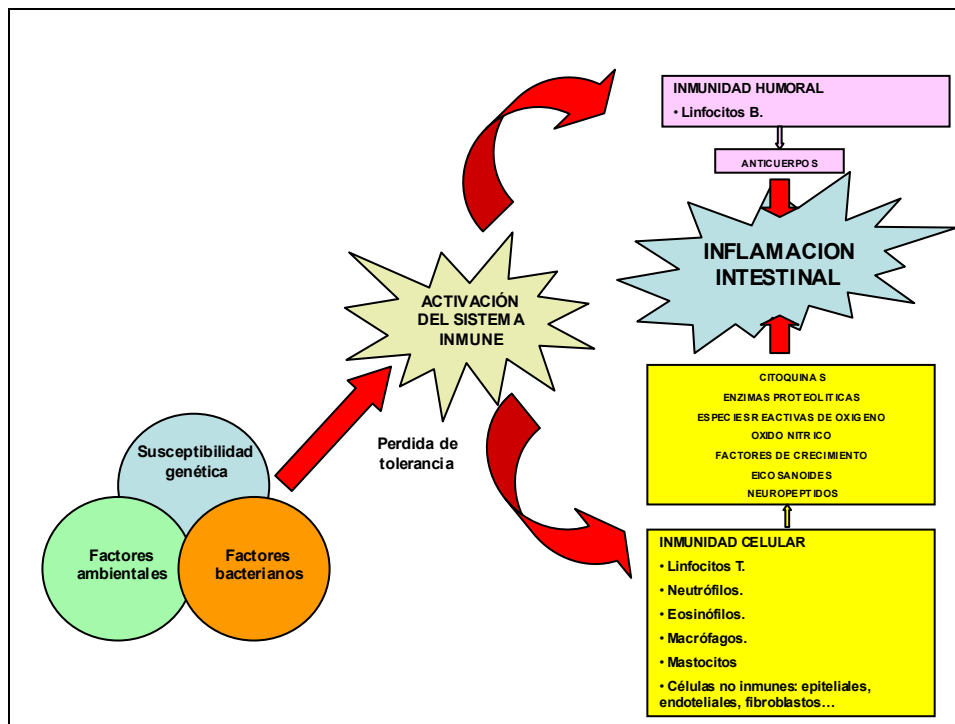


Figura 2: Patogénesis de la colitis ulcerosa.

1.4 . CLINICA DE LA COLITIS ULCEROSA.

1.4.1. Sintomatología intestinal de la CU.

La clínica de la CU varía según la extensión de la afectación colónica y el grado de actividad inflamatoria de la mucosa. Su inicio suele ser insidioso, de tal forma que el diagnóstico puede retrasarse semanas o meses. En otras ocasiones, en cambio, se presenta de forma grave con un curso rápido semejando cuadros infecciosos con los que debe realizarse el diagnóstico diferencial.

Los síntomas más frecuentes de la enfermedad son la rectorragia y la diarrea. El número de deposiciones está aumentado y su volumen disminuido, como consecuencia de la inflamación rectal, lo que a su vez ocasiona urgencia, tenesmo e incontinencia rectal. Cuando la afectación es intensa se produce la emisión de moco, sangre y/o pus que aparece mezclada con heces de consistencia normal en los casos de rectitis (incluso pueden presentar estreñimiento por enlentecimiento del tránsito colónico en el tramo sano) o sangre aislada, y heces líquidas cuando la afectación es más extensa (Katz, 1994).

El dolor abdominal suele ser de tipo cólico, estando en relación con el incremento de la tensión en la pared del colon inflamado durante sus contracciones musculares.

Otros síntomas sistémicos son astenia, anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y fiebre que aparecen junto con el dolor abdominal casi de forma exclusiva en las formas extensas. Otra sintomatología secundaria puede venir determinada por anemia ferropénica por la rectorragia, por la supresión medular característica de las enfermedades crónicas o secundaria a los fármacos utilizados en el tratamiento como la sulfasalacina, azatioprina o 6-mercaptopurina (Jewell, 1998).

1.4.2. Manifestaciones extraintestinales de la CU.

Entre el 25 y 70% de los pacientes con EII presentan síntomas en otros órganos, los cuales, pueden preceder a su diagnóstico e incluso ser más graves que las manifestaciones intestinales. Son ligeramente más frecuentes en la EC que en la CU. Se desconoce su etiología, atribuyéndose ésta, a mecanismos inmunológicos tales como los comentados en el capítulo anterior (para rev. ver López San Román, 2002a). Destacan las siguientes:

I. Manifestaciones cutáneo-mucosas:

Constituyen el 4-10% de todas las manifestaciones extraintestinales. Destacan por su frecuencia e importancia (Apgar 1991):

El *Eritema Nodoso* aparece entre el 2 y el 4% de los casos de CU en relación con los brotes de actividad de la enfermedad, pudiendo ser secundario igualmente al tratamiento con sulfasalazina. Suele afectar a pacientes con diagnóstico reciente de CU y se asocia fuertemente a la presencia de artropatía periférica.

El *pioderma gangrenoso* ocurre en menos del 2% de los enfermos. La asociación es tan típica que la aparición de pioderma en una persona joven obliga a descartar el diagnóstico de CU. Se presenta como pústulas o nódulos dolorosos que aumentan de tamaño formando úlceras indoloras con fondo necrótico y bordes de color violáceo. Puede responder al tratamiento de la CU pero su curso es más independiente y precisa tratamiento específico con antisépticos, corticoides locales o sistémicos, azatioprina, ciclosporina, tacrólimo o dapsona.

La aparición de *úlceras aftosas en la cavidad oral* ocurre en al menos el 10% de los pacientes con CU activa, resolviéndose cuando la enfermedad entra en remisión.

La *piodermatitis vegetante* es una manifestación rara pero que se asocia en el 90% de las veces a CU. Son pústulas amarillentas orales con tendencia a ulcerarse.

A pesar de que las anteriores son más características, las alteraciones cutáneas que presentan estos pacientes más frecuentemente son los exantemas medicamentosos por reacciones de hipersensibilidad y de fotosensibilidad en relación con sulfasalazina, y reacciones urticariformes secundarias a 5-aminosalicilatos (5-ASA).

II. Manifestaciones articulares:

La *artritis periférica aguda* ocurre entre el 10 y el 15% de los pacientes con brotes de CU. Se asocia a eritema nodoso y a uveítis en al menos el 50% de los casos (para rev. ver Levine y Lukawski-Trubish, 1995). Se han descrito dos tipos de artritis periféricas (para rev. ver Orchard et al, 1998):

- Tipo 1, pauciarticular, asimétrica, que afecta principalmente a grandes articulaciones y se relaciona claramente con la actividad inflamatoria colónica, especialmente cuando la afectación es extensa. Es la más frecuente y cura sin secuelas. Probablemente se debe a una respuesta cruzada entre antígenos sinoviales y bacterianos.
- Tipo 2, poliarticular, simétrica, de pequeñas articulaciones y de curso independiente de la EII. Puede mostrar un curso crónico y ocasionar desestructuración articular con secuelas invalidantes.

La *espondilitis anquilosante* afecta al 6-15% de los enfermos de CU y hasta en el 80% presentan un HLA-B27+. Su historia natural es independiente de la evolución de la CU, de tal forma que sus síntomas pueden preceder o aparecer años después del inicio de la enfermedad colónica. Se manifiesta como lumbalgia con rigidez de predominio matutino y mejora con el ejercicio. Pueden producirse secundariamente compresión de raíces nerviosas y producir ciática, radiculitis, subluxaciones vertebrales y a nivel cardíaco, insuficiencia aórtica y a trastornos de la conducción intramiocárdica (para rev. ver Levine y Lukawski-Trubish, 1995).

La *sacroileítis* aparece en el 10 al 15% de los casos, aunque el estudio gammagráfico detecta cambios leves en muchos más casos (hasta el 60%). La mayoría de los pacientes están asintomáticos, son HLA-B27 negativos y no progresan a formas más graves (Levine, 2000).

III. Manifestaciones oculares:

Son diversas aunque destacan (para rev. ver Levine y Lukawski-Trubish, 1995):

La *epiescleritis* se presenta en un 3-5% de los pacientes con CU, asociándose a la actividad de la enfermedad y respondiendo al tratamiento de la misma. Se presenta en forma de ojo rojo y doloroso. La *escleritis* es más rara y en general, más tórpida en su respuesta al tratamiento, pudiendo dejar lesiones residuales.

La *uveítis* aparece en el 0,5-2% de los casos de CU. Cursa con inflamación de las capas vasculares del ojo (iris, cuerpo ciliar y coroides). Se asocia menos a la actividad de la inflamación intestinal y responde peor al tratamiento de la misma.

La *conjuntivitis* se observa frecuentemente aunque no se ha conseguido demostrar asociación causal.

IV. Manifestaciones hepatobiliares:

La principal complicación hepática asociada a la CU es la *colangitis esclerosante primaria* (CEP), que aparece en aproximadamente el 3% de los pacientes, siendo una asociación típica de la CU; de hecho, la mitad de los pacientes con CEP desarrollan CU. La CEP es una enfermedad inflamatoria y fibrosante crónica de la vía biliar tanto intra como extrahepática, cuyo diagnóstico se realiza mediante colangiografía retrógrada endoscópica o colangio-resonancia magnética. En casi todos los casos existe afectación extrahepática, pudiendo aparecer estenosis dominantes susceptibles de tratamiento endoscópico. La afectación intrahepática comienza con un infiltrado linfocitario periductal tras el que se desencadena un patrón de respuesta inflamatoria mediado predominantemente por linfocitos T-cooperadores de tipo 1. Posteriormente se desarrolla la característica fibrosis periductal “en piel de cebolla” que afecta a los ductos biliares interlobulares y septales; estos finalmente se ven sustituidos por cordones fibrosos. La mayoría de los pacientes presentan un haplotipo HLA-DR3 B8 y títulos bajos de anticuerpos antimúsculo liso, anticélulas parietales gástricas, anticolonocito, antinucleares, así como altas titulaciones de pANCAs hasta en el 70% de los casos. La enfermedad

hepática es progresiva e independiente del curso de la CU. Los pacientes afectados acaban por desarrollar colestasis progresiva, con colangitis agudas de repetición sobreañadidas y cirrosis biliar secundaria, con deterioro de la función hepática y aparición de complicaciones relacionadas con hipertensión portal. La supervivencia desde el diagnóstico se estima en unos 10-12 años. Además es característico el desarrollo de colangiocarcinoma, habiéndose descrito entre el 10 y el 20% en series de necropsia (Balan y Laruso, 1995).

En brotes graves de CU se producen *elevaciones de bajo rango de transaminasas y de fosfatasa alcalina* que regresan a valores normales durante los períodos de remisión. La *esteatosis* es frecuente pero poco relevante. Se debe a varias causas como la malnutrición, esteatosis, sepsis y toxicidad farmacológica (para rev. ver López San Román, 2002a).

La *hepatitis autoinmune* aparece entre el 0.5 y el 5% de los casos de CU. Se caracteriza por citolisis, hipergammaglobulinemia, anticuerpos antinucleares (ANAs) y antimúsculo liso (AML) positivos (para rev. ver López San Román, 2002a).

V. Manifestaciones pancreáticas:

La *hiperamilasemia* se observa entre el 15 y 20% de los pacientes con EII. Especialmente las pancolitis pueden asociarse a pancreatitis crónica fibrosante con atrofia uncinar, de forma que suele aparecer antes del diagnóstico de CU (Barthet et al, 1999).

VI. Manifestaciones pulmonares:

Pueden asociarse a una *enfermedad pulmonar intersticial* con alteración de la difusión. Constituyen un raro problema en el curso clínico de estos pacientes aunque existe una afectación leve en gran cantidad de pacientes (hasta un 55%).

También se ha descrito *laringotraqueitis* aguda en la CU (Kuzela et al, 1999).

VII. Manifestaciones hematológicas:

La *anemia hemolítica* es una manifestación muy poco frecuente (25-30 casos descritos) pero con gran relevancia clínica dada su gravedad. Suele producirse en casos de pancolitis (Giannadaki et al, 1997).

Puede asociarse *anemia ferropénica* por pérdida crónica de sangre o por trastorno nutricional.

Dado que la EII se acompaña de un estado de hipercoagulabilidad en los brotes, debe tenerse en cuenta la posibilidad de *trombosis vascular*. Se debe a la trombocitosis y aumento de factores de coagulación (como el I, V y VIII), de factores de agregación plaquetaria y descenso de antitrombina-III (Chiarantini et al, 1997). Su incidencia en la clínica es baja (1 por 1000) pero constituye la tercera causa de muerte en los pacientes con CU por detrás de las complicaciones de la propia enfermedad y el adenocarcinoma de colon. En series de autopsia la prevalencia es mayor, describiéndose hasta en el 30% de los pacientes (Koenigs et al, 1987). Los vasos más frecuentemente afectados son las venas del sistema profundo, seguidas de las acontecidas a nivel capilar y por último, las arterias; especialmente de miembros inferiores y pelvis. También debe estarse alerta ante la aparición de tromboembolismo pulmonar como complicación de lo anterior.

Se ha descrito asociación a una *arteritis de la aorta y troncos supraórticos* similar a la Enfermedad de Takayasu, y por tanto, manifestándose con clínica neurológica (para rev. ver López San Román, 2002a).

VIII. Manifestaciones cardíacas:

Se han descrito casos de *bloqueos de conducción auriculo-ventricular* y *pericarditis*, además de las complicaciones anteriormente descritas derivadas de la espondilitis anquilosante (para rev. ver López San Román, 2002a).

IX. Manifestaciones neurológicas:

Se asocian manifestaciones derivadas de los problemas vasculares anteriormente descritos (trombosis de venas y senos craneales) y se han descrito polineuritis y mononeuritis (Lossos et al, 1995).

X. Manifestaciones tiroideas:

Son las únicas manifestaciones endocrinas asociadas de forma característica a la CU. Son de origen autoinmunitario con autoanticuerpos antitiroglobulina positivos y cursan como un hipertiroidismo (para rev. ver López San Román, 2002a).

1.4.3. Complicaciones de la CU.

I. Complicaciones anorrectales y perianales:

Los pacientes con CU pueden desarrollar ocasionalmente fistulas y abscesos perianales, pero su presencia debe sugerir el diagnóstico de EC, especialmente en los casos de enfermedad perianal grave y recidivante (para rev. ver Nos e Hinojosa, 2002).

II. Fístulas y abscesos:

Son más típicas de la EC (aparecen hasta en el 35% de los casos) siendo excepcionales en la CU (para rev. ver Nos e Hinojosa, 2002).

III. Estenosis intestinal:

Es otra complicación típica de la EC por la afectación transmural que caracteriza a este cuadro. En la CU es más rara y suele localizarse en la unión recto-sigmoidea (para rev. ver Sans y Panés, 2002).

IV. Hemorragia masiva.

Puede ocurrir durante brotes agudos graves de la enfermedad, y en general responde al tratamiento médico de la misma y con las medidas habituales de corrección de la anemia y la hipovolemia. En casos extremos puede ser indicación de colectomía urgente (para rev. ver López San Román, 2002b).

V. Perforación aguda del colon:

La perforación del colon suele ser consecuencia del desarrollo de un megacolon tóxico, aunque también se ha descrito aisladamente. Es la complicación más grave de la EII, apareciendo en el 4,5% de las formas fulminantes de CU. La colectomía urgente una vez estabilizado el paciente es el tratamiento de elección (para rev. ver López San Román, 2002b).

VI. Colitis fulminante:

Es la inflamación grave del colon asociada a toxicidad sistémica con o sin dilatación colónica. Se observa hasta en el 10-15% de los pacientes con CU, necesitando hasta un tercio de ellos colectomía en el brote inicial y otro tercio a lo largo del primer año de seguimiento. Se caracteriza por la presencia de fiebre elevada, taquicardia, leucocitosis, anemia, alteraciones hidroelectrolíticas,

distensión abdominal, pérdida de peso, dolor abdominal y hemorragia grave (para rev. ver Mínguez Pérez et al, 2002).

VII. Megacolon tóxico:

Se define por la presencia dentro de un brote agudo grave de CU, de una dilatación total o segmentaria no obstructiva del colon. Se presenta en cualquier momento de la evolución de la enfermedad, apareciendo entre el 1 y 5% de los pacientes. Se produce por inflamación y adelgazamiento de todas las capas del colon, de forma que se perfora fácilmente o al mínimo contacto durante la cirugía (para rev. ver Mínguez Pérez et al, 2002). Se diagnostica básicamente en la radiología simple de abdomen por un diámetro mayor de 6 cm en el colon transverso (Figura 3).



Figura 3: Imagen radiológica de un paciente con CU en el que se aprecia la enorme dilatación de colon transverso.

La mortalidad del cuadro alcanza el 20% e incluso puede aumentar según la existencia de perforación (hasta el 40%), la edad (hasta el 30% en mayores de 40 años) y del momento de la intervención quirúrgica (32% si es tardía) (Sutherland, 1993). Aproximadamente la mitad de los cuadros se resuelven con tratamiento médico intensivo, aunque si éste no es efectivo en un plazo de 24-48

horas o ya se ha producido perforación o shock, está indicada la colectomía total con ileostomía urgente (Sheth y LaMont, 1998).

VIII. Carcinoma colorrectal (CCR).

Múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que la CU predispone al desarrollo de CCR, existiendo mucha disparidad de su incidencia en los distintos estudios, desde un 1.4% a los 18 años de evolución de la enfermedad al 34% a los 25 años (Kewenter et al, 1978; Hendriksen et al, 1985). Los factores de riesgo de desarrollar CCR en los pacientes con CU son la duración prolongada de la enfermedad, la presencia de una afectación inflamatoria extensa (especialmente en la pancolitis) y la asociación a CEP. No se ha demostrado, en cambio, correlación entre la actividad de la enfermedad y el riesgo de neoplasia, pero el hecho de que la mayor frecuencia de colectomías totales sea en pacientes con enfermedad más activa constituye probablemente un sesgo fundamental en esta valoración. Asimismo parece existir un cierto efecto protector del tratamiento con sulfasalazina y otros 5-ASA (Lewis et al, 1999).

El desarrollo de CCR en esta patología no es el habitual del cáncer colorrectal esporádico. No lo suele hacer siguiendo la vía pólipo adenomatoso – pólipo adenomatoso con displasia – carcinoma “in situ” – carcinoma invasivo, ni tampoco poseen las mutaciones que afectan a tres genes supresores de tumores (APC, p53 y DCC) y un oncogén (*K-ras*). La mutación en el gen APC es relativamente poco habitual en el CCR asociado a CU. Las mutaciones en p53, que se producen tardíamente en la vía de desarrollo de los CCR esporádicos, parecen ocurrir de forma precoz en la vía hacia la displasia y el cáncer en el seno de la CU, habiéndose detectado incluso en tejido no displásico. Por último, las mutaciones en el gen *K-ras* se han identificado con frecuencia variable, en los que parecen producirse de manera más tardía y menos habitual que en los tumores esporádicos (Lewis et al, 1999).

En general se recomienda realizar un programa de detección precoz, aunque la frecuencia de las colonoscopias y el número de biopsias requerido para detectar displasia es un tema controvertido. Se aconseja iniciar las colonoscopias cada 1-2 años, con 3-4 biopsias cada 10 cm desde ciego a recto y biopsias de cualquier lesión sospechosa, a partir de 8 años de evolución en las pancolitis y de 15 años en las colitis izquierdas (para rev. ver Obrador y Riera, 2002) -Figura 4-.

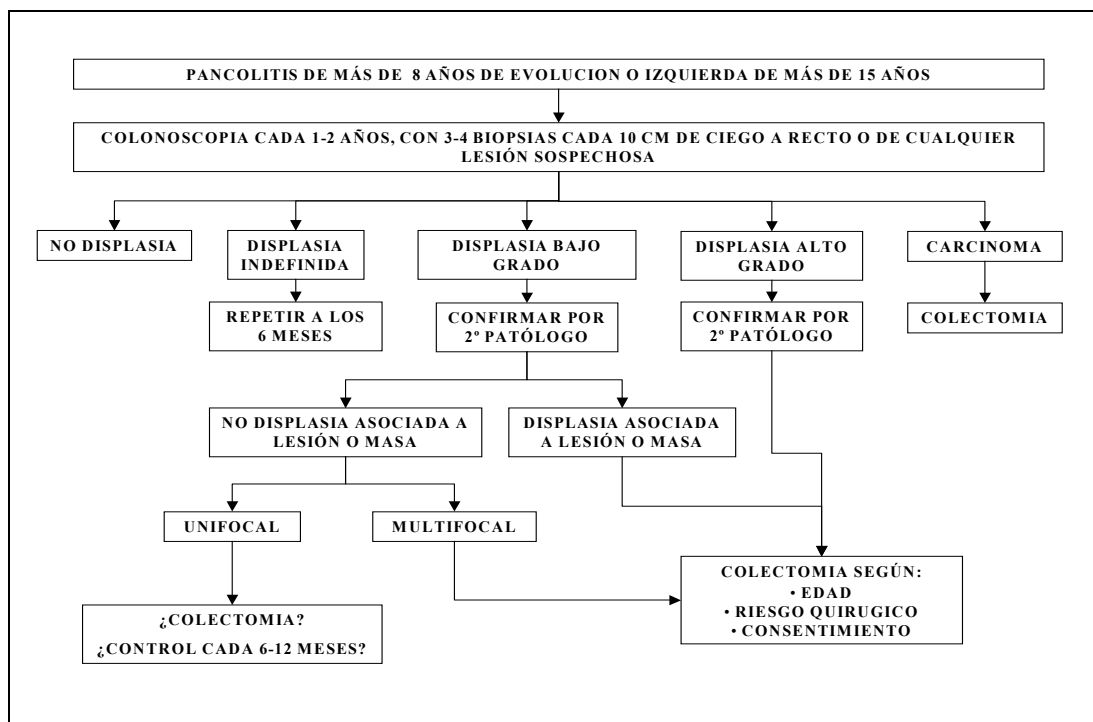


Figura 4: Algoritmo de detección precoz de CCR en pacientes con CU.

1.4.4. Evaluación de la gravedad clínica de la CU.

Existen diversos índices de gravedad de la CU que han aparecido a lo largo de la historia. El primer índice de actividad en la CU fue desarrollado en los años 50 por Truelove y Witts para la realización del primer ensayo clínico controlado en EII (Truelove y Witts, 1955), atendiendo fundamentalmente a variables clínicas y analíticas de uso habitual en la práctica clínica. Una modificación de ella se utiliza aún hoy día (Nos e Hinojosa, 2003) -Tabla 2-. Aunque sea una escala semicuantitativa y no validada de forma estricta, sigue siendo uno de los índices más utilizados en la práctica clínica al haber gran experiencia consolidada por el tiempo; de hecho es la escala recomendada en el reciente 13º Congreso Mundial de Gastroenterología en Montreal (Silverberg et al, 2005). Como inconveniente tiene que en ocasiones no refleja con exactitud la gravedad, pudiendo infraestimar casos con grave repercusión clínica que se clasificarían como moderados por este índice, y a la inversa, en casos de proctitis con elevado número de deposiciones pero sin afectación del estado general.

El “Índice de Actividad” (“Activity Index”, AI o índice de Seo) es una escala cuantitativa desarrollada sobre un análisis de regresión múltiple en el que los factores

fundamentales que influían en la gravedad de la enfermedad fueron parámetros clínicos como el sangrado rectal o el número de deposiciones, parámetros analíticos como la velocidad de sedimentación glomerular (VSG), la cifra de hemoglobina o la cifra de albúmina (Seo et al, 1992) y hallazgos endoscópicos. Es un intento de lograr una valoración numérica para diferenciar los estadios no adecuadamente diferenciados en el índice de Truelove-Witts. Ha demostrado tener una buena correlación con las alteraciones endoscópicas y ser superior al anterior, en la capacidad de evaluación de la respuesta a los tratamientos y de predicción de alcanzar la remisión (Seo et al, 1998; 1995). Su mayor sensibilidad conlleva mas dificultad en la recogida de datos y en su cálculo matemático, lo que limita su aplicación clínica.

VARIABLE	1 Punto	2 puntos	3 Puntos
Nº de deposiciones/día	<4	4-5	>5
Sangre en heces	-/+	++	+++
Temperatura axilar (°C)	<37	37-37.5	>37.5
Hemoglobina (g/L)			
-Hombres	>14	10-14	<10
-Mujeres	>12	9-12	<9
VSG	<15	15-30	>30
TOTAL			
6 ptos=Enf inactiva. 7-10 ptos=Brote leve. 11-14 ptos=Brote moderado. 15-18 ptos=Brote grave.			

Tabla 2: Índice de Truelove-Witts modificado.

El “Índice de Actividad Clínico” desarrollado por Rachmilewitz incluye una datación numérica de parámetros clínicos, endoscópicos y de laboratorio en la determinación de la actividad de la enfermedad (Rachmilewitz, 1989) -Tabla 3-. Otros índices empleados son el de Powell-Tuck que incluye síntomas, signos exploratorios y endoscópicos (Powell-Tuck et al, 1978) y el de la Clínica Mayo (Li y Sutherland, 2002).

VARIABLE	Puntos	VARIABLE	Puntos
<u>N° de deposiciones/día</u>		<u>Dolor Abdominal</u>	
0-2	0	No	0
3-4	1	Ligero	1
5-6	2	Moderado	2
7-9	3	Grave	3
10	4		
<u>Diarrea nocturna</u>		<u>Estado General</u>	
No	0	Perfecto	0
Si	1	Muy bueno	1
		Bueno	2
		Regular	3
		Malo	4
		Terrible	5
<u>Rectorragia</u>		<u>Sensibilidad abdominal</u>	
0%	0	No	0
<50%	1	Ligera y localizada	1
>50%	2	Moderada y difusa	2
100%	3	Grave	3
<u>Incontinencia fecal</u>		<u>Uso de antidiarreicos</u>	
No	0	No	0
Si	1	Si	1
TOTAL			
<6 ptos=Enf leve			
6-12 ptos=Enf Moderada			
>12=Enf Grave			

Tabla 3: Índice de Gravedad Clínica de la Colitis Ulcerosa.

1.5. DIAGNÓSTICO DE LA CU.

No existe ningún síntoma ni signo de la enfermedad que sea patognomónico, por lo que para llegar al diagnóstico de CU deben reunirse una serie de datos clínicos, biológicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos sugestivos de ella y descartar otras entidades que pueden cursar con sintomatología parecida por inflamación de colon. Los criterios propuestos por Lennard-Jones son los más comúnmente utilizados. Consideran unos criterios de inclusión y otros de exclusión (Lennard-Jones, 1989) -Tabla 4-

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> • Afectación difusa de la mucosa, sin granulomas (histología). • Afectación del recto (endoscopia). • Afectación, en continuidad a partir del recto, de una porción del colon (endoscopia o enema opaco). 	<ul style="list-style-type: none"> • Colitis infecciosa (microbiología). • Colitis isquémica (factores de riesgo, localización, histología). • Proctitis/colitis actínica (antecedente de radioterapia). • Úlcera rectal solitaria (localización, histología). • Enfermedad de Crohn (afectación de intestino delgado). • Lesión anal compleja (exploración física). • Granuloma (histología).

Tabla 4: Criterios diagnósticos de Lennard-Jones de la CU.

1.5.1. Criterios biológicos:

Las fases activas suelen venir acompañadas de un aumento de diversos parámetros analíticos conocidos como “reactantes de fase aguda” como la velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva (PCR), orosomucoide, fibrinógeno, lactoferrina, amiloide A sérico, alfa-1-antitripsina.

El más utilizado es la *VSG* que se correlaciona estrechamente con los índices clínicos y endoscópicos. Sin embargo, depende de la morfología eritrocitaria, del Hcto y de la tasa de proteínas plasmáticas y además, refleja poco los cambios de actividad y la gravedad de las formas distales (Nielsen et al, 2000; Bitton et al, 2001).

La *PCR* es un parámetro semejante a la *VSG* con una vida media de 19 horas por lo que es útil para monitorizar la respuesta terapéutica (Bitton et al, 2001).

La *leucocitosis con desviación izquierda y trombocitosis* son dos parámetros comúnmente elevados pero inespecíficos ya que otros procesos concurrentes o el propio tratamiento, pueden elevarlos.

Los niveles de *albúmina sérica* suelen estar disminuidos en periodos de actividad debido a la malnutrición y al estado hipercatabólico existente en estos pacientes. Sin embargo, es poco útil para monitorizar la respuesta al tratamiento.

La detección de los *anticuerpos anticitoplasma de los neutrófilos (pANCA)* en combinación con los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae (ASCA)* puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial entre la EC y la CU ya que la presencia de *ASCA* es frecuente en la EC pero no en la CU (Present y Banks, 1999).

La *Calprotectina fecal* es una proteína citoplasmática de los neutrófilos que se correlaciona con la actividad endoscópica e histológica y es factor predictivo de recidiva (Roseth et al, 1997; Tibble et al, 2000).

1.5.2. Criterios radiológicos:

En la *radiología simple de abdomen* puede valorarse a través del luminograma aéreo, el estado de la mucosa y la extensión de la inflamación a través de la visualización de irregularidades de la mucosa, ulceraciones en su superficie y acortamiento o desaparición de las haustras. Asimismo, la cantidad de gas intraluminal se relaciona con la gravedad de la colitis.. Asimismo permite detectar la existencia de perforación por neumoperitoneo o de gas intramural que puede preceder a la anterior (Scotiniotis et al, 1999).

La *radiología baritada* permite valorar la gravedad de la colitis de forma que en los casos leves, se observa un aspecto granular de la superficie cólica con un punteado fino, y en los casos más graves, ulceraciones más extensas y profundas de la mucosa. Su principal indicación hoy día es completar el estudio de extensión en los casos en los que la colonoscopia haya sido incompleta (para rev. ver Sans y Panés, 2002).

La *gammagrafía con leucocitos marcados con tecnecio-HMPAO* permite establecer la extensión de la CU de forma precisa e identificar su actividad (Scholmerich et al, 1988).

El papel de la *ecografía abdominal* en esta patología radica en el estudio de extensión de aquellos pacientes en los que la colonoscopia no ha sido completa. La ecografía hidrocólica es útil en la evaluación de la extensión y la actividad de la CU, habiéndose sugerido su superioridad con respecto a la gammagrafía con leucocitos marcados (Bru et al, 2001).

El *TC abdominal* tiene una utilidad muy reducida en la CU, permitiendo valorar el engrosamiento de la pared cólica y la extensión de la enfermedad (Gore et al, 1996).

1.5.3. Criterios endoscópicos:

La endoscopia es la exploración complementaria que permite confirmar el diagnóstico de CU y valorar la gravedad. En los casos más leves se encuentra una disminución o desaparición del patrón vascular, edema y eritema. En los casos moderados se observa eritema intenso, friabilidad y ulceraciones superficiales y, en los

casos graves, friabilidad importante con sangrado espontáneo y ulceraciones extensas y profundas (Quinn et al, 1989).

Asimismo, permite descartar sobreinfección por citomegalovirus u otros microorganismos que pueden aparecer por el tratamiento esteroideo o inmunosupresor (Alcalá et al, 2000).

Dado que hay una buena correlación entre gravedad, la extensión y el aspecto endoscópico de las lesiones, se han desarrollado diferentes índices para valorar la gravedad de la afectación inflamatoria aguda de la mucosa colónica en el estudio endoscópico. Destaca el descrito por Rachmilewitz que valora 4 parámetros: la presencia de granularidad de la mucosa colónica, la morfología macroscópica de los vasos sanguíneos, la vulnerabilidad de la mucosa, y la presencia de daño macroscópico de la misma determinado por la presencia de exudado mucoso o de fibrina, erosiones o úlceras (Rachmilewitz, 1989).

1.5.4. Criterios histológicos:

I. Hallazgos macroscópicos.

La CU es una enfermedad que afecta exclusivamente al colon siendo la distribución de la inflamación variable. La afectación es habitualmente más intensa en el recto y se extiende, de forma continua, en sentido proximal en una longitud variable: entre el 40 y el 50% de los pacientes presentan una enfermedad limitada al recto (rectitis o proctitis ulcerosa) o al recto y sigma (rectosigmoiditis ulcerosa); del 30 al 40 % de los casos muestran afectación inflamatoria más allá del sigma pero sin afectar a todo el colon (colitis izquierda y colitis extensa); el 20% restante desarrollan inflamación que afecta a todo el colon (pancolitis).

Asimismo puede haber presentaciones atípicas: puede objetivarse una mucosa rectal aparentemente indemne como consecuencia del uso de tratamientos tópicos (supositorios, enemas o espuma), y más raramente en brotes agudos graves, una afectación en el colon proximal mucho más grave que en el recto. Por otro lado, pueden aparecer áreas aisladas de afectación cecal o apendicular en el contexto de una colitis izquierda (parche cecal). Hasta en el 10%, puede observarse una ileítis terminal limitada denominada “ileítis por reflujo”.

En casos de inflamación leve, la mucosa colónica aparece hiperémica, edematosa y granular, mientras que en la afectación grave se observa una mucosa hemorrágica, con lesiones ulceradas inicialmente de pequeño tamaño pero que

pueden llegar a confluir y profundizar hacia la lámina propia. Más raramente pueden parecerse a las úlceras lineales serpenteantes de la EC. Con frecuencia los bordes necrosados de úlceras adyacentes conectan entre sí creando puentes mucosos. En la enfermedad de larga evolución suelen aparecer los llamados “pseudopólipos” como resultado de la regeneración epitelial exagerada. Durante los periodos de remisión, la mucosa puede ser macroscópicamente normal, pero tras años de recurrencias va presentando una apariencia atrófica con disminución del diámetro de la luz y pérdida de la haustración normal y persistencia de los pseudopólipos. Más raramente pueden aparecer estenosis fibrosas, aunque mucho menos frecuentemente que en la EC.

II. Hallazgos microscópicos.

El diagnóstico anatomopatológico de la CU implica una serie de datos característicos, aunque no patognomónicos, a nivel histológico. Los fenómenos inflamatorios se limitan a la mucosa a diferencia de la EC. La lámina propia aparece edematosa y sus capilares dilatados y congestivos con extravasación de hematíes. Existe un infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y mastocitos de mayor a menor número. Además ese infiltrado pasa a ser transmucoso. Los neutrófilos invaden el epitelio, habitualmente en las criptas, originando los abscesos crípticos característicos de la enfermedad (Figura 5). También pueden invadir la pared de la cripta (criptitis) o producir daño epitelial destruyendo las criptas (Dayal y DeLellis, 1990; Jewel, 1998). Entre los cambios arquitecturales que ocurren en la cripta destacan:

- Acortamiento de las criptas y aumento de la separación entre ellas y la *muscularis mucosae*.
- Desaparición de las criptas.
- Bifurcación y ramificación de las criptas.

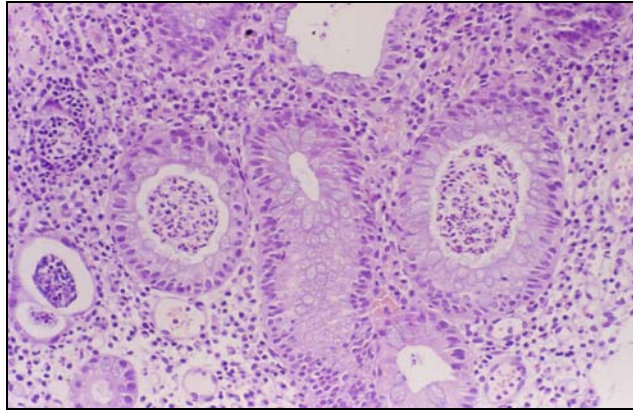


Figura 5: Abscesos cripticos característicos de la histología de la CU.

Es frecuente el acúmulo de células plasmáticas entre el fondo de la criptas y la *muscularis mucosae* (lo que se conoce como plasmocitosis basal), constituyendo otro dato fiable para el diagnóstico de CU (Schumacher et al, 1994).

Desde el punto de vista estructural, además de las alteraciones descritas en las criptas, existe una irregularidad de la superficie epitelial que adquiere un aspecto villiforme o pseudovilliforme. En los casos de mayor gravedad, la superficie epitelial se aplanada y ulcera hasta la *muscularis mucosae*. En casos de dilatación aguda grave, la ulceración puede incluso alcanzar la muscular propia y dar lugar a un patrón de miocitolisis difusa. Además, los pequeños vasos inmediatamente subyacentes a una zona ulcerada pueden mostrar fenómenos de vasculitis aguda. Todos estos datos también pueden observarse en la EC, sin embargo son más frecuentes en la CU. (Jenkins et al, 1997). Igualmente, apoyan el diagnóstico de CU, la existencia de alteraciones más intensas en zonas distales de colon y la intensa depleción de mucina.

En los períodos de remisión clínica, la histología colónica puede regresar a la normalidad, sobre todo en brotes leves al comienzo de la historia natural de la CU; pero con el tiempo es más frecuente la evidencia de distorsión arquitectural con disminución del número de las criptas, glándulas bífidas y acortadas, así como la presencia de otros hallazgos como la metaplasia de las células de Paneth, la hipertrofia neuronal y la hiperplasia fibromuscular de la *muscularis mucosae*.

El estudio histológico no sólo es importante desde el punto de vista diagnóstico sino que su examen permite también una evaluación de la actividad de la enfermedad. Este uso de la histología se introdujo en los años 50 evaluando

hechos como la naturaleza y distribución del infiltrado inflamatorio, el grado de destrucción glandular y la ulceración (Truelove y Richards, 1956). Posteriormente se han desarrollado diversos baremos que se utilizan especialmente para estudios de investigación y que son de especial utilidad en la evaluación de los períodos de actividad de la enfermedad (Geboes et al, 2000).

También es importante en la identificación de complicaciones tardías como la displasia o el cáncer (Goldman, 1994), mediante colonoscopia con toma de biopsias múltiples. Para mejorar la identificación de la displasia se han desarrollado técnicas de citometría de flujo para detectar cambios en el contenido nuclear de ADN, técnicas de inmunohistoquímica para objetivar mutaciones del gen supresor de tumores p53, y otras.

1. 6. HISTORIA NATURAL Y PRONÓSTICO DE LA COLITIS ULCEROSA.

En torno a un 70% de los pacientes con CU presentan una forma recurrente de la enfermedad, con brotes de actividad que alternan con fases de remisión que pueden durar desde pocas semanas hasta varios años. Otro 20% de los enfermos desarrollan un curso crónico continuo y un 10% restante presentan como forma de debut un brote agudo grave que requiere colectomía urgente. A pesar del curso clínico recurrente, la mayoría de los pacientes son capaces de llevar una vida familiar, social y laboral prácticamente normal con cierto grado de deterioro de la calidad de vida especialmente durante los brotes agudos.

La complicación más frecuente de la CU a largo plazo es la refractariedad al tratamiento médico en forma de diarrea, hemorragia y alteraciones nutricionales.

Aproximadamente un tercio del total de los pacientes requieren cirugía a lo largo de su vida, especialmente en los pacientes con pancolitis al inicio de la enfermedad (hasta en un 60%) (Farmer et al, 1993).

En lo referente a la progresión anatómica de la inflamación, la mitad de los pacientes con diagnóstico inicial de rectitis y rectosigmoiditis presentan una extensión de la enfermedad a lo largo de la historia de la enfermedad con un curso relativamente benigno. Más del 70% de los pacientes con colitis izquierda desarrollan pancolitis, con un curso clínico intermedio entre las formas distales y los casos con afectación de todo

el colon. Factores predisponentes de aumento de extensión de la enfermedad son un curso clínico inicial grave (OR 14.8, $p < 0.0001$), la presencia de manifestaciones articulares (OR 3.7, $p < 0.005$), la extensión de la inflamación al diagnóstico (izquierda vs proctitis: OR 2.5, $p < 0.0001$), la hemorragia grave precoz en el curso de la enfermedad (OR 1.7, $p = 0.07$) y el diagnóstico a edades tempranas (OR 0.88, $p = 0.06$) (Farmer et al, 1993). Un trabajo reciente demuestra como los niveles de actividad de la isoforma inducible y constitutiva del NO predicen la progresión de la enfermedad a los 2 años de seguimiento (Menchén et al, 2004).

La mortalidad de la CU es del 2% con los tratamientos actualmente disponibles. A largo plazo, la supervivencia está mínimamente disminuida respecto a la de la población general.

1. 7. TRATAMIENTO DE LA COLITIS ULCEROSA.

Un correcto tratamiento a largo plazo de la CU debe ser multidisciplinar y vendrá marcado por la localización anatómica afectada y la gravedad de la enfermedad. En términos generales se comienza el tratamiento con 5-ASA y se van introduciendo agentes más potentes a medida que la enfermedad no va respondiendo a los primeros (Tabla 5). Además deben considerarse otros tratamientos generales como:

- Una dieta exenta de lácteos y baja en residuos durante el brote activo.
- Suplementos de calcio y vitamina D en pacientes con esteroides.
- Nutrición enteral en pacientes con malnutrición o parenteral en caso de intolerancia alimentaria, megacolon tóxico u oclusión intestinal.
- Sueroterapia y aporte de iones como el potasio en casos graves.
- Anticoagulación profiláctica en pacientes hospitalizados con brote para evitar episodios tromboembólicos.

1.7.1. 5-Aminosalicilatos.

Los aminosalicilatos constituyen la primera elección de tratamiento tanto en los brotes agudos leves-moderados como en el mantenimiento de la remisión de todos los pacientes con CU (Matilla et al, 2001). El mecanismo de acción de estos fármacos aunque no se conoce por completo parece deberse a una inhibición del metabolismo del

ácido araquidónico y por tanto, de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos sobre el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio, a la inhibición de la transcripción del factor nuclear kappa B (NF-κB) y una actividad antioxidante.

La *sulfasalazina* fue el primero que demostró su eficacia en los años 50. Está compuesta por ácido aminosalicílico (5-ASA o mesalazina), componente activo del fármaco, ligado a sulfapiridina, una sulfamida que actúa como molécula transportadora. El ácido aminosalicílico se libera mediante la actuación de las bacterias colónicas que rompen su unión a la sulfapiridina. Su uso está limitado por la elevada incidencia de efectos adversos (hasta en un 25% de los pacientes) atribuidos a la sulfapiridina, para lo que se han desarrollado:

- Formas galénicas de 5-ASA que carecen de esos efectos adversos.
- Fórmulas de liberación retardada en las que el principio activo se recubre de una resina acrílica que se disuelve a pH mayor de 6 o 7 a nivel de íleon y colon.
- Fórmulas de liberación sostenida, que recubren microgránulos de 5-ASA con una membrana de celulosa que libera el compuesto a lo largo de todo el tubo digestivo de manera tiempo-dependiente.
- Fórmulas unidas a transportadores inertes (balsalazida) o compuestos de dos moléculas de 5-ASA que requieren la acción de bacterias colónicas para su liberación (olsalazina).

Se ha desarrollado además la administración tópica rectal de 5-ASA en forma de supositorios, enemas o espuma para el tratamiento de las formas distales de CU.

1.7.2. Corticoides (CC).

Los corticoides sistémicos administrados bien por vía oral o intravenosa, constituyen en la actualidad, el tratamiento de primera elección de los brotes agudos graves de CU y cuando el tratamiento con aminosalicilatos no sea efectivo en la inducción de la remisión de brotes leves-moderados. La *prednisona* oral o la *prednisolona* se emplean en brotes moderados-graves a dosis de 60 mg/día, reservándose la administración intravenosa a pacientes con brotes graves a dosis de 1mg/kg peso al día. En estos casos la mayoría de los enfermos tienen respuesta en 7-10 días. Una vez alcanzada la remisión clínica, se debe reducir la dosis de manera gradual

hasta su suspensión, ya que no está indicada su utilización como fármacos de mantenimiento de la remisión (para rev. ver Doménech, 2002).

La administración en forma de enema de los corticoides convencionales en las formas distales de la CU está actualmente en desuso, por la demostración de la superioridad terapéutica y la menor incidencia de efectos adversos de los aminosalicilatos sistémicos o la budesonida tópica que, administrada en enemas muestra una eficacia similar a los corticoides convencionales en el tratamiento de las formas distales de CU (para rev. ver Doménech, 2002).

1.7.3. Inmunosupresores.

La introducción de fármacos inmunosupresores en el tratamiento de la CU está indicada en casos de enfermedad refractaria a los fármacos de primera línea o en aquellos pacientes en los que la disminución de la dosis o la retirada de los corticoides tras un brote, supone la recidiva de la sintomatología inflamatoria aguda en más de 2 en 6 meses o 3 en un año (corticodependencia) (Sandborn, 1996).

La *azatioprina (AZA)* o su metabolito *6-mercaptopurina (6-MP)* son fármacos que inhiben la síntesis de purinas y parece que impiden la acción de diversos subgrupos de células T. Son el tratamiento de elección para el mantenimiento de remisión en casos de corticodependencia, logrando la retirada de los esteroides en alrededor del 65% de los pacientes tratados. Tienen como inconveniente, el lento inicio de su efecto terapéutico (entre 2 y 3 meses) por lo que se deben mantenerse un mínimo de 6 meses antes de considerar su fracaso terapéutico. Sus efectos adversos más frecuentes son la intolerancia digestiva, la pancreatitis aguda por mecanismo alérgico, la mielosupresión y la toxicidad hepática. La determinación de los niveles de tiopurina metiltransferasa, enzima que los metaboliza, permite identificar a los pacientes con riesgo elevado de desarrollar efectos secundarios medulares y hepáticos.

La *ciclosporina A* inhibe de forma altamente selectiva los linfocitos T, al impedir la formación de un complejo con un receptor proteico citoplasmático, con la consiguiente inhibición de la actividad de la calcineurina. Esto provoca una inhibición de la respuesta celular inicial a estímulos antigénicos. La administración intravenosa de ciclosporina continua siendo el tratamiento de elección para los brotes agudos graves refractarios, habiendo demostrado inducir la remisión clínica en más del 60% de estos

pacientes, prevenir la recidiva una vez alcanzada la remisión y evitar la colectomía. No está claro, sin embargo, el papel de la ciclosporina oral en el mantenimiento de remisión en casos de corticodependencia.

Otros inmunosupresores como el *metotrexato*, el *micofenolato mofetil* y el *tacrólimo* pueden ser alternativas en casos de corticodependencia, pero se precisan más estudios para generalizar su uso.

1.7.4. Fármacos anti-TNF α .

El empleo reciente del agente anti-TNF- α , *infliximab* ha resultado un gran avance en el tratamiento de la EII y más concretamente de la EC. Es un anticuerpo monoclonal compuesto por una región constante de complemento humano IgG1 y una región variable de fijación antigénica derivada de ratón. Su acción depende en gran parte de la capacidad para fijarse al precursor del TNF- α en la superficie celular, desempeñando así un papel proapoptótico. Si los primeros resultados de los estudios en CU no eran prometedores, tras la publicación de los resultados de los estudios fase III, ACT 1 y ACT 2 se abre una puerta a su uso en pacientes refractarios a los tratamientos previos. La dosis más indicada es de 5 mg/kg a las 0, 2 y 6 semanas y cada 8 semanas (Rutgeerts et al, 2005). Como principales complicaciones se han descrito reactivaciones de tuberculosis y síndromes lupus-like. También se ha insinuado un incremento en el riesgo de padecer linfoma, si bien esta asociación no está claramente demostrada.

La multitud de recientes estudios que tratan de dilucidar los mecanismos etiopatogénicos de la EII han dado lugar al desarrollo de una gran cantidad de compuestos interesantes para el tratamiento de esta entidad. Éstos van dirigidos principalmente a interactuar con las diferentes citoquinas que desempeñan un papel fundamental en la etiopatogenia de esta enfermedad. Sin embargo, todavía se encuentran en fase de estudio.

1.7.5. Tratamiento quirúrgico.

La proctocolectomía restauradora con reservorio ileoanal constituye la técnica de elección en la mayoría de los pacientes con CU. Este procedimiento elimina toda la mucosa colorrectal enferma preservando la función anorrectal gracias al reservorio, de

manera que preserva la función y mejora la calidad de vida. La principal complicación asociada a esta técnica es el desarrollo de reservoritis o “pouchitis”, una inflamación inespecífica idiopática del reservorio ileal que aparece hasta en el 50% de los casos a los cinco años. La mayoría de ellos responden de manera satisfactoria al tratamiento médico (para rev. ver López San Román, 2002b).

La colectomía subtotal con ileostomía temporal es la técnica de elección en casos urgentes ya que la extirpación del recto y la anastomosis precoz en situaciones de urgencia, eleva considerablemente la morbilidad postquirúrgica (para rev. ver López San Román, 2002b).

La proctocolectomía total con ileostomía continente (técnica de Kock) permite controlar las deposiciones debido a la capacidad del reservorio, realizado con varias asas de ileon suturadas, de distenderse sin evacuación espontánea (para rev. ver López San Román, 2002b).

La colectomía subtotal con ileorectostomía muestra unos resultados técnicos satisfactorios aunque tiene la desventaja de preservar mucosa rectal, que puede dar lugar a brotes agudos de actividad inflamatoria o ser asiento de displasia y CCR (para rev. ver López San Román, 2002b).

Existen varias indicaciones entre las que destacan (para rev. ver López San Román, 2002b):

- La principal indicación de tratamiento quirúrgico es el fracaso del tratamiento médico en la CU crónica.
- La colitis fulminante refractaria al tratamiento esteroideo intravenoso a altas dosis y a ciclosporina A constituye una indicación absoluta de proctocolectomía total urgente, ya que su demora se asocia a una mortalidad significativamente mayor que si se lleva a cabo de forma precoz.
- El megacolon tóxico que no responde a tratamiento conservador y la hemorragia masiva son indicaciones de cirugía urgente.
- El desarrollo de CCR o de displasia grave son indicaciones de cirugía electiva.

	CU DISTAL	CU EXTENSA
TTO BROTE ACTIVO		
BROTE LEVE	ASA oral o rectal o CC rectal	ASA oral
BROTE MODERADO	CC oral o rectal	CC oral
BROTE GRAVE	CC parenteral	CC parenteral
ENF REFRACTARIA	CC parenteral + Ciclosporina IV AZA o 6-MP oral ¿Infliximab?	CC parenteral + Ciclosporina IV AZA o 6-MP oral ¿Infliximab?
TTO MANTENIMIENTO	ASA oral o rectal AZA oral ¿Infliximab?	ASA oral AZA oral ¿Infliximab?

Tabla 5: Algoritmo de tratamiento del brote agudo y de mantenimiento de la remisión de la CU.

2. MEDIADORES INFLAMATORIOS Y ANTIINFLAMATORIOS EN LA COLITIS ULCEROSA.

En los últimos años hemos asistido a un importante avance en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la EII; sin embargo, todavía existen muchos interrogantes por resolver. Como se mencionó anteriormente, no existe una única causa de la EII sino que se produce como consecuencia de la interacción entre múltiples factores. Así, sobre un sujeto predispuesto genéticamente confluyen diversos factores exógenos capaces de provocar un proceso inflamatorio, mediado en gran parte por el sistema inmunológico, y que a su vez es responsable del daño tisular característico de esta enfermedad (Shanahan, 1993).

Uno de los fenómenos iniciales parece estar constituido por el aumento de la expresión de moléculas de adhesión derivadas de las células endoteliales en respuesta a una serie de desencadenantes. Ello provoca la diapédesis de los leucocitos circulantes con una activación posterior de los mismos en la mucosa intestinal. Posteriormente, se

produce un incremento en la síntesis y liberación de un amplio número de mediadores inflamatorios y citoquinas, dando lugar a una gran cascada de acontecimientos inmuno-inflamatorios responsables de los hechos clínico-patológicos que aparecen en la EII. Las fuentes de estos mediadores son múltiples incluyendo tanto a células inflamatorias reclutadas en la mucosa intestinal como neutrófilos, macrófagos o mastocitos, como a las plaquetas, las células epiteliales y endoteliales del intestino, los fibroblastos, las células del músculo liso y las neuronas entéricas (MacDonald y Murch, 1994; Rogler y Andus, 1998). Asimismo, parecen existir otra serie de mediadores que ejercen el efecto opuesto, antiinflamatorio y que por tanto, podrían ser moléculas a considerar para el estudio de nuevos tratamientos.

A continuación, teniendo en cuenta la gran importancia que tienen estos mediadores y el papel central que juegan en la génesis de la EII, vamos a realizar una revisión del papel que juegan en esta enfermedad y en especial, de aquellos que son objeto de esta Tesis. Algunos de estos mediadores tienen un papel dual, de forma que pueden actuar como mediadores inflamatorios y antiinflamatorios según sus niveles, lugar de acción, etc.

2.1 OXIDO NÍTRICO.

En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron en anillos de aorta de conejo que la vasodilatación mediada por acetilcolina sólo era posible si se encontraba presente el endotelio vascular, como consecuencia de la producción de un factor humoral lábil que denominaron de forma genérica factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott y Zawadzki, 1980). Numerosos estudios posteriores trataron de identificar tanto la estructura química como el papel biológico de este factor, estudiando tanto su actividad biológica como su reactividad farmacológica. Así se demostró que el EDRF y el NO eran el mismo compuesto y que se libera en cantidad suficiente como para ejercer efectos vasodilatadores e inhibidores de la actividad plaquetaria (Palmer et al, 1987; Ignarro et al, 1987, Palmer et al, 1988; Moncada et al, 1988).

2.1.1 Bioquímica del NO.

El NO es un gas compuesto por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno que unidos dan lugar a una pequeña molécula que posee un número impar de electrones.

Es ese electrón desapareado quien lo convierte en un radical libre. En presencia de una molécula de oxígeno, el NO es inestable, pero su degradación en esta situación es relativamente lenta en comparación con la rapidez con la que desaparece en vivo en presencia de oxihemoglobina (Beckman y Koppenol, 1996). Su semivida en vivo es menor de 5 segundos (Moncada y Higgs, 1993). Por su naturaleza química el NO es hidro-liposoluble y por lo tanto, su difusión a través de células y tejidos sólo se encuentra limitada por el propio coeficiente de difusión de los mismos, así como por la rapidez con que se degrada en presencia de oxihemoglobina (Henry et al, 1993).

Tras su oxigenación, el NO se transforma en sus metabolitos estables, nitratos y nitritos, que nos permiten medir de forma indirecta su producción (Marletta, 1988). Además, el NO también es capaz de interactuar con el anión superóxido dando lugar a peroxinitrito, el cual a un pH fisiológico capta un protón dando lugar al ácido peroxinitrito. Éste, rápidamente produce dióxido de nitrógeno y radicales hidroxilo, los cuales actúan como radicales libres y potentes agentes oxidantes (Beckman et al, 1990).

2.1.2 Síntesis del NO en el aparato digestivo.

A nivel gastrointestinal se han demostrado al menos tres fuentes diferentes de producción de NO. Por un lado, la producción enzimática clásica mediada por las diferentes isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Por otro, hay una producción no enzimática de NO y por último, existe una producción por parte de las bacterias gastrointestinales.

1. Producción enzimática del NO.

El NO es sintetizado por la oxidación esteroespecífica del aminoácido L-arginina a través de la enzima NOS, similar a en su acción a la citocromo P-450 reductasa, en una reacción que se produce en dos fases (Bredt et al, 1991; Knowles y Moncada, 1994) –Figura 6-. Este enzima requiere oxígeno y nicotinadenin-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cosustratos y, flavin-mononucleótido (FMN), flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactores (Nathan y Xie, 1994). Derivado de esta reacción se produce NO y citrulina en cantidades equimoleculares (Moncada y Higgs, 1993).

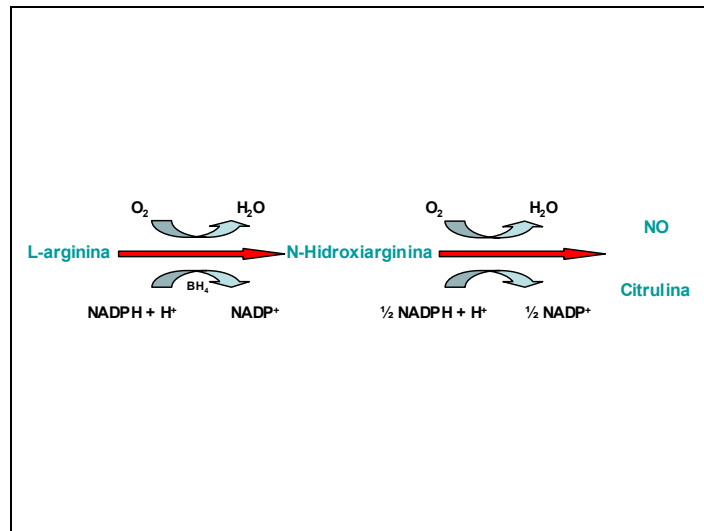


Figura 6: Reacción oxidativa de producción de NO.

Se han caracterizado tres isoformas de la NOS: dos isoenzimas constitutivas, la tipo I o NOS neuronal (nNOS) y la tipo III o NOS endotelial (eNOS), y otra inducible, la iNOS o tipo II. La actividad de las isoformas constitutivas es transitoria debido a su dependencia de la concentración celular de Ca^{2+} , por lo que tanto eNOS como nNOS producen bajas concentraciones de NO -en rango picomolar- que permanecen con actividad durante cortos periodos de tiempo. Intervienen en procesos homeostáticos como la regulación de la presión arterial, neurotransmisión o la peristalsis gastrointestinal. Por el contrario, la iNOS es independiente de las concentraciones de Ca^{2+} y por tanto, sintetiza grandes concentraciones de NO -en rango nanomolar-, destinadas a la defensa contra microorganismos e implicadas en el proceso inflamatorio (para rev. ver Nathan y Xie, 1994).

- La *óxido nítrico sintasa constitutiva neuronal (nNOS, NOS tipo I)* fue la primera isoenzima aislada. La clonación, secuenciación y caracterización del ADNc codificador de la nNOS humana y de rata, revela que tiene un ARNm de más de 10 Kb que codifican proteínas de 1433 y 1429 aminoácidos, respectivamente. Las proteínas de esas dos especies muestran una alta identidad de secuencia (93%). El gen de la nNOS humana se localiza en el cromosoma 12. Esta enzima es dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, expresándose de forma constitutiva con elevada actividad en músculo esquelético y cerebro, especialmente en cerebelo y médula

espinal. A nivel del tracto gastrointestinal es expresada constitutivamente por los cuerpos neuronales y por las células endoteliales presentes en el plexo mientérico. Diversos estudios han demostrado que el NO producido por nNOS en las terminales nerviosas como neurotransmisor del sistema no adrenérgico no colinérgico regula la liberación del péptido intestinal vasoactivo (VIP) cuando difunde a las células musculares para participar en la relajación muscular (Vittoria et al, 2000).

- La *óxido nítrico sintasa constitutiva endotelial (eNOS, NOS tipo III)* es similar a la anterior y al ser igualmente dependiente también de Ca^{2+} y calmodulina, hasta que la enzima endotelial no fue clonada, no estaba claro si ambas eran o no distintas isoenzimas. La clonación de la eNOS humana reveló que la eNOS y la nNOS eran producidas por genes diferentes, y que solamente compartían una identidad de aminoácidos del 57%. Las variantes de eNOS descritas inicialmente como particulada y soluble, son producidas en realidad por el mismo gen, estando la enzima parcialmente (en algunas ocasiones predominantemente) asociada a la membrana debido a la unión de su porción N-terminal a la membrana plasmática. El gen de la eNOS se localiza en el cromosoma 7. A nivel intestinal se expresa predominantemente en las vénulas y arteriolas de la submucosa, modulando el tono vasodilatador (Chen et al, 2002). En las plaquetas, el NO producido por esta isoforma inhibe su función a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble como mecanismo de autorregulación (Sase y Michel, 1995).
- La *óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS tipo II)* es producida por gran variedad de células y tejidos tras la exposición a citoquinas proinflamatorias (como IL-1 o TNF- α) y productos bacterianos. El gen se localiza a nivel del cromosoma 17. A nivel intestinal la expresan neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T, células vasculares de la capa muscular lisa y enterocitos. La producción del NO mediado por iNOS se regula en un proceso en el que se encuentra implicada la activación del llamado factor de transcripción nuclear κB (NF- κB) comentado anteriormente (ver Figura 1). Determinadas citoquinas como TNF- α , IL-1 β o IL-17; lipopolisacárido o bacterias intraluminales como la *Salmonella*,

Pseudomonas, *Clostridium* o *Yersinia*; virus como Rinovirus, Influenza, Epstein-Barr, Citomegalovirus o Adenovirus; y otros factores, inducen la expresión de iNOS en las células epiteliales a través de la activación de NF- κ B (Stuehr y Griffith, 1992). El NF- κ B induce un incremento coordinado de la expresión de genes proinflamatorios que incluyen citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, G-CSF, M-CSF), quemoquinas (IL-8, proteína quimotáctica de macrófagos), enzimas que generan mediadores de inflamación (COX-2, iNOS, 5-lipooxigenasa, fosfolipasa A2), receptores inmunes (receptor de IL-2, cadena β del receptor de células T) y moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina). En contraste con esto, la activación de NF- κ B por TNF- α es inhibida por donantes de NO, lo que sugiere un efecto “feed-back” negativo en la expresión de iNOS (Peng et al, 1995). Esta inducción de iNOS se ha relacionado con la defensa frente a microorganismos y factores tumorales. Sin embargo, las altas concentraciones de NO generadas por iNOS son capaces de producir una fuerte toxicidad celular (Tepperman et al, 1993).

2. Producción no enzimática del NO.

En sujetos sanos, los nitratos recirculan desde el intestino a las glándulas salivares a través de la circulación enterosalivar. Así se concentran en la saliva, donde son rápidamente reducidos junto con los nitratos de la dieta a nitritos (Tannenbaum et al, 1976). En la luz gástrica, se produce la acidificación de estos nitritos dando lugar a la formación nuevamente de NO, que parece desempeñar un importante papel en la homeostasis de la microvasculatura gástrica (Duncan et al, 1995).

También puede formarse a partir de la reacción del peróxido de hidrógeno con el aminoácido arginina tanto en su forma D como en la L (Nagase et al, 1997). En la inflamación del colon, los niveles elevados de peróxido de hidrógeno pueden jugar un papel patológico tanto por su toxicidad directa como por su conversión a radical hidroxilo. Por tanto, la administración de suplementos de arginina puede disminuir el estrés oxidativo característico de la inflamación colónica mediante la reducción de peróxido de hidrógeno por este mecanismo (Hata et al, 1997).

3. Producción bacteriana del NO.

En la luz del colon, los microorganismos anaerobios son capaces de generar NO a partir de los nitratos y los nitritos presentes en el tubo digestivo (Brittain et al, 1992). Sin embargo, su papel no está claro en la actualidad.

2.1.3 Mecanismo de acción del NO.

El papel del NO en el proceso inflamatorio es controvertido y ambiguo. Por un lado tiene una acción antiinflamatoria, pero por otro, tiene un papel fundamental en la cascada inflamatoria y en desencadenar así disfunción tisular. El hecho de dar lugar a unas u otras acciones está fundamentado en la variedad de propiedades químicas del NO y de sus derivados, y en su capacidad de producir efectos opuestos en función de su concentración (para rev. ver Grisham et al, 1999).

El NO en bajas concentraciones interacciona directamente con sus moléculas diana, teniendo funciones reguladoras, protectoras y antiinflamatorias.

- Puede interaccionar con proteínas que contienen metales formando complejos nitrosilos metálicos, especialmente las que contienen en su centro activo un grupo hemo. Por este mecanismo, el NO interacciona con la enzima guanilato-ciclase para estimular la síntesis de Guanilato monofosfato cíclico (GMPc), el cual, actuando sobre proteinquinasas dependientes de GMPc y sobre canales iónicos, produce diversos efectos fisiológicos como la relajación del tono vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria y de la adhesión leucocitaria. Por este mecanismo, también puede modificar la función de otras enzimas como el citocromo P-450, la propia NOS, la hemoglobina, la citocromo-oxidasa y la catalasa, entre otras.
- Pequeñas cantidades de NO son capaces de estimular la síntesis de prostaglandinas. La presencia de pequeñas cantidades de NO producidas por las isoformas constitutivas, puede capturar aniones superóxido (O_2^-), evitando que éste reduzca el ión férrico (Fe^{3+}) contenido en el grupo hemo a la inactiva forma ferrosa (Fe^{2+}) de la ciclooxigenasa constitutiva (COX-1), resultando la síntesis de prostaglandinas con efecto antiinflamatorio.

- El NO es capaz de inhibir reacciones oxidativas catalizadas por hierro, liberándose el radical hidroxilo (OH^\cdot), molécula con potentes propiedades oxidantes.
- El NO también puede unirse directamente a radicales libres de alta energía debido a la existencia de un electrón desapareado en su molécula. Así, puede unirse a ciertos radicales lipídicos (alquil- e hidroxiperoxil-) dando lugar a intermediarios capaces de detener el proceso de peroxidación lipídica, uno de los principales mecanismos de daño celular asociado a la inflamación (Rubbo et al, 1994).

En concentraciones suprafiológicas, es capaz de interaccionar con oxígeno molecular (O_2) o anión superóxido (O_2^-), produciéndose diversas moléculas responsables de los procesos inflamatorios (para rev. Ver Laroux et al, 2001).

- La oxidación del NO en un medio acuoso da lugar a la formación de especies reactivas como el trióxido de nitrógeno (N_2O_3), un potente agente nitrosativo capaz de reaccionar con diversas moléculas dando lugar a nitrosaminas potencialmente carcinogénicas, y derivados nitrosotioles capaces de inhibir múltiples funciones fisiológicas del NO como la inhibición de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular.
- Por otra parte, la interacción del NO con el O_2^- da lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-). Éste se descompone a NO_3^- liberando radicales hidroxilo (OH^\cdot), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) o un isómero excitado del mismo (ONOOH^*) con propiedades oxidantes similares a la especies reactivas del grupo OH^\cdot (Beckman et al, 1990).

De esta manera, tanto el ONOO^- como el ONOOH son capaces de producir oxidación de hidratos de carbono (Beckman et al, 1990), de sulfihidrilos (Radi et al, 1991a), de lípidos (Radi et al, 1991b; Rubbo et al, 1994) y de bases de ADN (King et al, 1993), así como mediar un efecto bactericida tóxico sobre la célula endotelial (Zhu et al, 1992).

2.1.4 Papel fisiológico del NO en el organismo.

- *A nivel cardiovascular* interviene en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial produciendo un tono vasodilatador como consecuencia de

la activación de las células endoteliales por estímulos físicos (como son el flujo pulsátil y el estrés de cizallamiento), o por su liberación por los terminales nerviosos no adrenérgicos no colinérgicos. Como se comentó anteriormente, es la formación de GMPc en las células musculares lisas vasculares, la responsable de la vasodilatación. Fármacos vasodilatadores como la nitroglicerina o el nitroprusiato ejercen su efecto tras su conversión en NO (para rev. ver Moncada y Higgs, 1993).

- El NO también inhibe la *agregación plaquetaria* por un mecanismo dependiente de GMPc, actuando de forma sinérgica con la prostaciclina que lo realiza a través del adenilato monofosfato cíclico (AMPc). Además inhibe la adhesión de las plaquetas a la pared vascular (para rev. ver Moncada y Higgs, 1993).
- En el *Aparato respiratorio* produce vasodilatación e interviene en la motilidad broncociliar y en la secreción bronquial de moco (para rev. ver Moncada y Higgs, 1993).
- *En el sistema nervioso central* se ha implicado en los procesos de memoria y aprendizaje, visión, olfato y nocicepción.
- *En el sistema nervioso periférico* constituye uno de los principales mediadores del sistema no adrenérgico no colinérgico responsables del control de la motilidad gastrointestinal, del mecanismo de erección del pene y de la motilidad vesical, entre otros (para rev. ver Moncada y Higgs, 1993; Schmidt y Walter, 1994).
- *En el tracto gastrointestinal* se encuentra implicado en (tabla 6):
 - En el transporte de agua y electrolitos siendo capaz de favorecer su reabsorción por acción directa sobre los enterocitos e indirecta, a través de la regulación del flujo sanguíneo. Como mecanismos de acción se han descrito el incremento en la síntesis de GMPc (activador de la secreción intestinal), el estímulo directo de la síntesis de prostaglandinas, la capacidad para liberar péptido intestinal vasoactivo (con potente efecto proabsortivo) o la activación de los canales basolaterales de potasio (para rev. ver Mourad et al, 1999).
 - En el mantenimiento de la integridad de la mucosa, gracias a la síntesis de NO por las células epiteliales mediante estímulo colinérgico que conduce a la producción de moco como agente protector, antibacteriano y

lubricante de la misma, y a la vasodilatación, necesaria para la reparación tisular tras un daño (para rev. ver Wallace y Miller, 2000).

-Asimismo, regula la inmunidad intestinal al regular a la baja la liberación de diferentes mediadores inflamatorios por los mastocitos como el factor activador plaquetario (PAF), TNF- α , histamina, eicosanoides, citoquinas, etc, actúa sobre las proteínas contráctiles del citoesqueleto de las células epiteliales encargadas del mantenimiento de las uniones intercelulares, modula la reparación tisular al incrementar el depósito de colágeno por parte de los fibroblastos, y promueve la neoangiogénesis (para rev. ver Wallace y Miller, 2000).

-Es un importante mediador nervioso del sistema no adrenérgico-no colinérgico, contribuyendo a la regulación de la motilidad intestinal. Relaja el músculo liso en todo el tubo digestivo vía GMPc y estimulando la liberación de VIP que a su vez incrementa los niveles de AMPc. También favorece la liberación de ATP, que logra una hiperpolarización de la membrana plasmática al reducir la concentración intracelular de calcio, principal ión responsable de la contracción muscular (Bult et al, 1990).

ISOFORMA	DISTRIBUCIÓN TISULAR EN EL APARATO DIGESTIVO
<i>nNOS</i>	Neuronas del sistema nervioso entérico. Músculo estriado. Neutrófilos. Músculo liso. Epitelio.
<i>eNOS</i>	Endotelio vascular. Músculo liso. Neuronas del sistema nervioso entérico. Plaquetas.
<i>iNOS</i>	Macrófagos. Neuronas del sistema nervioso entérico. Endotelio vascular. Epitelio.

Tabla 6: Distribución de las isoformas de NOS en aparato digestivo.

2.1.5 Papel fisiopatológico del NO en la CU.

El NO además de las acciones anteriormente comentadas, es uno de los mediadores fundamentales de la cascada inflamatoria (Kubes y McCafferty, 2000; Laroux et al, 2001).

En la inflamación aguda, el NO tiene un papel beneficioso como consecuencia de las acciones anteriormente expuestas de vasodilatación, por su acción antioxidante y antiinflamatoria. Sin embargo, en la inflamación subaguda y crónica, la sobreproducción de NO por parte de la iNOS parece tener un efecto perjudicial. Así, numerosos trabajos demuestran un incremento en la producción de NO en pacientes con EII a expensas de la iNOS por parte de neutrófilos, mononucleares y las propias células epiteliales (Middleton et al, 1993; Lundberg et al, 1994, Rachmilewitz et al, 1995; Godkin et al, 1996; Singer et al, 1996; Ikeda et al, 1997; McLaughlan et al, 1997; Kimura et al, 1998; Kolios et al, 1998; Gupta et al, 1998). Esa inducción de iNOS se ha observado tanto en mucosa inflamada como sana, habiéndose demostrado su capacidad de predicción de progresión de la extensión de la enfermedad a los 2 años de seguimiento (Colon et al, 2000; Menchén et al, 2004).

Por otro lado, se ha observado un incremento de la concentración de nitratos (su producto final) tanto en la mucosa inflamada (Rachmilewitz et al, 1995) como en plasma (Oudkerk Pool et al, 1995) de pacientes con CU; lo que se correlaciona con otros parámetros inflamatorios como la velocidad de sedimentación y los recuentos de leucocitos y plaquetas.

La colitis ulcerosa activa se asocia a una marcada vasodilatación mucosa, a un aumento de la permeabilidad vascular, a una disfunción epitelial absortiva y secretora, a una alteración de la motilidad colónica y a destrucción de las células epiteliales. Mucha de la sintomatología típica de la EII y de estas alteraciones, se han relacionado con el NO por sus acciones sobre las células epiteliales intestinales y sobre las células musculares y endoteliales de los vasos sanguíneos.

- La diarrea es uno de los síntomas clave. Aunque su etiopatogenia es multifactorial, el NO es responsable de un aumento de secreción clorhídrica en el colon (Tamai y Gaginella, 1993).
- El aumento de flujo sanguíneo intestinal durante los brotes de actividad y, responsable de hiperemia mucosa y submucosa, es producido por el

potente papel vasoactivo del NO (Bacaner, 1966; Hulten et al, 1977).

- La relajación intestinal, es por el NO a través de su acción periférica sobre los terminales no adrenérgicos-no colinérgicos (Snyder y Brecht, 1991). Así, la producción de grandes cantidades de NO a expensas de una hiperactividad de las isoformas constitutivas e inducible de NOS, puede producir una dilatación hipotónica aguda del colon y ser por tanto, responsable de una de las principales complicaciones de la CU, el megacolon tóxico (Mourelle et al, 1995).
- La formación de peroxinitrito comentada con anterioridad, es capaz de nitrar la tirosina presente en las proteínas dando lugar a nitrotirosina (Beckman et al, 1990). Además es citotóxico, produciendo peroxidación lipídica de las membranas celulares (Whittle, 1997) y un incremento de su permeabilidad al producir una deplección de ATP intracelular (Kennedy et al, 1998).
- Es capaz de alterar las uniones intercelulares “tight-junctions” epiteliales favoreciendo la permeabilidad paracelular a nivel hepático e intestinal en como consecuencia de una respuesta inflamatoria sistémica (Han et al, 2004; Unno et al, 1997).

La inhibición del NO es responsable de parte del efecto terapéutico de muchos de los fármacos utilizados en el tratamiento de los pacientes con CU. Así, los esteroides son capaces de inhibir la expresión de iNOS en linfocitos y monocitos y parcialmente, en las células epiteliales intestinales (Knowles et al, 1990; Tepperman et al, 1993). Además se observado una atenuación de los fenómenos de apoptosis inducidos por ONOO⁻ (Sandoval et al, 1997). Otro fármaco utilizado, el ácido 5-aminosalicílico, aunque no modifica los niveles de NO, atenúa la apoptosis inducida por el peroxinitrito en las células epiteliales intestinales y aumenta su degradación (Reynolds et al, 1995; Sandoval et al, 1997).

2.2 DERIVADOS EICOSANOIDES.

En 1971, Vane y cols descubrieron que el efecto de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) se debía a su capacidad de inhibir la actividad del enzima ciclooxigenasa (COX), lo que producía una disminución de la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias (Vane, 1971). A partir de ahí, se han desarrollado múltiples estudios sobre la regulación de la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas -PG-, tromboxanos -TX- y ácidos 15-hidroxieicosatetraenoicos).

Los eicosanoides son sustancias fisiológicamente activas cuya función y efectos en los sistemas biológicos son muy amplios y aún no han sido aclarados en su totalidad. Actúan como potentes reguladores intercelulares, participando en gran medida en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune.

Los primeros eicosanoides descritos fueron las prostaglandinas en 1933, aislándose en la próstata, de donde surgió su nombre. El tromboxano se identificó en 1975 como un potente agente iniciador de la agregación plaquetaria sintetizado en las plaquetas y otros tejidos. Los leucotrienos se describieron posteriormente, recibiendo este nombre por producirse en los leucocitos y contener tres dobles enlaces conjugados. Son constrictores del músculo liso. A continuación nos centraremos especialmente en las prostaglandinas al tener un papel más relevante en la inflamación.

2.2.1 Síntesis de PG.

Las prostaglandinas son ácidos grasos insaturados, cuya estructura deriva químicamente de un esqueleto general, el ácido prostanoico, que posee 20 átomos de carbono y un anillo pentagonal. Esta estructura está presente en las distintas prostaglandinas y constituye la base común a todas ellas.

En el hombre, el precursor más importante de las prostaglandinas es el ácido araquidónico (AA), el cual se forma del ácido linoléico. El ácido araquidónico es el 5,8,11,14 eicosatetraenoico con dobles enlaces no conjugados. El metabolismo del ácido araquidónico se realiza por un complejo enzimático llamado PG sintetasa, de localización microsomal y que está compuesto de una serie de enzimas con actividades diferentes: la peroxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la isomerasa, la tromboxanosintetasa y las enzimas desdobladoras.

La biosíntesis de prostaglandinas está regulada por dos pasos metabólicos sucesivos (ver Figura 7):

1.- *La liberación del AA* distribuido en la bicapa lipídica de la célula normalmente y esterificado con fosfolípidos. Las fosfolipasas son las enzimas que catalizan el primero de estos pasos, siendo las principales, la fosfolipasa A₂ y la fosfolipasa C (para rev. ver Dennis et al, 1991).

- La fosfolipasa A₂, tras activarse por diversos estímulos que provocan un aumento del calcio intracelular, cataliza la desacilación del AA desde la segunda posición de ciertos fosfolípidos de membrana como, por ejemplo, la fosfatidilcolina.
- La fosfolipasa C cataliza la formación de diacilglicerol e inositol trifosfato a partir del fosfatidilinositol. La diacilglicerol lipasa cataliza posteriormente la liberación del AA a partir del diacilglicerol.

2.- *Su conversión a prostanoides*. La ciclooxigenasa (COX) es la enzima que cataliza el paso limitante en la formación de prostaglandinas y tromboxanos. Se trata de una enzima bifuncional que produce tanto la oxidación del AA para formar PGG₂ por introducción de oxígeno molecular y formación de ciclopentano (actividad ciclooxigenasa), como la reacción de peroxidación que transforma la PGG₂ a PGH₂ al reducir el grupo hidroperóxido del C₁₅ a grupo hidroxilo (-OH) (actividad endoperoxidasa). Es por ello que se denomina también endoperoxido sintasa. Este es el paso inhibido por la aspirina y la indometacina.

A partir de la PGH₂, y gracias a la actividad de las isomerasas presentes en cada uno de los diversos tejidos y células, se forman las distintas prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} y PGI₂ o prostaciclina) y el tromboxano A₂ (TXA₂).

A principios de los años 90, se demostró la existencia de dos isoformas distintas de COX que difieren en su patrón de expresión y en su función biológica: la COX-1 y la COX-2 (Fu et al, 1990; Xie et al, 1991; Smith y DeWitt, 1996). Recientemente se ha descubierto otra isoforma, la COX-3, cuyo papel no se conoce aún con exactitud y que parece ser una variante de COX-1 (Chandrasekharan et al, 2002).

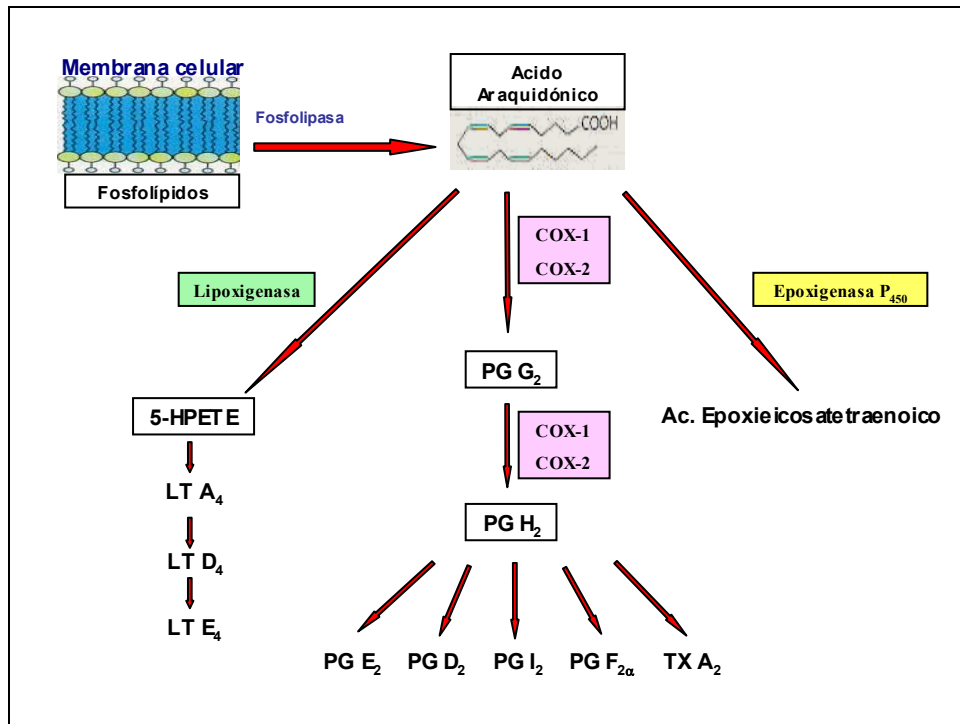


Figura 7: Síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano a partir del ácido araquidónico de las membranas celulares.

- La COX-1 (70 kDa) se encuentra en casi todos los tejidos de forma constitutiva, aunque sus niveles varían según el tipo celular, siendo la forma predominante en el endotelio vascular, mucosa gástrica, plaquetas y riñón. Es la responsable del mantenimiento de funciones fisiológicas básicas al producir prostaglandinas citoprotectoras que intervienen en la señalización intercelular y en la homeostasis gástrica, vascular o la renal. Su gen se localiza en el cromosoma 9 humano, y en roedores en el 2 (Yokoyama y Tanabe, 1989).
- La COX-2 (72 kDa) no se detecta de forma tan importante en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas, aunque es constitutiva en niveles bajos en el cerebro, riñón, colon, durante la ovulación y la implantación del blastocisto y en endotelio vascular, entre otros. Su expresión puede ser inducida por estímulos proinflamatorios y mitogénicos como IL-1, TNF- α , lipopolisacáridos (LPS), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interferón gamma (IFN- γ), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), etc, a nivel de monocitos, macrófagos, sinoviocitos, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos y células endoteliales, entre otros. Por tanto, la expresión de COX-2

aumenta en procesos inflamatorios y de proliferación celular, siendo normalmente transitoria y recuperando los niveles basales en 24-48 horas. Su gen se encuentra en el cromosoma 1 tanto en humanos como en ratones (Fletcher et al, 1992; Kraemer et al, 1992). El promotor de su gen contiene una caja TATA y sitios de unión para varios factores de transcripción incluyendo el NFκB, el factor nuclear para la expresión de interleuquina 6 (NF-IL-6) y la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (Appleby et al, 1994). Por el contrario, se ha descrito que los glucocorticoides, IL-4, IL-13 y la citoquina antiinflamatoria IL-10 pueden inhibir la expresión de este enzima (Lee et al, 1992; Onoe et al, 1996; Niro et al, 1997). Además tiene un mecanismo de autorregulación, pudiendo los prostanoïdes generados por la COX-2 estimular la expresión de este enzima. De esta manera, prostaglandinas producidas en las zonas de inflamación como la prostaglandina E₂ (PGE₂) pueden potenciar su expresión (Minghetti et al, 1997; DuBois et al, 1998; Nantel et al, 1999; Hinz et al, 2000a,b; Maldve et al, 2000). Por otro lado, otras prostaglandinas como la y PGD₂ y 15-deoxi-delta12,14-PGJ₂ (15d-PGJ₂) son antiinflamatorias al inhibir la IκB quinasa y a NFκB como se comentará posteriormente (Rossi et al, 2000; Straus et al, 2000).

2.2.2 Mecanismo de acción de las PG.

La acción de las prostaglandinas está relacionada con cambios en el AMPc pudiendo en unos sistemas inducir con intensidad variable la adenil ciclasa (estimulando la función celular) y en otros, inhibirla. Además, la intensidad de acción de las diferentes prostaglandinas sobre la adenil ciclasa no es igual. Todo ello supone una enorme diversidad de efectos sobre los diferentes sistemas del organismo.

2.2.3 Papel fisiológico de las PG en el organismo.

Las acciones biológicas de las prostaglandinas son muy variadas (para rev. ver Terragno, 2004) -ver tabla 7-:

- o *En el sistema cardiovascular* son fundamentalmente vasodilatadores y antiagregantes; pero hay algunas como la PGH₂ y sobre todo el TXA₂ con efectos contrarios, siendo vasoconstrictores y proagregantes.

- *En el riñón*, las prostaglandinas más importantes son la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la PGE_2 , la PGA_2 , la PGI_2 (prostaciclina) y el tromboxano A_2 (TXA_2). Producen vasodilatación, aumento del flujo renal y natriuresis.
- *En el aparato respiratorio*, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el TXA_2 son broncoconstrictores y aumentan la secreción bronquial, mientras que la PGE_2 es broncodilatadora y disminuye la secreción bronquial.
- *A nivel ovárico*, las prostaglandinas más activas son las PGE y las PGF . Durante la fase secretora, en el folículo en maduración se produce un aumento del estradiol responsable del incremento de las PGs anteriores. Todo ello, produce luteolisis y una disminución en la secreción de progesterona. Al mismo tiempo, se observa un aumento en el estradiol, el cual estimula la secreción de la LH, produciéndose la ovulación. Esta elevación de la hormona luteotrófica aumenta ulteriormente a su vez la secreción de PGs. Así, el pico ovulatorio de la LH y la luteolisis están mediadas por PGs.
- *En el parto*, la PGF_2 inhibe la secreción de progesterona (hormona que inhibe la contracción uterina), sensibiliza la fibra muscular uterina a la oxitocina, favorece la apertura del cuello uterino y disminuye el flujo vascular a la placenta.
- *En la erección* intervienen, siendo sintetizadas en los cuerpos cavernosos. Así, la PGH_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ son responsables del tono del músculo liso cavernoso. Las prostaglandinas E_1 y E_2 actúan como relajantes directos del músculo liso trabecular y modulan a los nervios adrenérgicos inhibiendo la liberación de adrenalina. Estos efectos se aprovechan para el tratamiento de la disfunción eréctil mediante inyecciones intracavernosas
- *En el sistema nervioso* predominan la PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ que, modulan la actividad de los canales de K^+ y la inhibición de la actividad proteínquinasa II Ca^{2+} -calmodulina dependiente, provocando la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores como noradrenalina, histamina, etc. Asimismo, se ha demostrado un papel fundamental en la génesis de la fiebre al actuar sobre las neuronas sensoras de temperatura en el área pre-óptica, en la disminución del umbral del dolor al actuar en los receptores polimodales de las fibras sensoriales aferentes tipo C. Igualmente se ha implicado en la génesis de procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, así como en la muerte neuronal inducida por hipoxia o por aminoácidos excitadores.

- *En el tracto gastrointestinal* son vasodilatadoras, incrementan la producción de moco y bicarbonato y ejercen efectos protectores frente a las acciones lesivas de agentes ulcerogénicos. Predomina especialmente la PGI₂.

SISTEMA	PGE ₂	PGF _{2α}	PGI ₂
Cardiovascular	Vasodilatador Hipotensor Taquicardia ↑ Gasto Cardíaco ↓ Agregación plaquetaria ↓ Función leucocitaria	Vasoconstrictor Bradicardia ↑ Gasto Cardíaco	Vasodilatador Muy hipotensor Taquicardia ↓ Agregación plaquetaria
Renal	↑ Flujo sanguíneo ↑ Diuresis y natriuresis ↑ Secreción de renina	↓ Flujo sanguíneo ↓ Diuresis	↑ Flujo sanguíneo ↑ Diuresis y natriuresis ↑ Secreción de renina
Pulmonar	Broncodilatador	Broncoconstrictor	Broncodilatador
Nervioso	↑ Fiebre ↓ Umbral del dolor		↓ Umbral del dolor
Digestivo	↓ Producción ácida Citoprotector Acelera el tránsito ↑ Secreción de líquidos	Acelera el tránsito ↑ Secreción de líquidos	Acelera el tránsito ↓ Secreción de líquidos

Tabla 7: Efectos fisiológicos de las principales prostaglandinas.

2.2.4 Papel fisiopatológico de los eicosanoides en la CU.

Los eicosanoides son liberados en respuesta a múltiples estímulos agresivos a expensas de la inducción de COX-2, contribuyendo a conformar los síntomas de la inflamación mediante la producción de vasodilatación, incremento de la permeabilidad e infiltración de leucocitos.

Históricamente, las prostaglandinas fueron los primeros eicosanoides relacionados con la génesis de la EII. En concreto, la producción de PGE₂ por los eosinófilos y macrófagos intestinales está aumentada significativamente en los pacientes con EII (Raab et al, 1995; Yang, 1996). El incremento de la PGE₂ y PGD₂ actúa directamente sobre las células intestinales disminuyendo la absorción y la secreción, siendo por tanto, responsables al menos en parte, de la diarrea, alteraciones de la motilidad, de la secreción de agua y electrolitos y del flujo sanguíneo intestinal incrementado de éstos.

La PGI₂ ejerce dicha acción estimulando las neuronas colinérgicas de los plexos nerviosos intestinales (Sartor et al, 1991; Musch et al, 1994; Yang, 1996). Por otro lado, la PGE₂ entre otras, favorece el desarrollo de neoplasias en el tracto gastrointestinal al disminuir la respuesta inmune celular, promover la neoangiogénesis, estimular la proliferación celular e inhibir la apoptosis (Wang et al, 2005).

Una de las vías a través de la cual actúan los corticoides y los aminosalicilatos es, entre otras, mediante la inhibición de la síntesis de PGs. Dada la escasa selectividad de estos fármacos tienen gran cantidad de efectos secundarios. El empleo de fármacos más selectivos sobre los productos derivados del ácido araquidónico puede que sea en un futuro, clave en el tratamiento de la EII.

También se ha demostrado un aumento de los niveles de leucotrienos (LT) en pacientes con EII. En concreto, existe un aumento de LTB₄ en la mucosa de pacientes con EII activa en comparación con la mucosa de individuos sanos (Yang, 1996). Éstos favorecen el reclutamiento leucocitario hacia la mucosa intestinal y su activación dentro de la misma. Existen estudios que demuestran el papel beneficioso de inhibidores de la síntesis de LT, como el zileutón (inhibidor de la 5-lipooxigenasa), en el tratamiento de la EII (Hawkey et al, 1997). Igualmente los aminosalicilatos, basan también parte de su acción en la inhibición de la síntesis de LT (Schmidt et al, 1996).

Otro eicosanoide clásico como el tromboxano se encuentra incrementado en la EC, tanto en la mucosa inflamada como en la sana (Yang, 1996). Directamente provoca la activación de neutrófilos y la inactivación de células T-supresoras e indirectamente, activa las plaquetas y produce vasoconstricción. El uso de inhibidores de la síntesis de TX y de antagonistas, como el ridogrel o la picotamida, han resultado beneficiosos en el tratamiento de la EII (Casellas y Guarner, 1996).

2.3 CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.

Las citoquinas son un grupo de péptidos estructurales menores de 30 kDa producidas por células del sistema inmunitario en respuesta a diversos estímulos (para rev. ver Nielsen y Rask-Madsen, 1996; Kolios et al, 1998; Rogler y Andus, 1998). Actúan a nivel local y sistémico induciendo la producción de otros mediadores e iniciando la cascada inmunológica (Radford-Smith y Jewell, 1996). Como se comentó anteriormente se ha propuesto la existencia de un desbalance entre las citoquinas

proinflamatorias (IL-1; IL-6; IL-8; TNF- α ...), que se encuentran aumentadas, y las antiinflamatorias (IL-1ra; IL-4; IL-10; IL-11), que están disminuidas, de forma que una alternativa de tratamiento futuro será con fármacos inhibidores de la síntesis de las citoquinas proinflamatorias o de sus acciones, o bien la activación de las citoquinas antiinflamatorias. Destacan las siguientes citoquinas por su implicación en la patogénesis de la CU:

- **La IL-1** con sus dos isoformas α y β , actúan sobre dos tipos de receptores: los receptores I y II. Sus efectos están en equilibrio con el antagonista de estos receptores (IL-1ra), producido por las mismas células que la IL-1, y que actúa compitiendo con ella (Dinarello y Thompson, 1991). En la EII activa se produce un desbalance entre los niveles de IL-1 y del IL-1ra. En concreto, hay un aumento de la producción del primero por mononucleares (Mahida et al, 1989; Isaacs et al, 1992; Kam et al, 1995; Grottrupwolfers et al, 1996; Rogler y Andus, 1998) y un incremento de los niveles del IL-1ra por las células del epitelio intestinal, pero menor. Cabe destacar además que el aumento de sus niveles se correlaciona con los índices de actividad de la enfermedad (Isaacs et al, 1992).
- **La IL-2** tiene un papel controvertido, ya que hay estudios en los que se demuestra una disminución o incluso una ausencia en la producción de IL-2 por parte de las células mononucleares de la sangre periférica y de la mucosa de pacientes con CU activa (Radford-Smith y Jewell, 1996), y otros, en los que utilizando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han observado un incremento en la producción de IL-2 tanto en sangre periférica como en la mucosa de pacientes con CU activa (Kam et al, 1995). Parece que la producción de IL-2 varía dependiendo del grado de afectación existente o de la fase de la enfermedad en la que nos encontremos. Su fuente principal son los linfocitos T-colaboradores, autorregulándose positivamente de forma autocrina (Ma et al, 1995).
- **La IL-5** tiene un papel poco claro. Es producida por linfocitos T-colaboradores subtipo Th₂, encontrándose sus niveles incrementados en pacientes con EII (Fuss et al, 1996).
- **La IL-6** es producida por macrófagos y células epiteliales. Se encuentra incrementada tanto en la sangre periférica como en la mucosa de pacientes con EII activa (Isaacs et al, 1992; Reimund et al, 1996). La IL-6 estimula la actividad megacariocítica, pudiendo ser una de las responsables de la trombocitosis existente

en esta enfermedad (Reimund et al, 1996).

- **La IL-8** producida por macrófagos, células epiteliales y fibroblastos, se encuentra incrementada en la mucosa enferma de pacientes con EII (Mitsuyama et al, 1994; Mazuchelli et al, 1994). Es un potente agente quimiotáctico y activador de neutrófilos. Sus niveles se correlacionan con el grado de afectación macroscópica y el número de neutrófilos presentes en la mucosa de los pacientes con EII (Mazuchelli et al, 1994).
- **La IL-12** es sintetizada por macrófagos activados e induce la diferenciación de los linfocitos T colaboradores. La administración de anticuerpos bloqueantes de IL-12 produce un descenso de la actividad inflamatoria en modelos experimentales (Duchmann et al, 1996).
- **Los interferones (IFN)** fueron inicialmente considerados proteínas antivirales. Hoy día se conoce el importante papel que juegan en la respuesta inmunitaria. Existen dos grandes grupos de interferones, el tipo I y el II.

-Los tipo I incluyen a su vez, el IFN- α , constituido por 20 polipéptidos estructurales de 18 kDa y sintetizado principalmente por los fagocitos, y el IFN- β , glicoproteína de 20 kDa sintetizada principalmente por los fibroblastos.

-El tipo II está formado exclusivamente por el IFN- γ , proteína homodimérica que contiene de 21 a 24 subunidades. Es sintetizado por los linfocitos Th₁ y los Natural-killer. Sus funciones son la de activar a los fagocitos, neutrófilos y células endoteliales, y promover la diferenciación de los linfocitos B y T (Rogler y Andus, 1998). En la EII tiene un papel controvertido, ya que en algunos trabajos se ha observado un aumento de sus niveles plasmáticos (Fais et al, 1991), mientras que en otros, se encuentran disminuidos (Breese et al, 1993).

- **El TNF- α** es un importante mediador inflamatorio que comparte un mecanismo de acción sistema de actuación similar a la IL-1. Es expresado como una proteína transmembrana de 26 kDa, siendo preciso para activarse, que se libere por la acción de una enzima proteolítica denominada enzima convertidora de TNF- α (TACE o ADAM 17) (Black et al, 1997; Moss et al, 1997). Los radicales libres y el NO son capaces de activar este enzima al formar un nitrosotiol con el residuo de cisteína del prodominio de TACE (Black et al, 1997).

En modelos experimentales de colitis se ha observado que los monocitos y los macrófagos de la pared intestinal producen TNF- α de forma exagerada y que,

animales deficientes del gen del TNF- α no desarrollan inflamación (Isaacs et al, 1992). El aumento en la producción de TNF- α se detecta en tejidos afectados y sanos, existiendo a su vez una correlación entre sus niveles plasmáticos y la actividad inflamatoria y clínica del proceso.

Entre sus acciones destaca la capacidad de activar los macrófagos residentes y promover la liberación de otros mediadores inflamatorios como NO, PG o PAF (Nathan et al, 1994; van Deventer, 1997; Fiocchi, 1998). En un estudio reciente se ha observado como la colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) incrementa la actividad TACE, aumentando los niveles de TNF- α y la expresión de iNOS. Su bloqueo no solo supone una disminución del primero sino también del segundo, lo que puede suponer una herramienta útil en el tratamiento de la EII (Colon et al, 2001). Asimismo, el TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, favoreciendo el reclutamiento de nuevas células inflamatorias hacia la mucosa. También contribuye de forma directa a la lesión intestinal, alterando la integridad de las membranas de las células epiteliales y es capaz de estimular a los fibroblastos intestinales para sintetizar metaloproteinasas de matriz (MMPs), una familia de endopeptidasas capaces de degradar lentamente la matriz extracelular (MacDonald et al, 1999). Además está involucrado en la muerte celular por necrosis y apoptosis, en la proliferación y diferenciación celular, la inflamación, la tumorigénesis y en la replicación viral.

2.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs).

En los pacientes con EII, las EROs están aumentadas en el tejido inflamado, en los monocitos de la sangre periférica y en los macrófagos como consecuencia del aumento de su generación y de la disminución de los niveles de algunos antioxidantes endógenos como la superóxido-dismutasa, la metalotioneína y la glutatión-peroxidasa. (Grisham, 1994). Una de las principales EROs es un producto derivado del metabolismo del NO ya comentado, el peroxinitrito. Estas provocan, entre otros, peroxidación lipídica celular, daño en el ADN y mitocondrial, hecho demostrado en biopsias de mucosa inflamada.

Por tanto, la administración exógena de agentes antioxidantes como la propia

superóxido-dismutasa, el alopurinol o el dimetilsulfóxido pueden ser beneficiosos en pacientes con EII, y pueden reducir el riesgo de cáncer de colon en pacientes con CU al disminuir el daño que los agentes oxidantes llevan a cabo sobre el ADN (Grisham, 1994; Yue et al, 1996). Fármacos habitualmente usados como los aminosalicilatos deben parte de su efecto a la capacidad para captar EROs o inhibir su producción por los neutrófilos activados.

2.5 AMINAS BIÓGENAS.

Existe un aumento de la síntesis y liberación de histamina en la mucosa afecta de pacientes con EII. Este incremento de histamina, liberada por los mastocitos, puede contribuir junto con otros mediadores a la vasodilatación, la contracción muscular, la secreción de electrolitos y el aumento de permeabilidad vascular que ocurre en esta enfermedad (Raithel et al, 1995).

2.6 NEUROPEPTIDOS.

Los neuropéptidos intervienen en el control de la motilidad y secreción gastrointestinales así como en la respuesta inmune e inflamatoria. Así, se ha observado que la sustancia P (SP) y el VIP están implicados en los procesos inflamatorios intestinales y especialmente en la pouchitis, donde hay un aumento de SP y una disminución de VIP (Schultebockholt et al, 1995; Yamamoto et al, 1996). De esta forma, los enemas de lidocaína (anestésico local que actúa inhibiendo la SP) son eficaces en el tratamiento de la proctitis ulcerosa (Yamamoto et al, 1996).

También se ha demostrado la existencia de receptores para somatostatina en las venas del intestino inflamado (Yamamoto et al, 1996).

2.7 QUININAS.

Aunque se ha demostrado el papel que el sistema kalibreína-quinina tiene en la patogénesis de la fase aguda en un modelo de colitis experimental (Stadnicki et al,

1996), no se ha comprobado fehacientemente en la EII humana. En ésta parece tener un decisivo en la susceptibilidad genética presente en esta enfermedad, así como en la aparición de las complicaciones sistémicas (Sartor et al, 1996).

2.8 COMPLEMENTO.

Se han observado por inmunohistoquímica depósito de complejos de complemento en los vasos sanguíneos de la submucosa, en la *muscularis mucosae* y en el borde de las células epiteliales de pacientes con CU activa, especialmente a expensas de los factores C3 y C4. Su mecanismo de acción radica en que son mediadores de las interacciones entre neutrófilos-endotelio y estimulan la liberación de otros mediadores como los eicosanoides, el PAF, la IL-1 o la histamina (Ueki et al, 1996).

2.9 FACTOR ACTIVADOR PLAQUETARIO.

Existe un incremento en los niveles de PAF en la mucosa de pacientes con CU activa, que se correlacionan tanto con el daño local como con el grado de inflamación existente. Estimula la secreción de Cl^- e inhibe la absorción de cloruro sódico a nivel intestinal contribuyendo a la producción de diarrea, de forma que, el antagonista del receptor del PAF, lexipafant (BB-882), es capaz de mejorar la diarrea ha sido demostrado en modelos experimentales de colitis (Almer et al, 1996).

2.10 PROTEASAS.

Las proteasas ácidas producidas por los gránulos secundarios de los neutrófilos se encuentran incrementadas en la EII. En cambio, las derivadas de los gránulos primarios como la elastasa, la catepsina D o la quimotripsina son variables, pudiendo estar aumentadas, disminuidas o sin alterarse. Asimismo, el inhibidor de la secreción de la tripsina pancreática (PSTI), potente agente inhibidor de las proteasas, se encuentra disminuido en los pacientes con EII. Todo ello provoca una destrucción de elastina, de colágeno y de otras proteínas del tejido conectivo de la pared del tubo digestivo que contribuye al daño que acontece en la mucosa inflamada (Seitz et al, 1995).

2.11 MEDIADORES ANTIINFLAMATORIOS EN LA CU.

2.11.1. Receptores activadores de la producción de peroxisomas (PPARs).

En 1990 fueron descubiertos los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), que intervienen en diversas funciones del metabolismo glucídico, lipídico y de lipoproteínas, de la diferenciación celular y en el control de la respuesta inflamatoria. Asimismo parece haberse relacionado con el desarrollo de cáncer (Chinetti et al, 2000). Nos centraremos especialmente en PPAR- γ por ser el más estudiado y abundantemente expresado en colon.

I. Clasificación de los PPARs.

Los PPARs constituyen una familia de receptores nucleares que se clasifican en tres subtipos diferentes con distinta localización y funciones (Mangelsdorf et al, 1995).

- *PPAR- α* está expresado en tejidos con alto metabolismo de ácidos grasos como el hígado, riñón, corazón y músculo, estimulando su degradación beta-oxidativa.
- *PPAR- δ* se encuentra en gran cantidad de tejidos como el corazón, pulmón, cerebro, tejido adiposo, intestino, músculo, bazo y glándulas suprarrenales.
- *PPAR- γ* está fundamentalmente en el intestino, tejido adiposo y glándula mamaria. Se han identificado 3 isoformas: PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 y PPAR- γ 3. PPAR- γ 1 está más expresado en la mayoría de los tejidos salvo el tejido adiposo que expresa más PPAR- γ 2. El PPAR- γ 3 se restringe al colon y tejido adiposo. En el colon en concreto, se expresa en células epiteliales y macrófagos (Dubuquoy et al, 2002). Interviene en la diferenciación adipocitaria y favorece el almacenamiento lipídico.

II. Mecanismo de acción PPARs.

Este receptor se encuentra formando un heterodímero con otro receptor nuclear, el receptor X retinoico (RXR). Existe además, una proteína represora adicional que es la encargada de mantener al receptor en estado inactivo (Dubuquoy et al, 2002). El heterodímero PPAR- γ /RXR regula la expresión génica mediante su unión a secuencias específicas de DNA que reciben el nombre de

elementos de respuesta de proliferador de peroxisomas (PPRE). Se trata de secuencias repetidas de seis pares de bases (AGGTCA) separadas por uno o dos nucleótidos, de forma que, el PPAR se une al extremo 5' mientras que el RXR se une al segmento 3' (Schoonjans et al, 1996; Ijpenberg et al, 1997). De esta forma, tras su activación por ligandos endógenos o exógenos se regula la transcripción de varios genes (Figura 8). Asimismo, también pueden inhibir la transcripción génica al interferir negativamente con mediadores intracelulares inflamatorios como NF- κ B, STAT y AP-1, obstaculizando la unión a sus respectivas dianas (Delerive et al, 1999b; Zhou y Waxman, 1999). Además, PPAR puede interactuar con c-Jun y la subunidad p65 de NF κ B impidiendo sus efectos carcinogénico e inflamatorio respectivamente (Sakai et al, 1995; Delerive et al, 1999a).

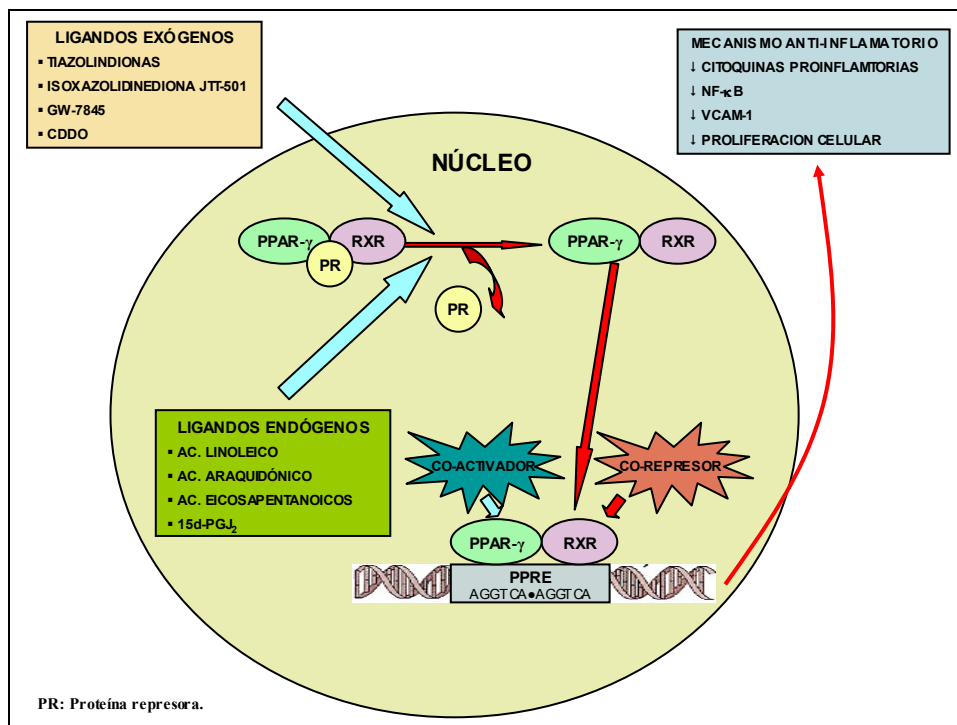


Figura 8: Mecanismo de acción de PPAR- γ sobre la transcripción génica como mediador antiinflamatorio.

La expresión y actividad de los PPARs esta a su vez regulada por una amplia variedad de factores. Así, citoquinas inflamatorias como el TNF- α , IL-1, IL-6, disminuyen la expresión de PPAR- γ y otras antiinflamatorias, como la IL-4,

inducen su expresión (Tanaka et al, 1999; Huang et al 1999). Muchas otras proteínas pueden actuar como coactivadores (como el coactivador del receptor esteroideo SRC-1 o la proteína ligadora de PPAR- γ con actividad histona acetilasa) o corepresores (como el co-represor del receptor nuclear NcoR o el mediador silenciador del receptor hormonal retinoide y tiroideo) que, favorecen o suprimen respectivamente el proceso de transcripción (Kota et al, 2005).

III. Papel de PPAR- γ en la inflamación.

Muchos son los mecanismos que median el efecto antiinflamatorio del heterodímero PPAR- γ /RXR. La principal, como ya se comentó anteriormente, es la regulación del NF- κ B y la línea estrés-kinasa (Desreumaux et al, 2001).

- La regulación del NF- κ B es múltiple: dicho heterodímero puede unirse a las subunidades p50 y p65 del NF- κ B, inhibir la degradación de I κ B o interaccionar con coactivadores de p65.
- La regulación de la cascada de la kinasa de la proteína activadora-mitógena (MAP kinasa) se produce por reducción del terminal kinasa c-jun-NH₂, activación p38, interaccionando con el factor de transcripción de c-jun o por inhibición de c-fos. Todo ello conlleva una disminución de la proliferación y migración celular.

También provoca una disminución de la secreción de IL-2 por los linfocitos T mediada por su unión al factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) (Yang et al, 2000).

Todo ello produce como resultado final una inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ ; una inhibición de mediadores inflamatorios como iNOS, gelatinasa B, etc; una disminución de la proliferación celular y de la expresión de determinadas moléculas de adhesión como VCAM-1 (no ICAM-1 ni E-selectina) que favorecen la diapédesis de linfocitos y monocitos pero no neutrófilos (Kota et al, 2005).

IV. Ligandos naturales y sintéticos de PPAR- γ .

PPAR- γ puede ser activado por moléculas endógenas como el *ácido linoléico* y *araquidónico*, y por derivados de este último vía cicloxigenasa y lipoxigenasa como la *15d-PGJ₂* y el *15-Hidroxiieicosatetranoico (15-HETE)* (Forman et al, 1995; Kliewer et al, 1995). Ácidos grasos derivados de componentes de

lipoproteínas de baja densidad oxidadas como el *ácido 9-hidroxiocetadecadienoico (9-HODE)* y el *ácido 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE)* también se han implicado como ligandos naturales de PPAR- γ (Nagy et al, 1998).

- Uno de los más estudiados ha sido la ***15d-PGJ₂*** que se produce *in vitro* e *in vivo* por deshidratación e isomerización espontánea de PGD₂. Al contrario que las otras PGs, PGJ₂ y sus derivados poseen un anillo ciclopentanona altamente reactivo que lo permite ligarse a receptores nucleares y modificar moléculas señalizadoras intracelulares. Además de ser ligando de PPAR- γ , es capaz de inducir la apoptosis e inhibir la proliferación y crecimiento celulares uniéndose a NF- κ B y/o a la quinasa I κ B (Bell-Parikh et al, 2003). Durante la realización de esta Tesis, se ha observado su potencial antiinflamatorio por estos mecanismos, demostrando ser neuroprotector en la isquemia cerebral, disminuir la mortalidad en el shock séptico y protector en el estrés (García-Bueno et al, 2005a; Pereira et al, 2005b; Kaplan et al, 2005).

Como análogos sintéticos destacan principalmente las ***Tiazolindionas (TZDs)***, una familia de antidiabéticos orales que mejoran la resistencia insulínica y los niveles de glucosa en pacientes diabéticos tipo 2. La mayoría de ellos (Rosiglitazona, Troglitazona, Ciglitazona, Pioglitazona y Englitazona) son agonistas selectivos PPAR- γ y por tanto, podrían utilizarse como fármacos antiinflamatorios. En este sentido, estudios recientes han demostrado el papel protector de éstos en la isquemia cerebral, en modelos de estrés y como preventivo de reestenosis después de la implantación de stents coronarios en diabéticos tipo 2 y (Choi et al, 2004; Pereira et al, 2005b; García-Bueno et al, 2005b). Otras moléculas como la *isoxazolinmediona JTT-501*, el *L-796,449*, *GW-7845*, el *ácido 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28oic-triterpenoico (CDDO)* tienen un papel agonista con efectos biológicos semejantes (Kota et al, 2005; Pereira et al, 2005a). Cabe destacar que los AINEs, como la indometacina e ibuprofeno, son activadores de PPAR- γ en rango micromolar (Lehmann et al, 1997). Otras, en cambio, como el *bifenol-diglicidil-eter (BADGE)*, el *GW9662* y el *LG-100641* han sido recientemente identificados como antagonistas (Wright et al, 2000; Mukherjee et al, 2000; Seargent et al, 2004).

V. Papel de PPAR- γ en el tracto gastrointestinal y en la CU.

La activación de PPAR- γ en el colon se acompaña de una disminución de la síntesis de citoquinas inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β y de la respuesta linfocitaria Th1 en vez la Th2 por inhibición de las señales NF- κ B y MAP kinasa. Este receptor podría jugar un papel fundamental en las células epiteliales, ya que son las responsables de mantener la barrera intestinal e intervienen en la respuesta inmune a través de la secreción de muchos mediadores como citoquinas y quemoquinas (Dubuquoy et al, 2002).

En la EII, hay pocos estudios que hayan valorado el rol de este receptor. En la CU en concreto, se ha observado una disminución de la expresión de PPAR- γ en las células epiteliales. Por otro lado, el TLR4, que al activarse estimula la vía del NF- κ B como se comentó anteriormente, está regulado al alza en pacientes con CU. Una teoría es que ese desbalance entre el PPAR- γ y TLR4 en respuesta a las bacterias lumbinales perpetúa la inflamación de la mucosa que caracteriza estos procesos. En la EC, en cambio, parece ocurrir lo contrario, existe una sobreexpresión de PPAR- γ (Dubuquoy et al, 2003; Katayama et al, 2003).

En relación con las posibilidades terapéuticas, desde 1999 se ha observado el efecto antiinflamatorio de los agonistas PPAR- γ sobre el aparato digestivo. En modelos animales de colitis inducida por TNBS o por Dextrano sulfato sódico (DSS), la Rosiglitazona y la Troglitazona han demostrado inducir un aumento del peso corporal, una reducción en el número de deposiciones y sangrado rectal y una mejoría histológica (Su et al, 1999; Sánchez-Hidalgo et al, 2005). Más evidencia encontramos en que alteraciones en el PPAR- γ o RXR incrementan la susceptibilidad a colitis con TNBS (Desreumaux et al, 2001). En la CU humana, Lewis et al, demostraron una mejoría del índice de actividad clínica y endoscópica en pacientes con CU refractaria a 5-ASA con 4 mg/12h de Rosiglitazona (Lewis et al, 2001).

2.11.2 Citoquinas antiinflamatorias.

Como se comentó con anterioridad, en la CU existe una disminución de citoquinas antiinflamatorias como la IL-1ra (comentada anteriormente), IL-4, IL-10 y la IL-11:

- **La IL-4** o factor estimulante de las células B es sintetizada principalmente por los linfocitos activados. En humanos inhibe la activación de los macrófagos intestinales, la liberación de peróxido de hidrógeno por parte de los monocitos y la liberación de diversos mediadores inflamatorios como el TNF- α o la IL-1 (Cradford et al, 1987; Lehn et al, 1989). En pacientes con EII se ha observado un descenso tanto de sus niveles como de su ARN-mensajero. Ello ocasiona un defecto de los mecanismos inmunosupresores y antiinflamatorios que podría contribuir a la patogénesis de esta enfermedad (Karltonnen et al, 1994).
- **La IL-10** producida por linfocitos T, B y por los monocitos activados por lipopolisacárido, provoca la regulación a la baja de algunas citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF- α . Desempeña un importante papel en el control y limitación de los procesos inflamatorios: ratones deficientes genéticamente en IL-10 desarrollan de forma espontánea una enterocolitis crónica que puede evitarse con la administración exógena de IL-10 (Kühn et al, 1993). De igual forma, en humanos se ha demostrado el efecto beneficioso de la administración de enemas que contienen IL-10 en pacientes con CU (Schreiber, et al 1995).
- **La IL-11** es una citoquina con efecto pleiotrópico, siendo capaz de actuar sobre células del sistema hematopoyético, células reproductoras, hepatocitos, etc. En las células del epitelio intestinal lleva a cabo un efecto protector como se demuestra en estudios llevados a cabo en ratones tratados con 5-fluoracilo a dosis subletales. Éstos, en condiciones normales mueren por destrucción del epitelio intestinal a los 10 días, mientras que los tratados con IL-11 humana recombinante, logran sobrevivir (Du et al, 1994).

3. EL ESTRÉS.

3.1. CONCEPTO Y DEFINICIONES.

El término estrés ha sufrido diversas interpretaciones a lo largo de la historia. Así en el siglo XIV se utilizaba para referirse a experiencias negativas tales como adversidades, dificultades, sufrimiento, aflicción, etc. Posteriormente se utilizó para referirse fundamentalmente a fenómenos físicos. R. Hooke lo empleó para definir “la fuerza interna presente en un área sobre la que actúa una fuerza externa cuando una estructura sólida es distorsionada”. Con el tiempo se generalizó su uso en otros muchos ámbitos hasta convertirse en una palabra utilizada en múltiples situaciones.

Entre los primeros dedicados a su estudio destaca Hans Selye, quien lo comparó con otros términos como éxito, fracaso o felicidad y lo definió como “un desequilibrio corporal producido por un agente externo o interno” (Selye, 1956). Otro científico que destacó en los inicios de su estudio y que influyó en el primero, fue W. Cannon (1932). Éste, a partir de su hipótesis sobre la homeostasis (capacidad que tiene todo organismo para mantener constante un equilibrio interno), lo utilizó para referirse a las reacciones de “lucha-huida”, respuestas automáticas que emiten los organismos en defensa de estímulos amenazantes externos o internos. Según este concepto, se asocia el estrés con una amenaza para la integridad del sujeto; sin embargo, cualquier modificación de las condiciones habituales supone un estímulo estresante y así, independientemente de su naturaleza, todos producen un desequilibrio que se trata de corregir. Este esfuerzo por reajustarse constituye la respuesta estereotipada característica del estrés conocida como síndrome general de adaptación (Selye, 1936).

El síndrome general de adaptación es la consolidación de la respuesta de estrés mantenida en el tiempo. Consta de tres fases:

1. Reacción de alarma.

Es la reacción que experimenta el organismo cuando es expuesto repentinamente a diversos estímulos a los que no está adaptado. Se subdivide en dos etapas:

- a) La fase de *choque* constituye la reacción inicial e inmediata al agente nocivo. El individuo en esta etapa experimenta taquicardia, pérdida del tono muscular, disminución de la temperatura y la presión sanguínea como consecuencia de la liberación inicial de adrenalina, corticotropina (ACTH) y corticoides, que se amplificará en la fase siguiente.
- b) La fase de *contrachoque* es una reacción de rebote (defensa contra el choque). Se caracteriza por la movilización de una fase defensiva durante la cual se produce hipertrofia de la corteza suprarrenal con signos de hiperactividad (liberación de corticoides), la involución rápida del sistema timo-linfático y, en general, signos opuestos a los de la fase previa como la hipertensión, hiperglucemia, diuresis, hipertermia, etc.

2. Etapa de resistencia.

Ningún organismo puede mantenerse constantemente en un estado de alarma, ya que si el agente estresante se mantiene, el animal muere en pocas horas o días. Para sobrevivir, la fase inicial de alarma debe seguirse necesariamente de esta etapa. En esta etapa se produce la adaptación del organismo al agente que provocó esta reacción, produciéndose la mejoría y desaparición de la sintomatología citada anteriormente; incluso se invierten (mientras que en la primera predomina el catabolismo, durante la fase de resistencia se evidencian signos de anabolismo). Esta aclimatación al agente estresante se acompaña de una menor resistencia a otros estímulos, o lo que es decir, que se adquiere la adaptación a un agente a costa de la menor resistencia a otros agentes.

3. Etapa de agotamiento.

Si el agente estresante permanece en el tiempo, el organismo pierde la adaptación conseguida anteriormente y entra en esta tercera fase de agotamiento, en la que reaparecen los síntomas característicos de la reacción de alarma. Esto puede significar la muerte del mismo si es lo suficientemente intenso y prolongado.

La respuesta frente al estrés permite la adaptación necesaria para lograr la supervivencia en condiciones adversas. Así, un animal que ve amenazada su vida tiene que luchar o huir. Para ello, su organismo debe tratar de conseguir el mayor aprovechamiento de sus recursos mediante un incremento de la capacidad de concentración y estado de alerta que le permitirán detectar el peligro, aumentar el ritmo cardíaco y presión sanguínea, suprimir la digestión, redistribuir la sangre a los músculos, aumentar el tono muscular, disminuir su deseo sexual y la actividad de su sistema inmune, entre otros. Esto supone una privación de la energía necesaria a otros sistemas no tan implicados en conseguir los objetivos para lograr la supervivencia (Sapolsky, 1998).

El problema que acontece en los humanos es que, a diferencia de los animales en los que suele deberse a algo que ellos interpretan como una amenaza para su integridad, puede desencadenarse en múltiples situaciones y por estímulos muy diversos sin que realmente esa respuesta tenga alguna utilidad. El que algunas situaciones sean más estresantes que otras depende de múltiples factores y por supuesto, de cada individuo.

3.2. CONSECUENCIAS GENERALES DEL ESTRÉS.

El estrés tiene *consecuencias positivas* que permiten una mejor adaptación al entorno y facilitar la supervivencia como ya se comentó anteriormente. En este sentido, provoca un aumento del estado de alerta, una mayor atención, cese de la ingesta de alimento y de actividades sexuales, etc; provocando una redistribución de la energía (oxígeno y nutrientes) al sistema nervioso central y a aquellas partes del organismo que más lo necesiten (Dom y Chrousos, 1993). Todo ello permite mejorar el rendimiento en situaciones críticas como el miedo, actividades deportivas o una cita importante.

Sin embargo, también puede tener *consecuencias negativas*. El estrés agudo puede ser dañino en algunas situaciones, por ejemplo, una descarga catecolaminérgica excesiva puede provocar una angina de pecho o un infarto de miocardio. Es sobre todo cuando el estrés pasa a ser prolongado, cuando todas las partes del organismo implicadas (cerebro, corazón, pulmones, vasos sanguíneos y músculos) se pueden deteriorar tanto por estar sobreactivadas como por funcionar a un nivel menor al

habitual, produciéndose multitud de procesos patológicos entre los que destacan (para rev. ver Baum y Posluszny, 1999):

- *Disfunción coronaria*: El estrés agudo tanto físico como mental puede ser desencadenante de arritmias e infartos. La hiperactivación del sistema nervioso simpático produce taquicardia, vasoconstricción, hipertensión, hemoconcentración y aumento de niveles de colesterol; todos ellos factores predisponentes de esta patología.
- *Infarto isquémico cerebral*: Varios estudios han confirmado la relación entre la exposición a estrés y la propensión a sufrir este tipo de daño cerebral (Larson et al, 2001; May et al, 2002).
- *Patologías neuropsiquiátricas*: El estrés se ha relacionado con diversas patologías de este índole como la esquizofrenia (Balazs y Cotterrell, 1972; Walker y Diforio, 1997), síndrome de estrés postraumático, depresión (Carroll et al, 1976) y Enfermedad de Alzheimer (DeLeon et al, 1993)
- *Alteración del sistema inmunitario*: El estrés crónico disminuye la capacidad de actuación del sistema inmune con lo que se incrementa el riesgo de infecciones, exacerbar la sintomatología infecciosa o facilitar la aparición de procesos autoinmunitarios.
- *Diabetes*: El estrés crónico puede conducir a desarrollar resistencia a la insulina, desencadenando una diabetes tipo 2 o empeorándola.
- *Alteraciones del sueño*: El estrés es un factor etiológico de insomnio y otros trastornos.
- *Perdida de memoria, dificultad de concentración y trastornos del aprendizaje*.
- *Disfunción sexual y reproductiva*: Como fue comentado anteriormente, una de las consecuencias de la respuesta del estrés es la disminución del deseo sexual, impotencia transitoria y disminuye la capacidad de alcanzar el orgasmo. También puede verse afectada la fertilidad, produciéndose incluso amenorrea. En mujeres embarazadas se aumenta el riesgo de abortos y de nacimientos prematuros y de bajo peso.
- *Trastornos alimentarios*: El estrés puede ser causa de aumento o pérdida de peso y se ha relacionado con cuadros de anorexia o bulimia nerviosas.

- *Trastornos relacionados con dolor*: Parece existir relación entre el estrés y ciertos tipos de dolores como los musculares, articulares o cefaleas.
- *Otras alteraciones* en las que el estrés parece estar implicado: como el desarrollo de alergias, alteraciones de la piel (psoriasis, acné, eczemas), alopecia areata y enfermedades periodontales.
- Por último, *trastornos gastrointestinales*: El estrés puede producir diarrea, estreñimiento, dolor o dispepsia, entre otros. Es bien conocida su relación con el síndrome de intestino irritable (SII) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), hecho que será tratado de forma específica posteriormente.

3.3. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS.

La respuesta adaptativa frente al estrés se caracteriza por cambios físicos y de comportamiento. Como se mencionó anteriormente, tanto la activación como la terminación de esta respuesta son críticas para la adaptación y la supervivencia. El control adecuado de todos estos cambios se coordina por el “*sistema del estrés*”, constituido por dos sistemas interconectados: El eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) y el sistema nervioso autónomo (SNA).

Eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal.

Al producirse una situación de estrés se activan múltiples zonas del cerebro, siendo las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular en el *hipotálamo* las principales implicadas en iniciar dicha respuesta. Estas neuronas expresan factor liberador de corticotropina (CRF) que se libera desde la eminencia media a la circulación portal para llegar a la *hipófisis*. Allí estimulan a las células productoras de proopiomelanocortina (POMC) para que liberen ACTH, un producto final del procesado de POMC. La ACTH transportada por la circulación sistémica se une a los receptores en la corteza de la *glándula suprarrenal* dando lugar a la síntesis de esteroides y a la elevación de glucocorticoides en plasma (Figura 9).

Hay otros factores implicados en los distintos tipos de estrés que potencian la actividad del eje HHA. Entre estos se incluyen la angiotensina II, citoquinas y mediadores lipídicos de inflamación.

La ACTH circulante es el principal regulador de la secreción de glucocorticoides por la corteza suprarrenal, aunque otras hormonas, algunas de ellas originadas en la médula de la glándula suprarrenal, también participan de esta regulación (Hinson, 1990). Los glucocorticoides son los efectores finales del eje HHA y participan en el control de la homeostasis en todo el organismo y en la respuesta de éste frente al estrés.

El mantenimiento de niveles elevados de glucocorticoides tiene múltiples efectos perjudiciales. Así pues, es importante conseguir una conclusión de la respuesta al estrés en el momento adecuado. Para ello, los propios glucocorticoides ejercen una autoinhibición mediante su unión a receptores citoplasmáticos en el hipocampo y el hipotálamo donde inhiben la secreción de CRF y por consiguiente, también la de ACTH en la hipófisis.

Sistema Nervioso Autónomo.

El estrés activa directamente las fibras nerviosas que descienden desde el hipotálamo hacia el núcleo pontomedular que controla la respuesta autonómica. La estimulación del sistema nervioso simpático (SNS) produce la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en la médula adrenal. Por otro lado, las neuronas del SNS inervan directamente todo el tubo digestivo mientras que el parasimpático (SNP) lo hace a través del vago en el aparato digestivo superior y de los nervios sacros en el colon distal y recto (Goyal e Hirano, 1996). Las neuronas aferentes y eferentes del SNS y SNP comunican bidireccionalmente también con el plexo nervioso entérico (SNE) constituyendo el “*eje cerebro-digestivo*” (Figura 9). El SNE esta constituido por cien millones de neuronas que regulan la motilidad, las funciones exocrinas y endocrinas y la microvascularización del tracto gastrointestinal.

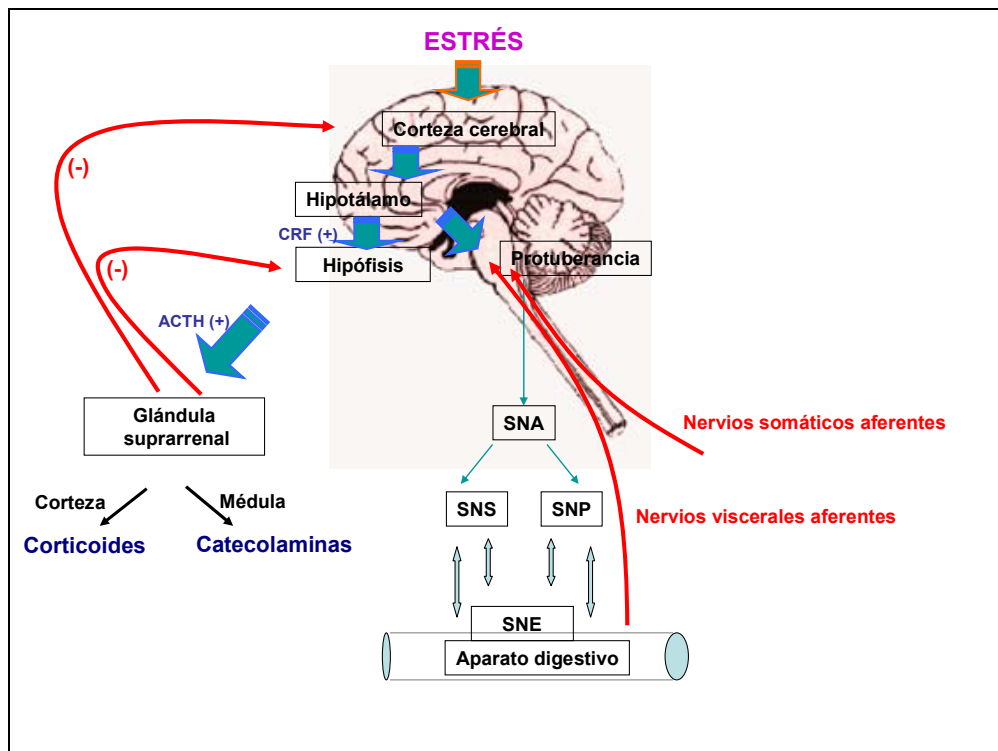


Figura 9. Respuesta fisiológica del estrés.

A su vez, el eje HHA, el SNA y el SNE pueden interactuar directamente con el sistema inmune:

- Las fibras del SNA interactúan con linfocitos y macrófagos en los ganglios linfáticos, médula ósea, timo, bazo, y tejido linfoide asociado a mucosas. Una gran variedad de neurotransmisores del SNA y SNE como catecolaminas, péptido intestinal vasoactivo, angiotensina II, neurotensina, sustancia P, somatostatina, etc, son capaces de afectar la función de linfocitos, macrófagos, neutrófilos y otras células inflamatorias. De esta forma, la adrenalina y noradrenalina producen un aumento del número de células “natural-killer” (NK) y citotóxicas circulantes y disminuyen la producción de TNF- α por los monocitos (Van der PT y Lowry, 1997; Kappel et al, 1998) e incrementan la producción de interleuquina 6 (IL-6), IL-8 e IL-10. Además, estas últimas disponen de receptores para las hormonas y neuropéptidos del eje HAA como la hormona del crecimiento, ACTH, corticoides y CRF (Reichlin 1993; Ader et al, 1995; Mayer, 2000).
- Los glucocorticoides liberados por la corteza suprarrenal tienen efecto inmunosupresor. Por un lado aumentan la síntesis de citoquinas

antiinflamatorias como la IL-10, la lipocortina-1 y el antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1ra) y por otro, reducen la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), IL-6, el TNF- α a través de la inhibición de la transcripción del factor NF- κ B (Ray y Sehgal, 1992; Barnes, 2001; Joyce DA et al, 2001). Además inducen la apoptosis en algunas células inflamatorias como linfocitos y eosinófilos (Amsterdam et al, 2002).

- La sustancia P liberada por el SNE es capaz de inducir la liberación de histamina por los mastocitos de la mucosa en pacientes con EII (Raithel et al, 1999), incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias y estimular la quimiotaxis de células inflamatorias por aumento de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio microvascular y CD11b en neutrófilos (O'connor et al, 2004). Aún no hay datos publicados de incremento de esta sustancia en respuesta al estrés aunque es probable que tenga su papel.

3.4. EFECTO DEL ESTRÉS EN EL APARATO DIGESTIVO: EFECTO SOBRE EL CURSO CLINICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL HUMANA.

El centro cerebral que genera la respuesta de estrés es el llamado “circuito central del estrés”, constituido por el núcleo paraventricular del hipotálamo, la amígdala y la sustancia gris periacueductal. Éste recibe información de las vías aferentes viscerales y somáticas y también de la corteza visceral motora (corteza medial prefrontal, cíngulo anterior y el lóbulo de la ínsula). La vía eferente de este circuito es el llamado “sistema motor emocional” que incluye las fibras autonómicas eferentes, el eje HHA y los sistemas moduladores del dolor (Bhatia et al, 2005). El estrés crónico puede inducir una alteración crónica en la respuesta del estrés. Un mediador fundamental en la respuesta central del estrés en este eje es el CRF, comentado anteriormente. Existen 2 subtipos de receptores del mismo: el receptor CRF-1, implicado en la activación del peristaltismo colónico y el CRF-2, responsable de la inhibición del vaciamiento gástrico que ocurre en la respuesta al estrés (Tache et al, 2001; Martínez et al, 2004). Muchos otros neurotransmisores y neuroinmunomoduladores están siendo estudiados, como por ejemplo, la serotonina endógena, periféricamente liberada en respuesta al estrés, que favorece la motilidad colónica a través de los receptores 5HT-3 (Spiller, 2001;

Monnikes et al, 2001) o los glucocorticoides liberados, que ejercen una retroinhibición de la respuesta del estrés mediante su acción sobre receptores localizados en el hipocampo y en la corteza medial prefrontal (Bhatia et al, 2005). Además debe, tenerse en cuenta que el estrés psicológico en el sistema inmune y la inflamación es complejo y depende de la duración e intensidad del agente estresante (Straub et al, 2005). Todo ello da idea de la gran complejidad de este sistema.

Desde hace mucho tiempo se ha implicado al estrés en la patogenia de múltiples procesos gastrointestinales como en el SII, la EII, en la enfermedad ulcerosa péptica y la enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Papel en los trastornos de motilidad: SII.

Clásicamente se ha considerado al SII como un trastorno funcional crónico influenciado por la personalidad y comportamiento de los individuos. En estudios clínicos se ha observado como los pacientes con SII y dispepsia presentan más eventos vitales estresantes y empeoran cuando son expuestos a factores estresantes (Whitehead, 1996). Estudios recientes han identificado como factor de riesgo principal el padecimiento de gastroenteritis bacterianas en sujetos quizás genéticamente predispuestos (García Rodríguez et al, 2000). El estrés agudo experimental es capaz de provocar en individuos sanos la degranulación de las células cebadas en la pared intestinal, la liberación de la triptasa mastocitaria en la luz intestinal, el aumento paralelo de las concentraciones lumbales de histamina y prostaglandinas y un incremento de la permeabilidad intestinal (Santos et al, 1998). De esta manera, los acontecimientos estresantes ulteriores que experimente el sujeto pueden incrementar el riesgo de reactivar y perpetuar un SII postinfeccioso (Gwee et al, 1996; 1999).

Por otro lado, en estudios de motilidad se ha comprobado como el estrés psicológico es capaz de aumentar las contracciones peristálticas mientras que el estrés físico produce más ondas simultáneas y por tanto, ambas aumentan la actividad motora colónica. Sin embargo, el estrés psicológico es capaz de producir una respuesta más prolongada y sin estar mediada por el sistema autonómico (Rao et al, 1998). También se ha demostrado que éste es capaz de aumentar la secreción intestinal de agua, sodio y cloro (Barclay y Turnberg, 1988; Santos et al, 1998). Además se ha demostrado que el estrés agudo, siempre que suponga una elevada carga emocional, puede aumentar la sensibilidad a una estimulación visceral experimental, hecho que también es capaz de

provocar y exacerbar la sintomatología del SII y en el que parece que esta implicada la activación o sensibilización de los mastocitos en la mucosa (Santos et al, 1998; Monnikes et al, 2001).

Papel del estrés en la EII.

Desde las primeras descripciones de la colitis ulcerosa, el estrés se ha implicado en la aparición de reagudizaciones (Sullivan, 1936). Por ejemplo, la colitis fue descrita primero en los árabes beduinos después de que fueran trasladados a albergues del gobierno, hecho que se atribuyó al estrés sufrido por ello (Salem et al, 1967). La idea de que los factores psicológicos pueden influir en la evolución de la EII es una creencia aceptada tanto por parte de gastroenterólogos (Mitchell et al, 1987) como de pacientes (Lewis, 1988; Robertson et al, 1989). Sucesivamente en varios estudios se ha observado que diversos factores psicológicos como el estrés generalizado (Greene et al, 1994; Levenstein et al, 2000), acontecimientos vitales estresantes mayores como un divorcio o la muerte de un ser querido (Duffy et al, 1991a; Levenstein et al, 1994; Bitton et al, 2003) o menores como los problemas de la vida diaria (Garrett et al, 1991; Greene et al, 1994), se asocian a un incremento de la actividad y recaídas de la EII (ver tablas 8 y 9). Sin embargo, no en todos los estudios la evidencia ha sido consistente (Riley et al, 1990; North et al, 1991; von Wietersheim et al, 1992; Levenstein et al, 2000); quizás por el escaso tamaño muestral y la falta de estratificación que elimine factores de confusión.

Además, la ansiedad y, también la depresión, no sólo se han relacionado con incrementos en la actividad de la enfermedad y recaídas (North et al, 1991; Porcelli et al, 1994; Porcelli et al, 1996) sino también en un aumento del uso de recursos sanitarios (Drossman et al, 1991).

Se han empleado diversas escalas para determinar el impacto de los factores psicológicos estresantes en la aparición de brotes, entre las que destacan:

- El *Symptom Checklist-90R* es una lista de síntomas utilizadas para evaluar el estrés psicológico (Derogatis, 1994). Consta de 90 ítems que incluyen una variedad de síntomas de estrés ocurridos en la última semana agrupados en 9 grupos: Somatización, síntomas obsesivo-compulsivos, sensibilidad interpersonal, depresión, ansiedad, hostilidad, ansiedad fóbica, ideación paranoide y psicótica. Se pondera con el Índice de Severidad Global que

combina número e intensidad de los síntomas, siendo una puntuación mayor o igual de 63, la que corresponde a un nivel de estrés importante.

- La *Escala de eventos vitales estresantes PERI (Psychiatric Epidemiology Research Interview)* se utiliza para determinar este tipo de acontecimientos capaces de desencadenar esta respuesta (Dohrenwend et al, 1978). Incluye 102 eventos positivos y negativos experimentados por el sujeto en el último mes. Utilizado en población general clasifica dichos sucesos en 11 grupos: escuela, trabajo, amor y matrimonio, hijos, familia, residencia, problemas penales y legales, negocios, actividades sociales, salud y miscelánea. Se valora mediante una escala analógica visual de 100 mm para cada uno de los eventos.
- La *escala de estrés percibido* es una lista de 10 ítems sobre el grado de estrés percibido que presenta un paciente ante situaciones consideradas como estresantes en el último mes (Cohen et al, 1988). Cada uno de los ítems se valora de 0 a 4. La puntuación total da una idea de cómo se siente un paciente en cuestión ante situaciones estresantes.
- El *Inventario de estrés semanal (WSI)* se utiliza para valorar los acontecimientos estresantes menores ocurridos la última semana (Kimmel et al, 1996). Consta de 87 ítems sobre eventos ocurridos en la última semana y ponderados por una escala de 7 puntos. Una puntuación alta indica mayor número de eventos y mayor impacto negativo de los mismos.
- La *Lista de experiencias recientes de Holmes y Rahe (SRE)*, similar a la anterior, incluye una lista de 43 eventos experimentados en los últimos 6 meses o 1 año (Holmes et al, 1967). Cada evento es presentado en forma de definición y con un peso específico según su propensión a causar disrupción emocional en el paciente.
- El *Cuestionario de soporte social* es usado para valorar el grado y tipo de satisfacción de un paciente con el soporte social que tiene (Sarason et al, 1983). En concreto se ha utilizado una versión abreviada, el SSQ-6, que se divide en 2 subescalas, la SSQ-N que incluye 6 ítems sobre el tipo de soporte y la SSQ-S que incluye otros 6 ítems que valoran el grado de satisfacción con el soporte disponible percibido. La primera se valora de 0 a 9 y la segunda de 1 a 6. Una mayor puntuación indica mayor soporte social y mayor satisfacción respectivamente.

VARIABLE	Hazard Ratio	IC 95%	Cox p (Logrank p)
Cuestionario estrés general percibido			
• Tertil bajo (grupo de referencia)	1.0		
• Tertil medio	1.2	0.42-3.5	0.71 (0.71)
• Tertil alto	2.8	1.1-7.2	0.03 (0.03)
Escala de depresión del CES*			
• Tertil bajo (grupo referencia)	1.0		
• Tertil medio	0.83	0.30-2.3	0.72 (0.69)
• Tertil alto	0.99	0.36-2.7	0.98 (0.84)
Acontecimiento vital mayor estresante en los últimos 6 meses	0.73	0.27-2.0	0.54 (0.54)

Tabla 8: Riesgo de exacerbación en pacientes con CU según factores psicológicos de base: Análisis univariado con comparación de curvas de Kaplan-Meier y modelo de regresión de Cox (modificado de Levenstein et al, 2000). *Centro de estudios Epidemiológicos (Italia).

VARIABLE	Hazard Ratio	IC 95%	Valor p Cox
Escala eventos estresantes PERI*	1.165 por evento	0.98-1.39	0.09
Escala de estrés percibido	0.898 por 10	0.53-1.53	0.69
Índice de Severidad Global	1.038 por 0.10	0.95-1.14	0.43
• Depresión	1.011 por 0.10	0.95-1.08	0.74
• Ansiedad	1.000 por 0.10	1.00-1.00	0.89

Tabla 9: Riesgo de exacerbación en pacientes con CU según factores psicológicos entre 10 y 45 días antes de la recaída: Análisis univariado con modelo de regresión de Cox (modificado de Bitton et al, 2003). *Psychiatric Epidemiology Research Interview.

Una limitación importante a la hora de estudiar el papel del estrés en la evolución de la EII radica en determinar la dirección de causalidad, es decir, si el estado psicológico es causa o consecuencia de la reagudización. En ese sentido, destacan algunos estudios tanto retrospectivos (Feldman et al, 1967; Hislop, 1974; Fava et al,

1976) como prospectivos (Duffy et al, 1991b; Levenstein et al, 2000), que han demostrado el papel del incremento del estrés como factor previo a la reagudización. Incluso se han desarrollado test específicos para evaluar este tema como el cuestionario de estrés percibido (Levenstein et al, 1993), con el que se ha comprobado incluso una relación del nivel de estrés crónico con anormalidad de la mucosa en la endoscopia (Levenstein et al, 1994). En cambio, hay otros que no han conseguido demostrar una relación inequívoca de éste antes de la recaída (North et al, 1991; Greene et al, 1994) y otros, que han evaluado la reagudización posterior del estrés como consecuencia del propio brote (Sewitch et al, 2000) y su impacto en la calidad de vida (Turnbull et al, 1995; Pace et al, 2003). En la tabla 10 se resumen los múltiples estudios publicados sobre la asociación del estrés y las exacerbaciones en la EII.

A pesar de esta evidencia disponible, las implicaciones terapéuticas son también tema de debate, siendo las conclusiones de distintos estudios contradictorias. Además existe una amplia variedad de tipos de intervención psicoterapéutica, siendo difícil el diseño de estudios controlados. En un estudio controlado y randomizado con un año de seguimiento, en el que un grupo de 80 sujetos acudieron a 6 clases de control del estrés que incluían técnicas de comunicación y autocontrol, se demostró una mejoría en la actividad de la EC aunque no se observaron cambios en la necesidad de medicación (Milne et al, 1986). Sin embargo, otros ensayos con psicoterapia (Engel, 1958) y con técnicas de control de estrés (Schwarz y Blanchard, 1991) han demostrado sólo un pequeño efecto en el curso de la enfermedad o ninguno (Greene et al, 1994, Jantschek et al, 1998). Un estudio controlado de 12 pacientes con EII evaluó el beneficio de la hipnoterapia, objetivándose una tendencia, aunque no significativa, a mejorar el índice de calidad de vida a las 6 semanas (Shetty et al, 2004). En relación con la depresión se ha analizado el papel de la terapia cognitiva en adolescentes con depresión y EII, encontrándose igualmente una mejoría en la percepción del estado de salud pero sin modificación de los índices de enfermedad (Szigethy et al, 2004).

Sin embargo, se ha observado que el soporte social puede tener un impacto positivo en la evolución de la EII al reducir el grado de estrés, especialmente en casos de altos niveles del mismo (Sewitch et al, 2000).

VARIABLE	MÉTODO	CONCLUSIÓN	AUTOR
EVENTOS VITALES			
ESTRESANTES (EVE)			
Análisis retrospectivo de EVE antes del brote	60 pac con CU	Asociación positiva	Fava et al, 1976
Análisis retrospectivo de 2 años EVE antes del brote	70 pac con EC, 44 pac con CU	Asociación positiva en EC pero no en CU	Paar et al, 1988
Análisis retrospectivo de EVE antes del brote	30 pac con CU	Asociación positiva	Bach et al, 1990
Análisis prospectivo 6 meses de EVE antes del brote	124 pac con EII	Asociación positiva	Duffy et al, 1991 ^a
Análisis prospectivo de 2 años de EVE antes del brote	32 pac con EII	No asociación	North et al, 1991
Análisis prospectivo 1 año de EVE antes del brote	108 pac con EII	No asociación	Von Wietersheim et al, 1992
Análisis retrospectivo de EVE en los 12 meses previos al brote de pacientes con CU y controles	122 pac con CU	Asociación positiva	Tocchi et al, 1997
Análisis prospectivo 1 año de EVE antes del brote	60 pac con CU	Asociación positiva	Bitton et al, 2003
Análisis prospectivo de 16 meses de prevalencia de EII en pac que han perdido un hijo y controles	21.062 padres que perdieron un hijo	No aumento prevalencia EII	Li et al, 2004
Análisis prospectivo de 2 años de EVE antes del brote	18 pac con EC	Asociación positiva de depresión y EVE	Mardini et al, 2004
ESTRÉS CRÓNICO PERCIBIDO (ECP)			
Análisis de aspecto endoscópico de mucosa y ECP	46 pac con CU	Asociación positiva	Levenstein et al, 1994
Análisis prospectivo de 2 años de ECP antes del brote	62 pac con CU	Asociación positiva	Levenstein et al, 2000
ESTRÉS DIARIO (ED)			
Análisis prospectivo de 28 días de ED y gravedad de enfermedad	10 pac con EC	Asociación positiva	Garret et al, 1991
Análisis prospectivo de 1 año de ED antes del brote	11 pac con EII	Asociación positiva	Greene et al, 1994

Tabla 10: Resumen de estudios de asociación entre estrés y EII.

3.5. EFECTO DEL ESTRÉS EN EL APARATO DIGESTIVO DE MODELOS ANIMALES.

3.5.1. Modelos de estrés animal.

Para el trabajo con estrés animal hay diversos modelos validados que difieren en factores tales como que el animal pueda o no huir de él (escapable o inescapable), que el

animal tenga o no alguna forma de saber cuándo se va a producir y de qué tipo va a ser (predecible o impredecible) o que la forma de provocar estrés en el animal sea por medios físicos o psicológicos.

- De entre todos los métodos de inducción de estrés, los que suponen un *estrés físico inescapable* son los más frecuentemente utilizados. Alguno de ellos han sido usados como modelos para estudiar respuestas metabólicas (ayuno o ejercicio forzado). Destacan:
 - Estrés por inmovilización: Es el más frecuentemente utilizado para provocar estrés agudo en estudios que evalúan el papel del estrés en el aparato digestivo. Consiste en una restricción del movimiento tras introducir al animal en una bolsa u otro dispositivo que lo impide. Como es el método utilizado en esta tesis, posteriormente se desarrollará la justificación del modelo y el método.
 - Exposición a sonido: Es otro modelo ampliamente utilizado en este tipo de estudios. Consiste en la colocación de un sonicador al lado de la jaula del animal que genera sonidos audibles por los roedores en torno a 25 decibelios.
 - Exposición a temperaturas extremas, especialmente a frío.
 - Restricción de agua.
 - Ayuno.
 - Natación forzada.
 - Ejercicio en rota-rod.
 - Choques eléctricos.
- Estrés *social* o *emocional*: Son mucho menos utilizados por su dificultad de interpretación. Destacan:
 - Apiñamiento o aislamiento social.
 - Lucha.
 - Intervención de agentes farmacológicos (inyección de agentes irritantes o que producen dolor).

Para simular el estrés crónico y la depresión, se utilizan la repetición de estos métodos durante largo tiempo o la separación del lecho materno en el período neonatal.

3.5.2 Efecto del estrés en el tracto gastrointestinal.

En modelos animales, el estrés parece producir reacciones psicofisiológicas que activan cambios en el tracto gastrointestinal que podrían favorecer el brote de la enfermedad, aunque todavía es un tema convertido. Hay algunos animales, como los titís de cabeza de algodón (“cotton-top tamarin”), con aumento de riesgo de colitis como consecuencia del estrés producido por la cría en cautividad (Stout y Snyder, 1969; Wood et al, 2000).

En diversos estudios se ha observado que el estrés por inmovilización o exposición a ruido es capaz de reactivar colitis quiescente inducida con bajas dosis de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Qiu et al, 1999; Colon et al, 2004) o con dextrano sulfato sódico (DSS) (Milde y Murison, 2002). Incluso hay evidencias iniciales de que puede producirse una inflamación leve en la pared intestinal por privación de agua (Söderholm et al, 2002b) o en animales en jaulas sometidas a sonidos intensos (Wilson y Baldwin, 1999).

Otro ámbito de estudio se centra en como traumas en la edad temprana de la vida predisponen a alteraciones colónicas en la edad adulta en respuesta al estrés. En diversos trabajos se ha observado que ratas que son separadas del lecho materno, presentan cambios en el sistema nervioso que se manifiestan como un incremento de la liberación de CRF, alteraciones de la expresión de los receptores de glucocorticoides y cambios en los sistemas noradrenérgicos y gabaérgicos (Kuhn y Schanberg, 1998; Arborelius et al, 1999; Caldji et al, 2000). Un estudio reciente ha evidenciado en éstas como se produce una alteración de la barrera mucosa colónica cuando son expuestas a estrés leve (Söderholm et al, 2002c) y en otro, como aumenta la gravedad de la colitis inducida con DSS (Milde et al, 2004). Igualmente en humanos se ha demostrado como acontecimientos adversos en edades tempranas se asocian a una hiperrespuesta al estrés y alteraciones del eje HHA (Heim et al, 1997; Heim et al, 2000).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. ANTECEDENTES INMEDIATOS.

Diversos estudios han mostrado la existencia de una conexión entre el sistema nervioso -y por tanto el estrés psicológico- y el aparato digestivo a través de la mucosa intestinal.

Estudios recientes han demostrado que el estrés incrementa la susceptibilidad del colon de ratas al daño oxidativo producido por la instilación de ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico (TNBS) en etanol al 50%. El TNBS actúa como alérgeno sensibilizante de contacto y el etanol, como agente que rompe la barrera mucosa y facilita la penetración del TNBS. Éste produce necrosis transmural activa como consecuencia del daño oxidativo al incrementar la expresión y actividad de iNOS (Morris et al, 1989). Colón et al, observaron que el estrés por inmovilización repetido durante 5 días aumenta la pérdida de peso en el grupo control y el tratado con dosis subcolíticas de TNBS (TNBS-5) respecto a las no estresadas. Igualmente y, aunque el estrés no produjo cambios inflamatorios macroscópicos en la mucosa colónica, sí produjo cambios microscópicos demostrados por un ensanchamiento del espacio entre las criptas y la muscular de la mucosa, un incremento del infiltrado inflamatorio en la lámina propia y entre las criptas y un aumento de las células con inmunorreactividad para iNOS en el grupo tratado con dosis subcolítica de TNBS-5. Asimismo, aumentaba la actividad mieloperoxidasa (MPO) en este grupo (TNBS-5) respecto a las no estresadas. La actividad calcio-independiente NOS se incrementó en el grupo TNBS-5 con estrés repetido, mientras que actividad calcio-dependiente, medida de la actividad de la isoforma constitutiva NOS, disminuyó respecto a las no estresadas. Los niveles de malondialdehído (MDA), producto citotóxico aldehído producido por la peroxidación lipídica de los ácidos grasos de las membranas celulares, aumentaron igualmente en el grupo TNBS-5 sometido a este estrés. Sin embargo, en los grupos tratados con dosis colíticas (30 mg, TNBS-30), el estrés no modificó dichos parámetros. De acuerdo a esto, el estrés podría transformar una colitis quiescente en una activa y afectar a la progresión de la enfermedad (Colón et al, 2004).

En relación al papel del estrés de forma aislada, se ha observado que el estrés por inmovilización produce un incremento en la enzima proinflamatoria **mieloperoxidasa** en la mucosa del colon aunque sin cambios apreciables en la histología con microscopia óptica (Collins et al, 1996).

Por otro lado, la respuesta al estrés parece estar en relación con un incremento en la **producción de NO**. En un trabajo se ha encontrado que el estrés por inmovilización produce un aumento de la actividad de la NOS calcio-independiente e induce la expresión de iNOS en neuronas corticales, así como la acumulación de ONOO⁻ (Olivenza et al, 2000). Con ello, los índices de peroxidación lipídica aumentan y hay un desgaste de los sistemas antioxidantes celulares, produciéndose alteración de la permeabilidad de la membrana y daño en las membranas celulares (Lih-Brody et al, 1996; Liu et al, 1996; Hu et al, 2000; Madrigal et al, 2001). En este contexto, la administración de dexametasona, que inhibe la inducción de la iNOS, disminuye la inflamación cólica (Palmer et al, 1992) y los tratamientos con inhibidores selectivos de iNOS, han demostrado ser protectores en colitis experimental (Zingarelli et al, 1998; Menchén et al, 2001). La activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) es un requerimiento esencial en la expresión de iNOS. Este es activado por citoquinas, neurotransmisores, factores de crecimiento, radiaciones ionizantes, radicales libres y otros agentes, y a su vez regula la expresión de numerosos mediadores de la respuesta inflamatoria (Baldwin, 1996; Bauerle y Baichwal, 1997). En estudios en cerebro, la exposición aguda a estrés estimula la traslocación de NF- κ B a las 4 h, y la inhibición de NF- κ B consigue inhibir también la inducción de iNOS en el estrés (Madrigal et al, 2001).

Asimismo se ha observado un aumento de la expresión de cicloxigenasa inducible en relación con el estrés. En un trabajo reciente en corteza cerebral, se ha demostrado un aumento de la prostaglandina E₂ (PGE₂) tras 2-6 horas de estrés y un aumento de la expresión de proteína COX-2 en corteza e hipocampo (Madrigal et al, 2003). En colon también se expresa de forma constitutiva y se sobreexpresa en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Muller-Decker et al, 1999; Mc Naughton y Cushing, 2000).

De la misma manera diversos trabajos han confirmado la activación concomitante de una vía antiinflamatoria a través de prostaglandinas como la PGJ₂, formada por la deshidratación del anillo ciclopentona de la prostaglandina D₂. Ésta se metaboliza posteriormente a otras prostaglandinas (PG), denominadas delta PG, que tienen actividad antiinflamatoria. Éstas son ligandos de gran afinidad del receptor activado por PPAR γ . Varios ligandos PPAR γ han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias in vitro e in vivo, probablemente por inhibir las señales de los factores

de transcripción NF- κ B, AP-1 o STAT-1 (Ricote et al, 1998). En cerebro se ha demostrado un aumento de la expresión de PPAR- γ en la neuronas corticales y la glía como consecuencia del estrés por inmovilización en ratas y como, la 15d-PGJ₂, es capaz de disminuir los mediadores inflamatorios en el cerebro de estas mismas sometidas a estrés (García-Bueno et al, 2005a; García-Bueno B et al, 2005b). Sin embargo, todos estos hechos en el colon aún no han sido completamente dilucidados.

También hay datos que sugieren un aumento de la **permeabilidad intestinal** con disminución de la producción de mucina y alteraciones en las interacciones de la mucosa con las bacterias, que pueden contribuir a la inflamación de la mucosa y que concuerdan con la hipótesis del papel de la flora intestinal en la inflamación (Saunders et al, 1994; Qiu et al, 1999; Wilson y Baldwin, 1999; Meddings y Swain, 2000; Elson, 2002). Así, el estrés en ratas produce un aumento de la permeabilidad intestinal a moléculas inertes marcadas como el manitol y Cr⁵¹-EDTA y a proteínas como la peroxidasa del rábano (Kiliaan et al, 1998). Esto concuerda con datos de microscopia electrónica donde puede objetivarse peroxidasa de rábano tanto dentro de endosomas intracelulares como en las uniones intercelulares epiteliales (Santos et al, 1999). Estas alteraciones parecen dependientes de:

- Una activación del sistema colinérgico, puesto que se ha observado una disminución de dichas alteraciones con atropina y un aumento en ratas Wistar-Kyoto deficientes en colinesterasa (Saunders et al, 1997).
- Una activación mastocitaria ya que ratas deficientes en mastocitos no presentan este aumento en la permeabilidad (Santos et al, 2000; Söderholm et al, 2002b). Además se ha observado un aumento del contenido de histamina en células mastocitarias de la mucosa del colon de ratas con estrés por inmovilización que, parecen dependientes de la liberación central en cascada de IL-1 y posteriormente de CRF (Eutamene et al, 2003).
- Una liberación de corticoides del eje HHA ya que en ratas con adrenalectomía, con bloqueo farmacológico de receptores de glucocorticoides (Meddings y Swain, 2000) o al pretratar con inyección intraperitoneal 20 minutos antes del estrés con el péptido α -helical CRH (un antagonista del CRF), no se produce la alteración de la barrera mucosa y el transporte iónico (Söderholm et al, 2002c).
- La sensibilización y activación de linfocitos T CD4⁺ que inducen la producción de interferón gamma (IFN- γ), IL-4, IL-10 e IL-13 y la fosforilación de la cadena ligera de miosina: La permeabilidad paracelular a través de células epiteliales

esta regulada principalmente por las uniones intercelulares, que son estructuras dinámicas influenciadas por factores fisiológicos y patológicos. Uno de los reguladores de la permeabilidad a través de las uniones intercelulares es la fosforilación de la cadena ligera de miosina por una quinasa. Por su parte, las citoquinas como la IL-4, IL-13, IL-10 son potentes moduladores de la permeabilidad paracelular. Todos ellos se han observado aumentados en ratas sometidas a estrés (Qiu et al, 1999; Ferrier et al, 2003).

Otro hecho demostrado en trabajos recientes es la aparición en relación con el estrés, de una alteración en la relación entre las bacterias de la flora y la mucosa intestinal. Así se ha observado un aumento del número de aerobios (*E coli*) en el intestino delgado proximal y una disminución en la proporción de anaerobios (*lactobacilos*) y aerobios (*E coli*) sin cambios en los anaerobios (*lactobacilos*) en ratones sometidos a estrés (Wang y Wu, 2005). Igualmente hay indicios de la existencia de **translocación bacteriana**; en concreto, se han observado *Escherichia coli* K-12 en tejido linfoide asociado a mucosas (Velin et al, 2004), *Salmonella choleraesuis* y *E. coli* 0157:H7 –pero no de *E. coli* no patógenas- en placas de Peyer yeyunales (Green et al, 2003), o de bacterias endógenas gram-positivas sin translocación de bacterias gram-negativas en ganglios mesentéricos, bazo e hígado (Ando et al, 2000). En este proceso parecen intervenir la liberación catecolaminérgica por el SNE o los mastocitos estimulados tanto por el CRF como por la sustancia P en respuesta al estrés. Sin embargo, la inducción directa de este fenómeno por el estrés agudo no está claramente determinada.

Asimismo se ha observado como la dexametasona es capaz de alterar la **inmunidad humoral** a nivel de mucosa, produciéndose un aumento de inmunoglobulina A (Ig A) en plasma y una disminución en las secreciones vaginal y salivar debido a una redistribución de la Ig A polimérica desde la mucosa al suero (Wira et al, 1990). Por tanto, dado que en el estrés aumenta los niveles de glucocorticoides, podría alterarse este tipo de inmunidad en ratas sometidas a estrés por inmovilización, siendo este uno de los objetivos de esta Tesis.

2. HIPÓTESIS.

Con estos antecedentes, probablemente en colon ocurran estos acontecimientos en relación con el estrés, por lo que proponemos la siguiente hipótesis: La exposición a estrés en ratas, es por sí misma capaz de aumentar la actividad de diversos parámetros inflamatorios en la mucosa del colon, alterar la permeabilidad intestinal a macromoléculas y favorecer fenómenos de translocación bacteriana. Probablemente se ponen en marcha mecanismos compensadores antiinflamatorios que contribuyen controlar sus efectos y restaurar los cambios que puedan haberse producido (ver Figura 10).

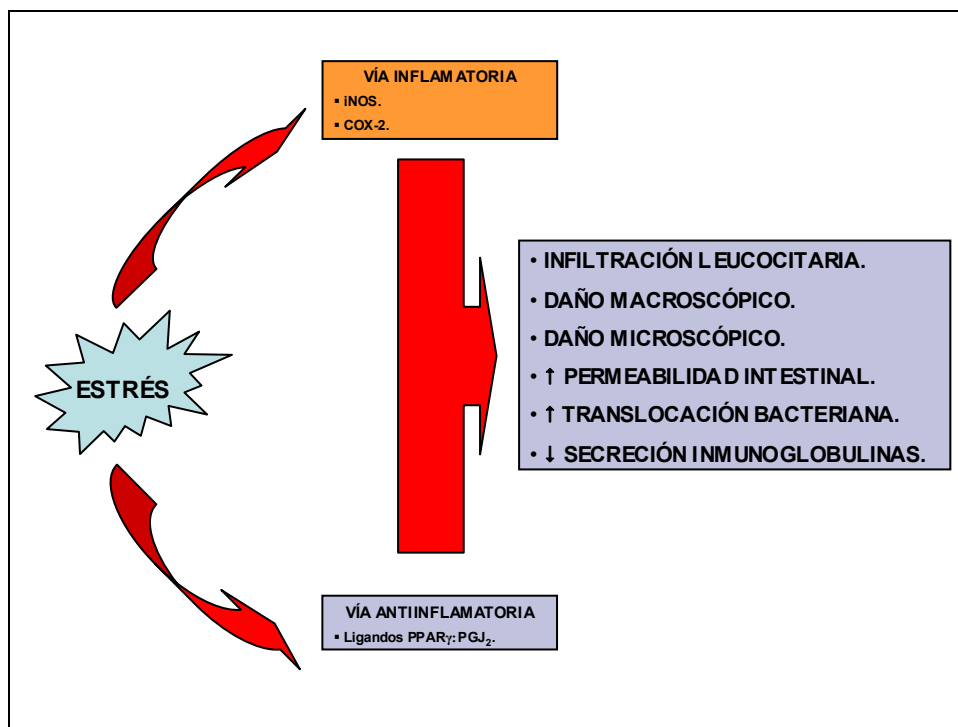


Figura 10: Hipótesis objeto de esta Tesis.

3. OBJETIVOS.

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar si la exposición aguda a estrés por inmovilización provoca la inducción de iNOS y la producción de NO en la mucosa del colon, comparándolos con los de ratas control.
- 2) Evaluar si la exposición aguda a estrés por inmovilización produce cambios en la expresión de las 2 isoformas de cicloxigenasa (COX-1 y COX-2) así como de sus productos (PGE₂) en la mucosa, comparándolos con los de ratas control.
- 3) Analizar si existe activación de la vía compensadora antiinflamatoria dependiente de PPAR- γ y de su ligando endógeno PGJ₂ en este contexto.
- 4) Comprobar si existe alteración en la permeabilidad intestinal y los mecanismos microscópicos implicados en ello.
- 5) Observar si se produce translocación bacteriana de la flora luminal en relación con lo anteriormente acontecido y dilucidar los mecanismos implicados en ello.
- 6) Demostrar si los cambios anteriores mejoran con el estrés mantenido.
- 7) Estudiar las implicaciones terapéuticas de los fenómenos observados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL: ESTRÉS POR INMOVILIZACIÓN.

Para el estudio experimental se emplearon ratas Wistar macho de entre 225-250 g de peso. Todos los protocolos experimentales utilizados en esta Tesis se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense conforme a la regulación europea y española (DCUE86/609/CEE, RE 223/1988, OEM 13/X/1989 y RD 1201/2005). Al final de esta sección se adjunta una copia del permiso oficial solicitado al inicio de estos experimentos.

Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales bajo condiciones estándar de temperatura y humedad, con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (encendido de las luces a las 8:00 a.m.) y con acceso libre a agua y comida. Todos los animales se mantuvieron en condiciones constantes durante los cinco días previos al inicio del estrés. La inmovilización comenzó a las 9:00 a.m. en la habitación donde estaban alojadas. Para esto se empleó un inmovilizador plástico para roedores tipo Decapi-cone[®] (Braintree, MA. USA) con forma de cono truncado que se ajusta al cuerpo de la rata y se cierra en el extremo de la cola impidiendo el movimiento de sus extremidades y de su cabeza, sin alterar los movimientos respiratorios (Figura 11) (Magariños et al, 1997; Leza et al, 1998). Una vez inmovilizadas, las ratas permanecieron en sus jaulas habituales y se realizaron sesiones de 6 horas en el período de luz en un laboratorio adyacente a la sala de estabulación.



Figura 11: Imagen de rata Wistar introducida en el cono tipo Decapi-cone[®] en sesiones de 6 horas.

Las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua durante todos los experimentos excepto durante los períodos de estrés de 6 horas incluyendo al grupo no estresado, que se les retiró para evitar interferencias en el peso. Asimismo, los animales control, no estresados, fueron alojados en una habitación distinta y manipulados a las 9:00 a.m. por el mismo experimentador (sacando al animal de la jaula y volviendo a introducirlo en ella) para favorecer el acostumbramiento al manejo por parte de éste y así, minimizar posibles sesgos derivados de este hecho.

Justificación del modelo de estrés por inmovilización.

Como fue argumentado con anterioridad, existen varios modelos aceptados de estrés en animales de experimentación. El método utilizado en este modelo se puede clasificar como inescapable, predecible y mixto físico-psicológico. Este es un paradigma clásico que combina estrés físico y psicológico, siendo de entre todos los métodos de inducción de estrés (exposición a temperaturas extremas, ayuno, natación forzada, ejercicio en rota-rod, choques eléctricos, inmovilización) uno fácilmente reproducible, disponible y repetible tanto para el estudio del estrés agudo y crónico. Según las recomendaciones del Nacional Center for Study of Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD), son los modelos escapable, los más útiles para el estudio de la neurodegeneración y síndrome de estrés postraumático en humanos y el que más utilizan los distintos autores (Telner y Singhal, 1984; Bremner et al, 1999; Poland et al, 1999), mientras que otras formas de estrés inescapable no pueden repetirse a lo largo de mucho tiempo. Asimismo, tal y como fue descrito en los apartados anteriores, la gran mayoría de trabajos sobre los que están basadas la hipótesis y los objetivos de la misma, se han realizado en modelos de estrés por inmovilización.

2. RECOGIDA DE MUESTRAS OBJETO DE ANÁLISIS.

Al finalizar la última sesión de estrés según el protocolo que se describirá ulteriormente, se procedió al sacrificio de los animales, mediante inyección intraperitoneal de anestesia terminal (0.4 ml de pentobarbital sódico, 320 mg/kg). Tras observar la ausencia de movimientos respiratorios y de reflejos al pinzamiento de la cola o de las patas traseras, se procedió a la apertura de las cavidades abdominal y torácica.

- **El plasma** se obtuvo por punción cardiaca en el ventrículo izquierdo y posterior extracción de sangre con una jeringa de 10 ml, mezclándose ésta con una 1 ml de una disolución de citrato sódico (3.15 % v/v) en una proporción 9:1 para evitar la coagulación de la muestra. Esta mezcla se centrifugó a 1500g durante 10 minutos, recogiendo el plasma sobrenadante para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis.
- **Las muestras de colon** se obtuvieron tras la apertura de la cavidad abdominal y disección del colon. Se extrajeron los 8 cm distales de colon (región desde recto a ángulo esplénico aproximadamente) para su apertura longitudinal y limpieza con salino con el fin de valorar el daño macroscópico.
Se evaluó el daño macroscópico según una escala de 0 a 4 por dos observadores independientes del estudio experimental de acuerdo a la escala descrita previamente por Bell con alguna modificación (Bell et al, 1995) –ver tabla 11-.

ESCALA DE VALORACION DE DAÑO MACROSCÓPICO
<ul style="list-style-type: none"> • 0: Mucosa normal. • 1: Mucosa con hiperemia y edema sin úlceras. • 2: Mucosa con hiperemia y edema con úlceras lineales o petequias. • 3: Mucosa con zonas de necrosis y ulceras amplias. • 4: Existencia de megacolon, perforación y/o estenosis.

Tabla 11: Escala para valoración de las lesiones macroscópicas en la mucosa de colon de los animales de estudio (modificada de Bell et al, 1995).

Tras esta valoración inicial, se obtuvieron muestras de 5x5 mm que se introdujeron inmediatamente en tubos Eppendorf® de 2 ml para congelación en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C hasta su utilización en fresco para las determinaciones que se describen a continuación.

Para la obtención de las muestras para estudio histológico, se obtuvieron muestras de colon de 5x5 mm que se introdujeron en tubos Falcon® que

contienen glutaraldehído al 2% (para la microscopía electrónica), en buffer fosfato sódico 0,1 M a pH de 7,4.

3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

En este apartado se recogen los diferentes procesos experimentales diseñados por objetivos para demostrar la hipótesis planteada (Tabla 12). Todos los experimentos se realizaron sobre cuatro grupos de estudio, empleando 12 ratas en cada grupo (Tabla 13): uno control (C), otro de animales estresados únicamente una sesión de 6 horas (S6h), otro de ratas sometidas a sesiones de 6 horas durante 5 días (S5d) y por último, otro con el mismo procedimiento durante 10 días (S10d); todo ello con el objeto de analizar si los cambios producidos durante el estrés agudo se modificaban al mantener el estímulo estresante (Figura 12).

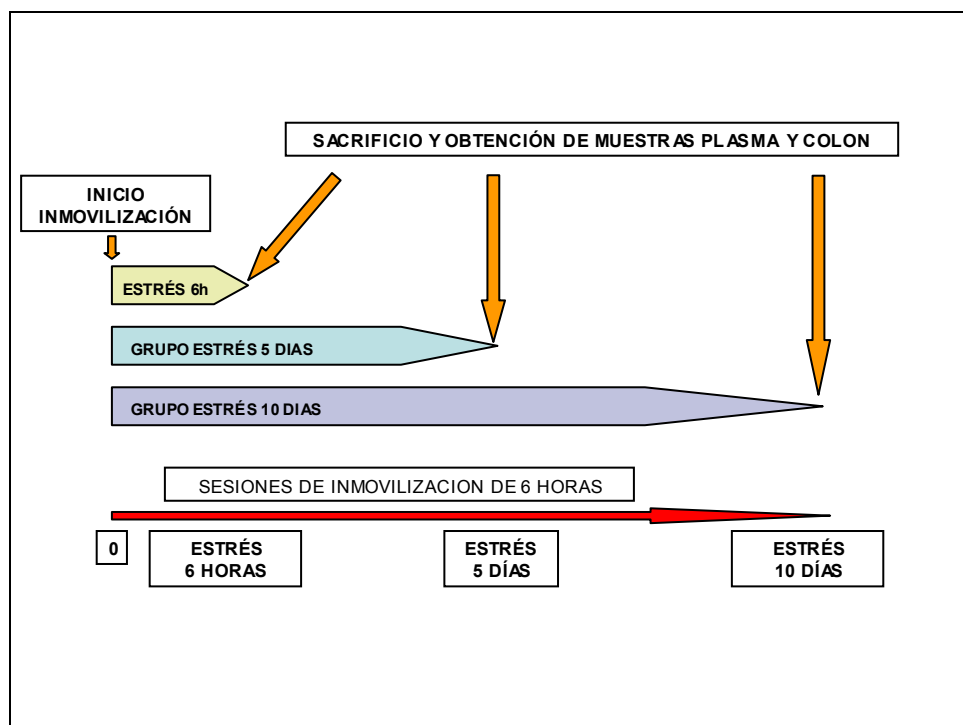


Figura 12: Protocolo de estrés realizado en cada uno de los grupos de estudio.

- 1. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS: PÉRDIDA DE PESO.**
- 2. ANÁLISIS DEL DAÑO MACROSCÓPICO EN MUCOSA DE COLON.**
- 3. INDUCCIÓN DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA EN RESPUESTA AL ESTRÉS.**
- 4. DETERMINACIÓN DE INFILTRACION LEUCOCITARIA:**
 - ❖ Estudio de actividad mieloperoxidasa en mucosa de colon.
- 5. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO NITROSATIVO POR ESTRÉS:**
 - ❖ Estudio de la expresión de iNOS en el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
 - ❖ Análisis de la actividad de iNOS y nNOS durante el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 6. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO POR ESTRÉS:**
 - ❖ Estudio de la expresión de COX-1 Y COX-2 en el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
 - ❖ Estudio de la producción de prostaglandina inflamatoria PGE₂ en el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 7. TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF-κB COMO INDUCTOR DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO PROVOCADA POR ESTRÉS:**
 - ❖ Expresión de p65 en extractos de citoplasma y nucleares de células epiteliales en el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 8. INDUCCIÓN DE LA VIA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS:**
 - ❖ Estudio de la producción de prostaglandina antiinflamatoria PGJ₂ en estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
 - ❖ Expresión de PPAR-γ en el estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 9. ALTERACIÓN DE PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS:**
 - ❖ Determinación de permeabilidad por instilación rectal de Cr51-EDTA en estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
 - ❖ Estudio microscópico de las uniones intercelulares en las células epiteliales de ratas control y sometidas a estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 10. ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS:**
 - ❖ Cultivo de ganglios linfáticos, bazo e hígado para aerobios gram+ y gram- y anaerobios de los grupos control, de estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 11. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA INDUCIDA POR ESTRÉS:**
 - ❖ Determinación de Inmunoglobulina A (IgA) en mucosa colónica inducida por estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.
- 12. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ₂/PPAR-γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS:**
 - ❖ Determinación de mediadores inflamatorios y antiinflamatorios, permeabilidad intestinal, translocación bacteriana y respuesta humoral tras tratamiento con Rosiglitazona y PGJ₂ en estrés agudo de 6 horas, 5 y 10 días.

Tabla 12: Resumen de los protocolos experimentales realizados.

	CONTROL	ESTRÉS 6 HORAS	ESTRES 5 DIAS	ESTRÉS 10 DIAS	TOTAL
RATAS WISTAR	12	12	12	12	48

Tabla 13: Animales empleados en los distintos grupos de estudio del papel del estrés sobre marcadores inflamatorios y antiinflamatorios en la mucosa de colon.

1. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS: PÉRDIDA DE PESO.

Todas las ratas empleadas en el estudio fueron pesadas antes de iniciarse el procedimiento e inmediatamente después de su muerte así como en momentos puntuales a lo largo del experimento. Se empleó una balanza de precisión (Sartorius®) con un error de 0,1 gramos. Todas las ratas pesan entre 180 y 250 gramos en el momento de iniciar el experimento. No obstante, para ajustar los resultados de una forma lo más real posible, evitando la variabilidad de pesos que puede existir entre un grupo y otro, expresamos los datos en porcentaje de peso perdido con respecto al grupo control.

2. ANÁLISIS DEL DAÑO MACROSCÓPICO EN MUCOSA DE COLON.

El colon de cada rata en el momento del sacrificio fue valorado según el procedimiento descrito anteriormente. A cada animal se le dio una puntuación, realizándose la media de puntuaciones para cada uno de los grupos.

3. INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES COMO RESPUESTA AL ESTRÉS.

Tras realizar las sesiones de estrés de acuerdo a lo expuesto con anterioridad y antes de realizar los análisis que a continuación mostraremos, se midieron los niveles de corticosterona plasmática en todos los grupos y en aquellos sometidos a tratamiento farmacológico como se describirá ulteriormente. Ello con el objetivo de comprobar la activación del eje HHA en respuesta al estrés.

4. DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA.

La mieloperoxidasa (MPO), aislada por primera vez por Agner en 1941, es la proteína más abundante en los neutrófilos y la única peroxidasa que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido hipocloroso. Es un enzima ampliamente distribuido en el organismo, siendo sus fuentes fundamentales los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos (Bradley et al, 1982). En los neutrófilos se encuentra localizado a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos, constituyendo el 2-5 % de las proteínas totales de los mismos (Márquez et al, 1990). Estructuralmente es una glicoproteína tetramérica constituida por 4 subunidades que forman dos homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad α (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad β (ligera) de aproximadamente 14 kDa. Su actividad es proporcional al número de neutrófilos presentes en el tejido y, por tanto, puede utilizarse como índice de migración leucocitaria e indirectamente como parámetro de inflamación (Junger et al, 1993). Así, se ha demostrado un incremento significativo de su actividad en varios procesos patológicos en relación con un aumento del riesgo de estrés oxidativo, tal y como ocurre en el caso de las enfermedades infecciosas sistémicas o locales, enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal, o en los accidentes isquémicos cerebrales (Komatsu et al, 1992). Por este motivo, se determinó la actividad peroxidasa en las muestras de colon de los animales para cada uno de los grupos.

5. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO NITROSATIVO POR ESTRÉS.

Para determinar el papel que el estrés tiene sobre la inducción de daño nitrosativo, se determinó la expresión de la isoforma inducible (iNOS) en homogenizados de mucosa intestinal mediante western-blot tras la exposición de los animales a inmovilización durante 6 horas, 5 y 10 días.

En estas muestras se midió la actividad de NOS mediante el ensayo de citrulina que al producirse en cantidades equimolares con el NO, es una medida indirecta de su producción (ver Figura 6). Como se comentó anteriormente en la introducción, la isoforma constitutiva es calcio-dependiente mientras que la isoforma inducible presenta

una actividad calcio-independiente. También se determinaron los niveles de corticosterona plasmática.

6. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO POR ESTRÉS.

Para analizar el papel de la inducción de ciclooxigenasa por el estrés se determinó la expresión de la isoforma constitutiva (COX-1) e inducible (COX-2) en homogenizados de mucosa intestinal mediante western-blot tras la exposición de los animales a inmovilización durante 6 horas, 5 y 10 días.

Para objetivar la actividad de COX se realizaron determinaciones de PGE₂ como producto pro-inflamatorio para cada uno de los grupos de estudio. También se determinaron los niveles de corticosterona plasmática.

7. TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF- κ B COMO INDUCTOR DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO PROVOCADA POR ESTRÉS.

Como fue comentado en la introducción, la inducción de iNOS y COX-2 son procesos dependientes de la activación de NF- κ B. Por ello, determinamos en cada grupo, la expresión de p65 (o relA), una de las dos subunidades que translocan al núcleo para unirse a las regiones promotoras, mediante western-blot de extractos de citoplasma y nucleares de células de la mucosa colónica. De esta manera, una disminución de la expresión citoplasmática acompañada de un aumento de la expresión en núcleo serán interpretados como la existencia de activación y translocación de dicho factor (Blondeau et al, 2001).

8. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VIA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS.

Para el análisis de la posible activación de una vía antiinflamatoria por el estrés, nos centramos en la inducción del receptor activador de la producción de peroxisomas PPAR- γ dada la evidencia previa de papel como mediador antiinflamatorio y su expresión predominante en células epiteliales y macrófagos de colon. Por ello, determinamos la expresión de PPAR- γ en homogenizados de mucosa intestinal mediante western-blot tras la exposición de los animales a inmovilización durante 6

horas, 5 y 10 días. Por otro lado, determinamos si uno de sus ligandos endógenos, la PGJ_2 , estaba también aumentada.

9. ALTERACIÓN DE PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS.

Dado que el aumento de la actividad iNOS y otros mediadores parece ser esencial en la existencia de una disfunción de la permeabilidad intestinal y de las uniones intercelulares a otros niveles (Han et al, 2004) y que hay indicios de que el estrés parece implicarse en un aumento de la permeabilidad intestinal paracelular a macromoléculas (Kiliaan et al, 1998; Qiu et al, 1999, Ando et al, 2000), decidimos analizarla para comprobar si estos mediadores la alteraban y como se modificaba según el tiempo de exposición al estrés. Para ello, inmediatamente tras la última sesión de estrés de 6 horas, se instiló por recto una solución de buffer glucosado con Cr^{51} -EDTA, molécula de 384 Da (Perkin Elmer, Boston, Massachussets, USA) a una concentración final de 1.4 μ Ci/ml. Transcurridas 2 horas, se sacrificaron los animales y se extrajeron 10 ml de plasma según el método descrito con anterioridad. De éstos, se recogió 1 ml para su procesamiento en un contador gamma (1470 Gammacounter Wallac Wizard, Perkin Elmer[®], Boston, Massachussets, USA) durante 1 minuto. Los resultados fueron expresados en porcentaje de permeado, considerando el 100% como la diferencia entre la radiactividad total del una alícuota de 1 ml de la solución instilada (1.4 μ Ci) y la de una alícuota de 1 ml de suero salino.

Asimismo y para comprobar que se debía a una alteración de las uniones intercelulares, en unos grupos paralelos se obtuvieron muestras de colon, para su procesamiento y posterior visualización de las mismas en microscopia electrónica. Para ello, se disecó el colon obteniendo muestras de 5x5mm muestras de colon de 5x5 mm que se fijaron en glutaraldehído al 2% según el método descrito anteriormente. Tras 3 horas fueron crioprotegidas mediante la inmersión a 4°C durante una noche en tampón fosfato 0,1M que contenía sacarosa al 30%. A continuación fueron post-fijadas en tetroxido de osmio al 1%, teñidas con acetato de uranio al 1% e incluidas en parafina. Tras su posterior corte con microtomo (Ultracut E Reichert-Jung[®]), las muestras se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con microscopio de transmisión (JEOL mod. JEM-1010-EX) a 80 kV. Para evaluar los cambios en las uniones intercelulares, 2

examinadores independientes analizaron al menos 20 regiones intercelulares por grupo de varias células epiteliales elegidas al azar.

10. ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS.

Igualmente quisimos determinar si el aumento de permeabilidad se acompañaba de fenómenos de translocación bacteriana, ya que hay indicios de ello como se señaló anteriormente (Ando et al, 2000; Söderholm et al, 2002a; Wang y Wu, 2005). Para ello, tras incisión con instrumentos estériles de la piel y peritoneo, se extrajeron asepticamente muestras de ganglios mesentéricos, bazo e hígado de cada uno de los animales en los diferentes grupos. Tras determinar el peso de cada muestra, fueron colocados en tubos de cristal con 1 ml de suero salino estéril para ser homogenizadas con mortero reforzado de Teflón-vidrio. Se realizó la siembra directa de la muestras en las placas de Petri[®] y tras realizar una dilución 1/10 en solución salina. Muestras de cada uno de estos tejidos fueron cultivados aeróbicamente en Agar Columbia para las bacterias gram + y gram -, en Agar MacConkey selectivo para enterobacilos gram - y en Agar Brucella con 5 % sangre de carnero con vitamina K1 (1µg/ml) y hemina (5 µg/ml) para anaerobios. La incubación se realizó a 35-37° C para aerobios durante 24 horas y 35-37°C para anaerobios durante 48 horas en jarra de anaerobiosis con un sobre de GasPak[®] (Beckton Dickinson[®]) que genera la atmósfera de anaerobiosis. Tras ésta, las placas de Petri[®] fueron examinadas y contadas las colonias en unidades formadoras de colonias por mg de tejido (UFC/mg) tras objetivar con tinción de gram, la clase a la que pertenecían. Para su expresión y comparación fueron expresadas en forma de media ± error estándar de la media (eem). Posteriormente se procedió a la identificación de las especies bacterianas. Para los microorganismos aerobios se emplearon pruebas microbiológicas clásicas como la tinción de gram, prueba de oxidasa (Mast Diagnostics[®]), discos antibióticos de optoquina, bacitracina y novobiocina (Mast[®]), coagulasa (Beckton Dickinson[®]), catalasa, sistema de identificación para enterobacterias (Enterotube II, Beckton Dickinson[®]), el sistema API 20 NE (Biomérieux[®]) para los bacilos gram negativos no fermentadores como *acinetobacter* y el API 20 Strep para *enterococcus*. Para los anaerobios se utilizó el sistema de identificación Rapid ID 32 A[®] (Biomérieux).

11. PAPEL DE LA RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA INDUCIDA POR ESTRÉS.

En estudios previos se ha observado que los glucocorticoides alteran los niveles de IgA en el plasma, saliva y secreciones vaginales, de forma que aumentan en el primero y disminuyen en los segundos a expensas de una redistribución de la IgA polimérica (Wira et al, 1990). Dado que la IgA constituye la primera línea de defensa contra virus y bacterias en los epitelios y que el estrés provoca aumento de los niveles de glucocorticoides, se decidió analizar la alteración de sus niveles en la mucosa intestinal de ratas sometidas a estrés para intentar relacionarlo como factor contribuyente con la translocación bacteriana observada en estos grupos. Para ello, se procesaron muestras de mucosa colónica de todos los grupos para medir niveles de IgA.

12. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ₂/PPAR- γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS.

Por último, dado la evidencia del papel antiinflamatorio de PPAR- γ a otros niveles (García-Bueno et al, 2004; García-Bueno et al, 2005), inducimos una mayor activación de éste con sus ligandos para valorar si no se producían los cambios observados en la expresión de mediadores de daño nitrosativo/oxidativo (iNOS y COX-2), niveles de prostaglandina inflamatoria PGE₂ y antiinflamatoria PGJ₂, en la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana y en la respuesta humoral, y por tanto, valorar su posible efecto terapéutico. Para ello, se establecieron 3 grupos de 6 animales: uno de estrés agudo de 6 horas (S6h), otro de estrés de 5 días (S5d) y otro de estrés de 10 días (S10d), administrándose intraperitonealmente al inicio de cada sesión de estrés, un ligando endógeno de PPAR- γ , la 15d-PGJ₂, a dosis de 80 μ g/kg (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) disuelta en DMSO al 10%. Asimismo, administramos de la misma manera un ligando exógeno PPAR- γ , el Maleato de Rosiglitazona, a dosis de 1mg/kg (Alexis, San Diego, California). Como controles para el ensayo con cada uno de estos fármacos, se consideraron los resultados de los experimentos anteriores con animales sin tratar. Asimismo se utilizaron otras 6 ratas a las que se les administro 15d-PGJ₂ y el Maleato de Rosiglitazona sin ser sometidas a estrés para descartar alteraciones por el propio fármaco ajenos al estrés (Ver Figura 13).

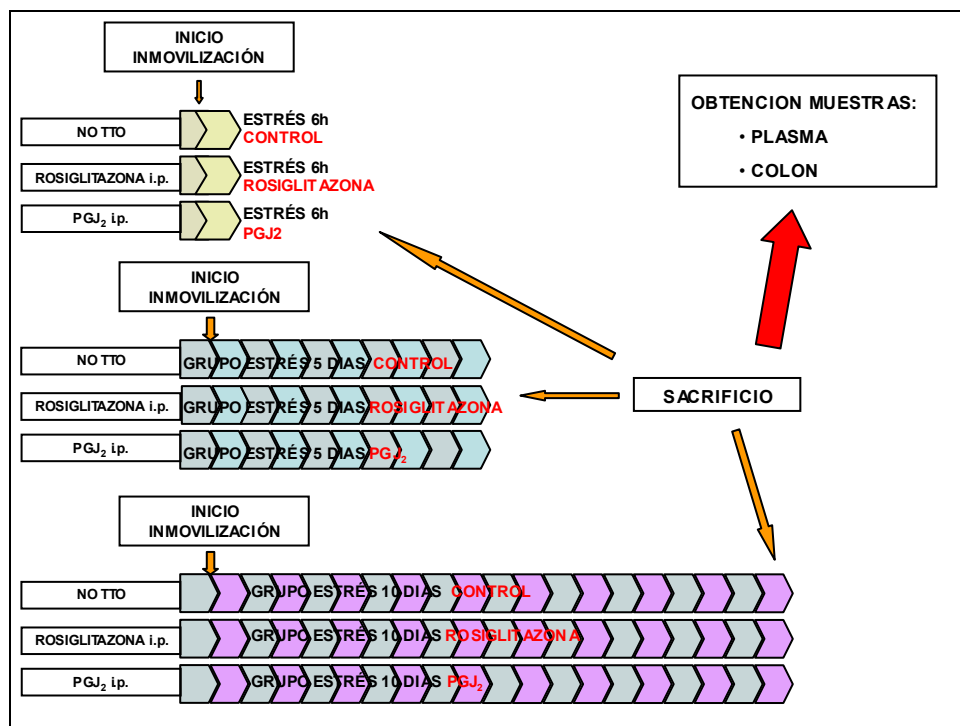


Figura 13: Protocolo experimental terapéutico para evaluar el efecto de la potenciación de la vía antiinflamatoria PPAR- γ en la respuesta desencadenada por estrés.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

En este apartado se detallan todas las determinaciones analíticas realizadas en esta Tesis de cada uno de los experimentos realizados que han sido expuestos en el apartado anterior.

1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA.

Se utilizaron las muestras de colon almacenadas en el congelador de -80°C , manteniéndolas frías durante todo el procedimiento mediante su introducción en hielo seco y aplicamos el método descrito por Krawisz et al en 1984. Las muestras se homogeneizaron con la intención de liberar el enzima sin destruir su actividad; para ello, empleamos un buffer de lisis que contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5% y Nonidet P40[®] al 0,5% (sustancia capaz de romper las membranas celulares), todo ello diluido en buffer fosfato 20 mM ajustado a un pH de 6,0. Utilizamos un Polytron (homogeneizador Heidolph[®]) para homogeneizar mediante tres ciclos

consecutivos de 30 segundos seguidos de congelación a -80°C y posterior descongelación. Tras este proceso, la muestra se centrifugó durante 20 minutos a 12000 g y a 4°C . Los niveles de actividad de MPO se determinaron en el sobrenadante obtenido tras la centrifugación, usando el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato para la reacción enzimática. La actividad del enzima se determina mediante espectrofotometría UV visible. Para ello 0,1 ml de cada muestra se combinan con 2,9 ml de buffer fosfato 20mM que contiene 0,167 mg/ml de cloruro de dianisina y H_2O_2 al 0,0005% a pH 6,0. El cambio de absorbancia medido a 460 nm se determina empleando un espectrofotómetro Beckman[®] DU-7500. La determinación de la concentración de MPO se realizó con una curva patrón previa que emplea peroxidasa de rábano (Sigma P8250-5000U). Cada unidad de actividad de MPO se define como la conversión de 1 μmol de H_2O_2 a agua en un minuto a 40°C , y fue expresada como mU/mg de proteína.

2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNAS iNOS, COX-1, COX-2 Y PPAR- γ POR WESTERN-BLOT.

Las muestras de colon se homogeneizaron a 4°C en 5 volúmenes de un buffer que contiene sacarosa 320 mM, ácido etilen-diamina tetra-acético (EDTA) 1 mM; DL-ditiotreitol (DTT) 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor de tripsina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y Tris 50 mM, todo ello a 20°C y llevado a pH 7 con ácido clorhídrico (HCl). El homogeneizado se centrifugó a 4°C y a 12000 g durante 20 minutos y el sedimento obtenido se desechó. A continuación se cargaron 20 μg de las proteínas presentes en el sobrenadante y se separaron por tamaños mediante electroforesis empleando para ello un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (50mA). Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore[®], Bedford, MA, USA) y tras bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS 1x a pH 7.4) durante 2 horas, se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal específico para iNOS (Santa Cruz[®]; dilución 1:1000), COX-1 (Santa Cruz[®], dilución 1:1000), COX-2 (Santa Cruz[®], dilución 1:1000) y PPAR- γ (Biomol, Plymouth, Pennsylvania, 1:2000), según el experimento realizado. Tras lavado e incubación 2 horas con el anticuerpo secundario específico en cada caso, se revelaron con un ECL[™]-kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Ibérica[®]). Se emplearon marcadores comerciales Bio-Rad[®] para identificar el peso molecular de las bandas.

Los resultados de la medida de las proteínas fueron analizados densitométricamente (TotalLab 1.11 y Phoretix software, Dunamics, Newcastle, Reino Unido) y expresados en un diagrama de barras según la intensidad de banda empleando para ello unidades arbitrarias.

3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS).

La actividad enzimática se determinó tras la homogeneización de las muestras congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando un homogeneizador Polytron (Heidolph[®]) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un buffer que contiene sacarosa 320 Mm, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 100 $\mu\text{g/ml}$, inhibidor de tripsina 10 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$ y Tris 50 mM, todo ello a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y llevado a pH 7 con HCl. El homogeneizado obtenido fue centrifugado durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 12000 g y se utilizó únicamente el sobrenadante postmitocondrial. Para determinar la actividad de la NOS se midió la conversión de L-[U- ^{14}C]-arginina en L-[U- ^{14}C]-citrulina (basándonos en que la NOS genera NO y citrulina en cantidades equimoleculares), tal y como describieron previamente Salter et al en 1991 y modificaron posteriormente Rees et al en 1995, añadiendo al medio de incubación enzimática los siguientes cofactores: NADPH (100 μM); BH_4 (3 μM); FAD (3 μM) y FMN (3 μM) (Salter et al, 1991; Rees et al, 1995). El exceso de arginina marcada radiactivamente se separó de la citrulina mediante el empleo de 1 ml de una resina intercambiadora catiónica Dowex[®]-500W-8/ H_2O . Una vez aislada, la ^{14}C -citrulina se midió en un contador de centelleo líquido (Beckman LS-6500; Beckman España, Madrid) mezclada en proporción 1:6 (500 ml: 3 ml) con líquido de centelleo (BCS. Amersham).

La actividad de la NOS Ca^{2+} -dependiente se determinó calculando la diferencia existente entre la L-[U- ^{14}C]-citrulina producida por las muestras control y 1 L-[U- ^{14}C]-citrulina producida por las muestras que contenían EGTA 1 mM. La actividad de la NOS Ca^{2+} -independiente fue calculada de la diferencia entre la L-[U- ^{14}C]-citrulina producida por las muestras con ácido etilen glicol-bis(aminoetil eter) N,N,N'-tetraacético (EGTA) y la L-[U- ^{14}C]-citrulina de las muestras que contenían L-NMMA (inhibidor no selectivo de la NOS) 1 mM. La actividad NOS se expresó en picomoles producidos por minuto y por miligramo de proteína de la muestra (pm/min/mg). La

determinación de la actividad enzimática en el sobrenadante postmitocondrial hace que la mayor parte de la actividad Ca^{2+} - dependiente corresponda a la isoforma neuronal.

La cuantificación de la proteína se determinó empleando el método descrito por Hill y Straka en 1988 como se describirá al final de este apartado.

4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PGE_2 Y PGJ_2 EN HOMOGENEIZADOS DE COLON.

Se homogeneizaron las muestras de colon congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ empleando un homogeneizador Polytron (Heidolph[®]) a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en un buffer que contiene sacarosa 320 Mm, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 100 $\mu\text{g/ml}$, inhibidor de tripsina 10 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$ y Tris 50 mM, todo ello a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y llevado a pH 7.4 con HCl. El homogeneizado obtenido fue centrifugado durante 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y 12000 g y se utilizó únicamente 160 μl de sobrenadante que se diluyó con 0.1M de buffer fosfato acidificado a pH 4. A continuación, utilizando kits comerciales de enzimoimmunoanálisis para medir la PGE_2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA) se determinaron sus niveles. Para purificar las muestras se insertaron en columnas activadas ODS-sílice de fase reversa (Sep-Pak C18, Waters). Las columnas se lavan con 5 ml de agua destilada y 5 ml de hexano, y la PG es eluída dos veces con 5 ml de etilacetato con 1% de metanol. La fracción etilacetato se evapora y se resuspende en 500 μl de buffer. Tras las incubaciones pertinentes, las concentraciones se determinaron por espectrofotometría (Molecular Devices[®]) según las instrucciones del fabricante.

Para la determinación de PGJ_2 se utilizó otro kit comercial de enzimoimmunoanálisis (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA), cuya diferencia radica en que para la extracción se eluyó tres veces con 5 ml etilacetato con 1% metanol. La fracción etilacetato se evapora y se resuspende en 200 μl de PBS con Tween 20 al 0.05%. Tras las incubaciones pertinentes, las concentraciones se determinaron por espectrofotometría (Molecular Devices[®]) según las instrucciones del fabricante.

5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P65 EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS Y NUCLEARES DE CÉLULAS EPITELIALES DE COLON.

En primer lugar, se prepararon los extractos citosólicos y nucleares de las células de la mucosa colónica según una modificación del método descrito por Schreiber et al

en 1989 (Schreiber et al, 1989). Para ello, las muestras de colon fueron homogeneizadas directamente tras su extracción con 300 μ l de un buffer que contiene 10mM de ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) a pH 7.9, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCL 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, aprotinina 0.1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, N ^{α} -p-tosil-L-lisina-clorometil cetona (TLCK) 1 μ g/ml, NaF 5 mM, NaVO₄ 1 mM, sucrosa 0.5M y Na₂MoO₄ 10 mM. Posteriormente, tras dejarlas reposar 10 minutos a 4°C, se añadió Nonidet P40[®] hasta una concentración al 0,5%, sustancia que es capaz de romper las membranas celulares. Tras agitación enérgica en vórtex durante 15 segundos de las muestras, se sometieron a centrifugación a 8000 g durante 5 minutos. El sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática, fue recogido y almacenado a -80°C. El sedimento tras resuspenderse con 100 μ l de buffer enriquecido con glicerol al 20% y KCl 0.4M, se sometió a agitación suave durante 30 minutos a 4 °C. Los extractos nucleares fueron obtenidos tras centrifugación a 13000 g durante 5 minutos y almacenados en alíquotas (con cuidado de no coger parte del sedimento de DNA) a -80°C. Todos los pasos fueron realizados a 4°C.

Una vez obtenidos éstos, se procedió a determinar la expresión de la subunidad p65 en los extractos citosólicos y nucleares para cada uno de los grupos de acuerdo al siguiente protocolo: Se cargaron 20 μ g de las muestras y las proteínas se separaron por tamaños mediante electroforesis empleando para ello un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (50mA). Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore[®], Bedford, MA, USA) y tras bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS 1x a pH 7.4) durante 2 horas, se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario policlonal específico para p65 (Santa Cruz[®]; dilución 1:1000). Posteriormente tras lavado e incubación 2 horas con el anticuerpo secundario específico, se revelaron con un ECL[™]-kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Ibérica[®]).

Los resultados de la medida de las proteínas fueron analizados densitométricamente (TotalLab 1.11 y Phoretix software, Dunamics, Newcastle, Reino Unido) y expresados en un diagrama de barras según la intensidad de banda empleando para ello unidades arbitrarias.

6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINA A EN HOMOGENEIZADOS DE COLON.

Las muestras de colon se homogeneizaron a 4°C en 5 volúmenes de un buffer que contiene sacarosa 320 mM, ácido etilen-diamina tetra-acético (EDTA) 1 mM; DL-ditioneitol (DTT) 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µg/ml, inhibidor de tripsina 10 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml y Tris 50 mM, todo ello a 20°C y llevado a pH 7 con ácido clorhídrico (HCl). El homogeneizado se centrifugó a 4°C y a 12000 g durante 20 minutos y el sedimento obtenido se desechó. A continuación, empleando un kit comercial de enzimoanálisis para medir la IgA (Bethyl Laboratories[®], Montgomery, USA) se determinaron sus niveles. La inmunoglobulina monoclonal anti-rata purificada (1 µl anticuerpo en 100 µl de buffer HCO₃-H₂CO₃ 0.05M a pH 9.6) fue ligado a cada pocillo mediante incubación a durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los pocillos se lavaron tres veces con una solución de lavado (Tris 50 mM, NaCl 0.14M y Tween 20 al 0.05% pH 8) y se bloquearon durante una 30 minutos con BSA 0.1% (Calbiochem, La Jolla, CA) en buffer (Tris 50 mM, NaCl 0,14M) a pH 8. Las concentraciones estándar de IgA de rata para la construcción de la curva patrón y las muestras se añadieron a los pocillos por duplicado. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario a cada pocillo (102 µl) y se incubó durante 60 minutos. Posteriormente se determinaron sus concentraciones por espectrofotometría a 450 nm (Molecular Devices[®]) según las instrucciones del fabricante.

7. MEDICIÓN DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA.

Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C antes de ser analizadas empleando un kit de determinación de corticosterona por RIA con corticosterona de rata marcada con ¹³¹I (DPC, Los Angeles, CA, USA). Para medir la radioactividad se empleó un contador gamma (1470 Gammacounter Wallac Wizard, Perkin Elmer[®], Boston, Massachussets, USA).

8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.

Para las determinaciones anteriores que se ajustaron a miligramo de proteína se procedió a realizar la cuantificación de la proteína empleando el método descrito por Hill y Straka en 1988. Se emplea como reactivo una mezcla de ácido bicinconínico y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4% p/v (49/1). Las proteínas son capaces de reducir el Cobre II a Cobre I de forma concentración dependiente. Posteriormente, y tras reaccionar con el ácido bicinconínico, son capaces de formar un complejo púrpura que es detectado mediante espectrofotometría, presentando un máximo de absorción a 562 nm.

El método se basa en la incubación a 60°C durante 30 minutos de la mezcla de 1 ml del reactivo con 50 μl de la muestra problema. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y se lee a 562 nm empleando un lector de placas (Molecular Devices®). La concentración de proteínas se determina comparándola con una curva patrón elaborada a partir de una solución de albúmina sérica bovina de 2 mg/ml.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los valores fueron expresados como media \pm error estándar de la media (eem). El análisis estadístico se realizó aplicando el test ANOVA de una vía para comparaciones entre varios grupos y el test no paramétrico de U de Mann-Whitney debido a la ausencia de ajuste a la distribución normal en el caso de los datos de actividad enzimática y al pequeño tamaño muestral. Un valor de $p < 0.05$ nos permitió rechazar la hipótesis nula de igualdad entre los índices comparados, y por tanto considerar las diferencias obtenidas como estadísticamente significativas.

El análisis estadístico ha sido llevado a cabo de forma informatizada con la versión 10.0 del programa SPSS®.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE PARÁMETROS CLÍNICOS: PÉRDIDA DE PESO.

El peso inicial de los animales de estudio fue $214,5 \pm 3,6$ gramos (g). En el grupo de ratas sometidas a estrés durante 6 horas (S6h) se observó una mínima diferencia no significativa con una pérdida media de 2,5 gramos (total $212 \pm 1,8$ g) con una pérdida porcentual de -1,16% respecto al grupo control (C). A los 5 días (S5d) se comprobó una pérdida media de 11,66 gramos ($202,84 \pm 3,2$ g; -5,35 vs C, $p < 0,05$). En el grupo de los animales sometidos a estrés durante 10 días (S10d) se objetivó un aumento de 0,66 gramos ($215,16 \pm 2,4$ g; +0,2 vs c, $p > 0,05$). Tras el estudio estadístico, la diferencia llegó a ser significativa en el grupo de estrés de 5 días respecto a los otros grupos. A los 10 días se observa una clara tendencia a la recuperación de peso inicial (Figura 14).

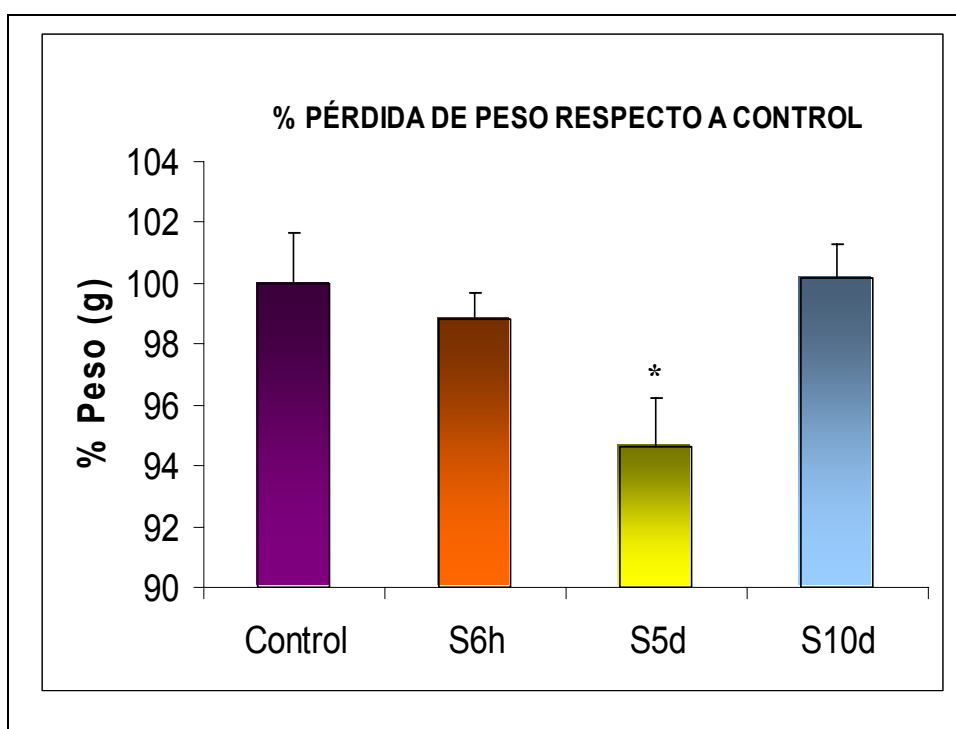


Figura 14: Determinación del peso. Datos expresados en % de pérdida de peso y en gramos con respecto al grupo control ($214,5 \pm 3,6$ g). n=12 ratas por grupo.

* $p < 0,05$ S5d vs resto grupos.

2. ANÁLISIS DE DAÑO MACROSCÓPICO EN MUCOSA DE COLON.

En animales control, el examen macroscópico mostró una mucosa normal sin ningún tipo de lesión. Tampoco se observaron cambios en las muestras de animales sometidos a sesiones de estrés de 6 horas, 5 y 10 días (Tabla 14).

GRUPO DE ESTUDIO	DAÑO MUCOSO (puntuación media \pm DE)
GRUPO CONTROL	0,1 \pm 0,1
GRUPO ESTRÉS 6 horas	0,3 \pm 0,2
GRUPO ESTRÉS 5 días	0,3 \pm 0,2
GRUPO ESTRÉS 10 días	0,2 \pm 0,1

Tabla 14: Valores de daño macroscópico expresados como media \pm EEM a partir de clasificación modificada de Bell et al, 1995. n=12 ratas por grupo. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

3. LIBERACIÓN DE CORTICOSTERONA TRAS ESTRÉS.

Los niveles de corticosterona plasmática en el grupo control fueron $67,208 \pm 8,77$ ng/ml a las 15 horas. En todos los grupos de estrés se observó un incremento significativo de los niveles de corticosterona respecto al control (Figura 15). La administración de fármacos (PGJ₂ y Rosiglitazona) tampoco modificó los niveles de corticosterona respecto al grupo estresado no tratado (Figura 15). Este aumento fue más acusado en el grupo S6h, tanto en el control ($734,23 \pm 77,12$ ng/ml), como en el que se inyectó PGJ₂ ($789,07 \pm 68,71$ ng/ml) o el tratado con Rosiglitazona ($779,88 \pm 80,22$ ng/ml). El aumento de los niveles de corticosterona fue algo menor en el grupo de estrés de 5 días, con valores de $575,46 \pm 91,61$ ng/ml para el grupo control, $587,47 \pm 69,104$ ng/ml para el de PGJ₂ y $559,11 \pm 90,9$ ng/ml para el de Rosiglitazona. Igualmente se observó el mismo patrón, aunque con valores menores, en el caso del grupo de estrés de 10 días con niveles de $334,108 \pm 28,08$ ng/ml para el control, $380,107 \pm 65,86$ ng/ml para el tratado con PGJ₂ y $342,39 \pm 70,32$ ng/ml para el de Rosiglitazona.

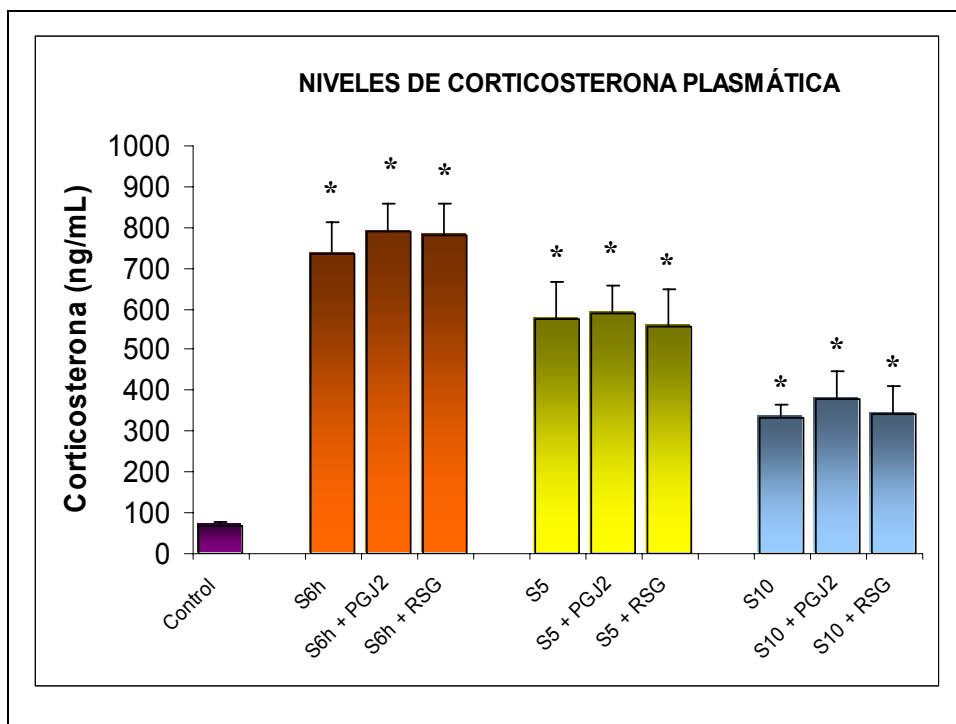


Figura 15: Niveles de corticosterona plasmática. Datos expresados mU/mg de proteína \pm eem. n=12 ratas por grupo. * p<0.05 vs control.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA.

Los niveles de actividad MPO en el grupo control fueron $0,00052 \pm 0,00017$ mU/mg proteína. El estrés incrementó los niveles de MPO en el grupo S6h a $67,128 \pm 7,905$ mU/mg proteína y en el grupo S5d a $41,86 \pm 4,183$ mU/mg proteína (Figura 16). Asimismo se comprueba una progresiva disminución de la misma en el estrés al décimo día, aproximándose cada vez más a los valores del grupo control ($17,797 \pm 1,553$ mU/mg proteína) -Figura 16-.

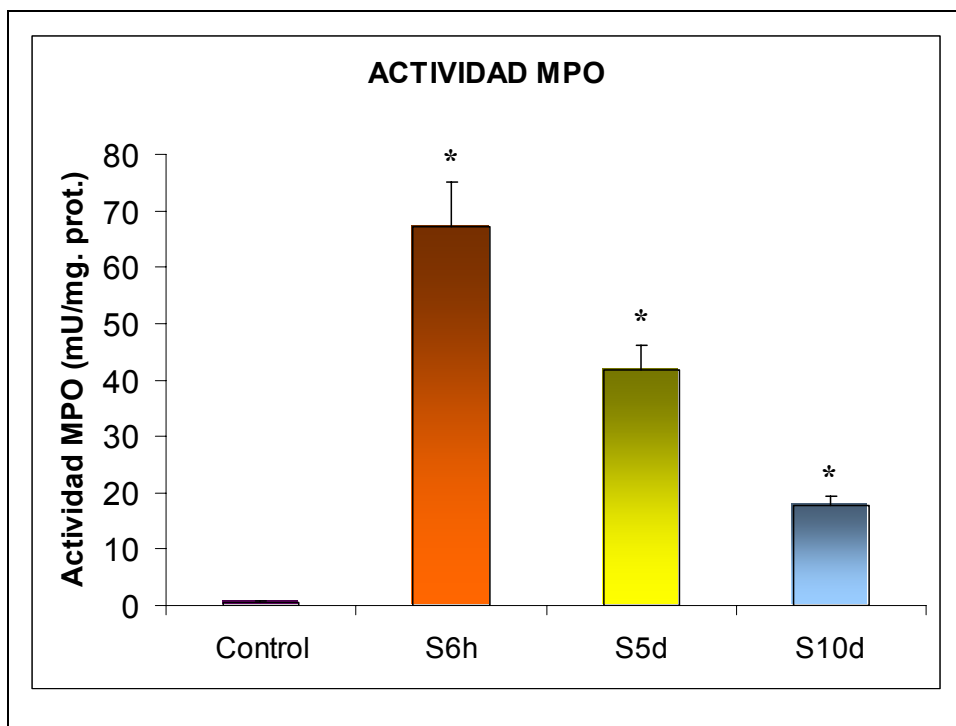


Figura 16: Actividad MPO. Datos expresados mU/mg de proteína \pm EEM. n=12 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

5. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO NITROSATIVO POR ESTRÉS.

5.1. Expresión de iNOS inducida por estrés en mucosa de colon.

La expresión de la proteína iNOS (130 kDa) mediante western-blot y el análisis densitométrico de la misma reveló una banda muy débil en el grupo control. En cambio, en las muestras de mucosa colónica obtenidas de los animales estresados durante 6 horas y 5 días se observa una clara inducción respecto al control. El grupo S10d presenta una disminución en la intensidad de banda acercándose a la del control (Figura 17).

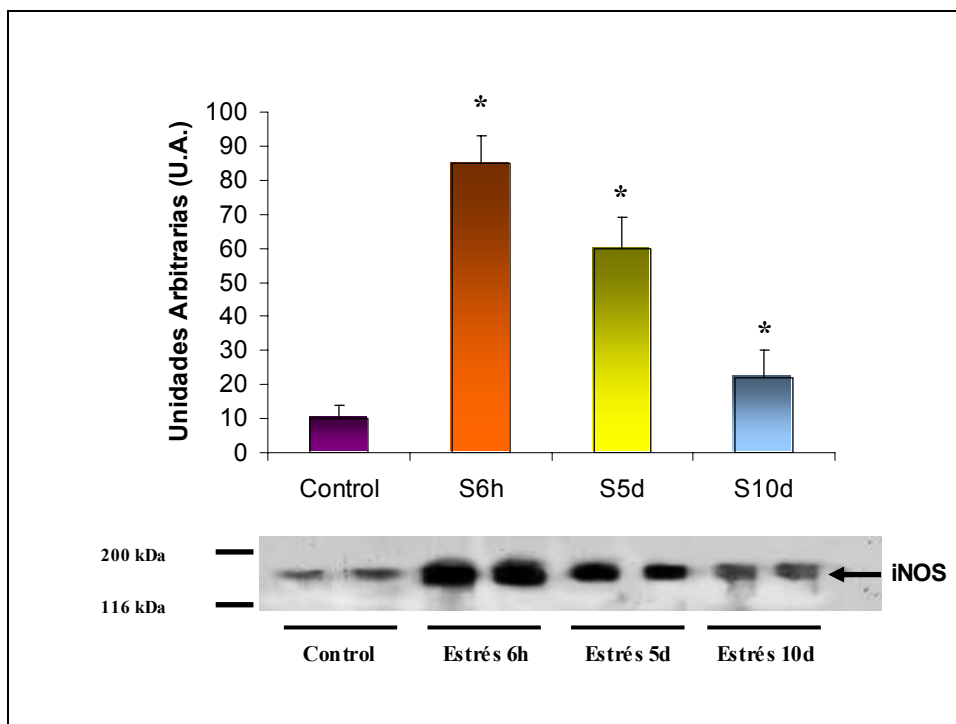


Figura 17: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para iNOS. Muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. $n=12$ ratas por grupo. * $p<0.05$ vs control.

5.2. Análisis de la actividad de NOS en mucosa de colon de ratas sometidas a estrés.

En análisis de la actividad NOS a través del ensayo de citrulina demostró en el grupo de animales control unos niveles de actividad NOS calcio-independiente (iNOS) prácticamente indetectable de $0,5 \pm 0,1$ pmol/min por mg de proteína. Tras el estrés de 6 horas se observó un incremento significativo de la actividad a niveles de $12,34 \pm 3,6$ pmol/min y mg de proteína y algo menor en el grupo S5d ($7,22 \pm 3$ pmol/min por mg de proteína). En tanto que en el grupo S10d regresan a valores de $0,8 \pm 0,2$ pmol/min y mg de proteína, muy semejantes a los del grupo control (Figura 18).

En lo referente a la actividad calcio dependiente, se observa una tendencia a la disminución de sus niveles en el grupo S6h y S5d sin alcanzar la significación estadística, con una recuperación a los 10 días de estrés (Figura 19).

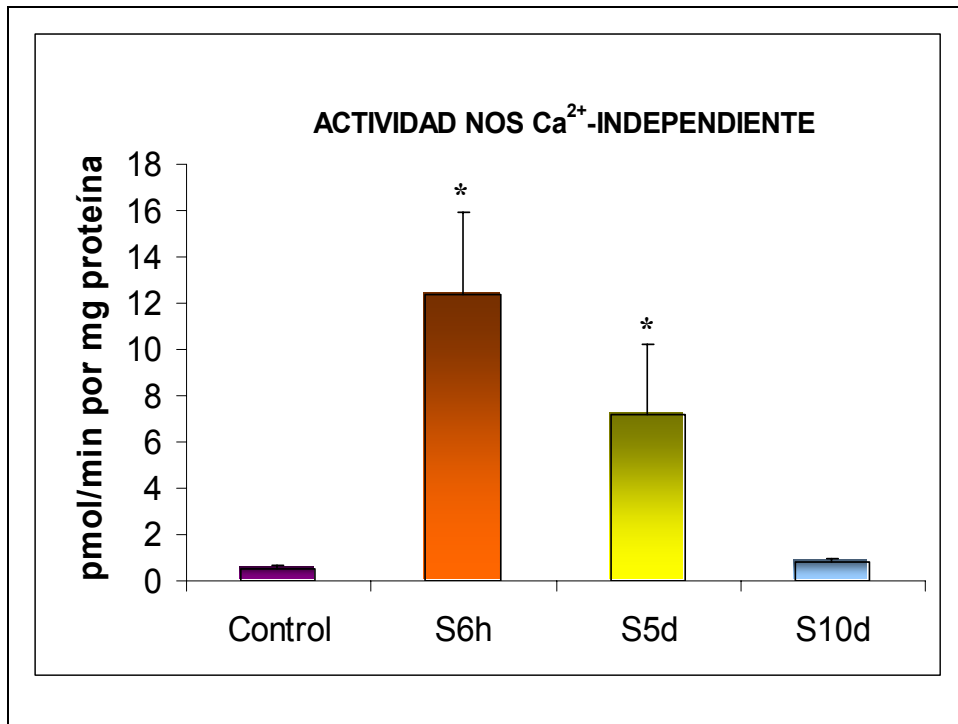


Figura 18: Actividad NOS Ca²⁺-independiente en muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en pmol/min por mg proteína ± EEM. n=12 ratas por grupo. *p<0.05 vs control.

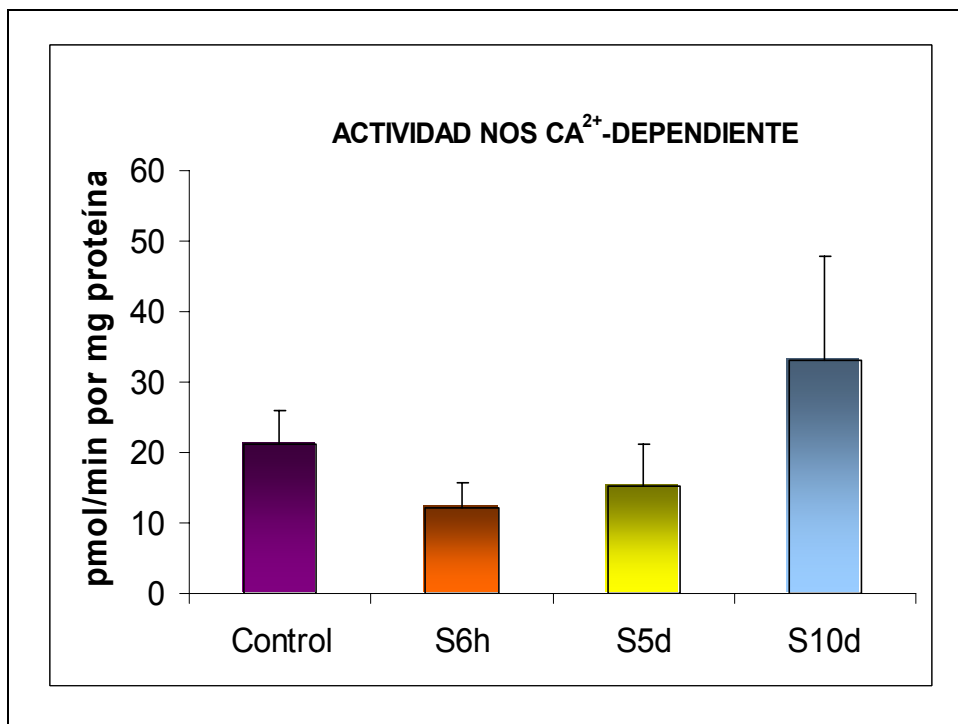


Figura 19: Actividad NOS Ca²⁺-dependiente en muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en pmol/min por mg proteína ± EEM. n=12 ratas por grupo.

6. IMPLICACIÓN DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO POR ESTRÉS.

6.1. Expresión de COX-1 y COX-2 inducida por estrés en mucosa de colon.

Al analizar mediante western-blot las muestras de mucosa colónica, se observa un incremento de intensidad en la banda de 72 kDa correspondiente a la proteína COX-2 en los grupos S6h, S5d y S10d respecto al control. La densidad es máxima en S6h para ir disminuyendo progresivamente en S5d y S10d (Figura 20).

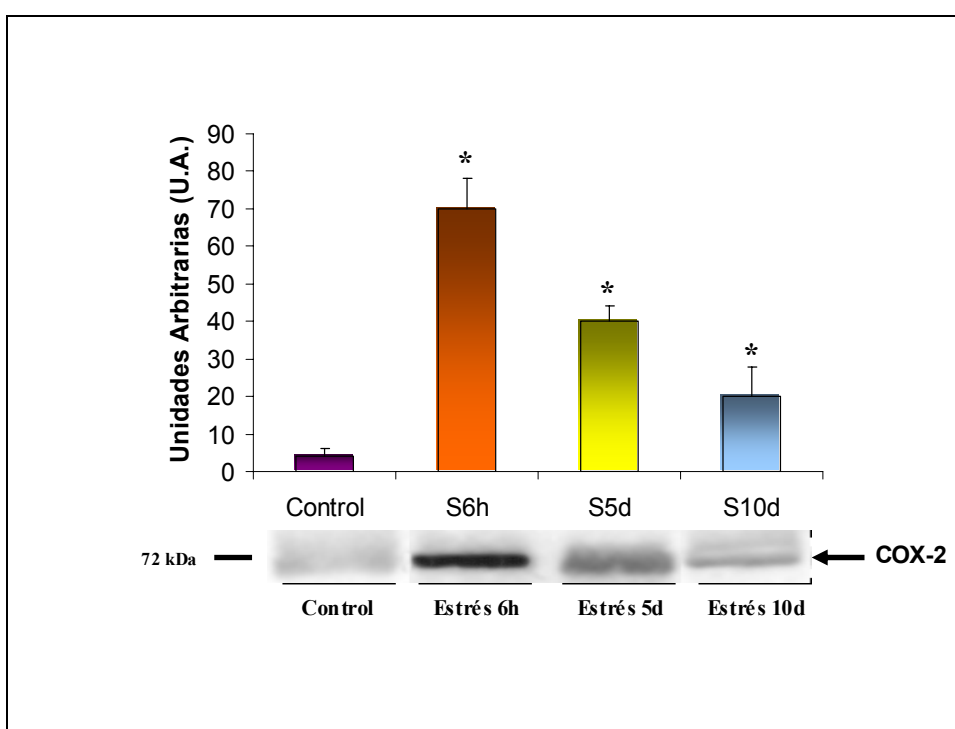


Figura 20: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para COX-2. Muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. n=12 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

Respecto a la isoforma constitutiva de la cicloxigenasa (COX-1), no se observaron diferencias significativas ni tendencia alguna en los grupos de animales estresados respecto al control (Figura 21).

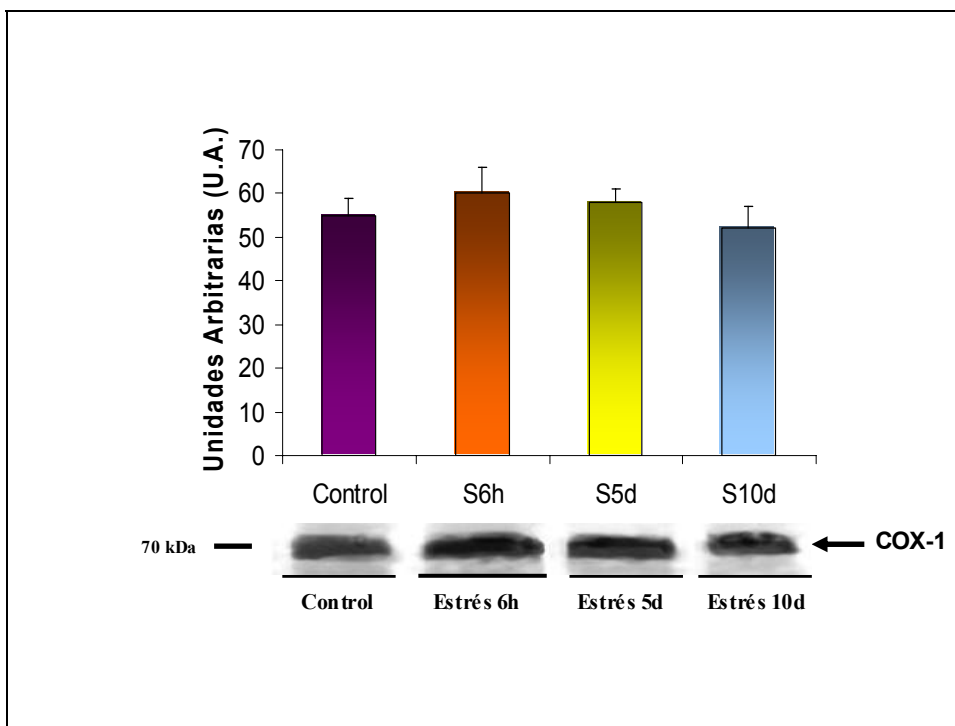


Figura 21: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para COX-1. Muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. n=12 ratas por grupo.

6.2. Producción de prostaglandina PGE₂ inducida por estrés en mucosa de colon.

Los niveles de PGE₂ como expresión de la activación de la vía inflamatoria en el grupo control fueron de $102,32 \pm 18,45$ pg/mg proteína. El estrés por inmovilización durante 6 horas provocó un aumento estadísticamente significativo de los valores de PGE₂ a $1131,75 \pm 10,667$ pg/mg proteína. En S5d se observa igualmente un aumento, aunque menor, de los niveles de PGE₂ a $523,93 \pm 107,26$ pg/mg proteína. En S10d se aprecia un descenso respecto al anterior, aunque todavía en niveles mayores a los del control ($367,46 \pm 36,97$ pg/mg proteína) - Figura 22-.

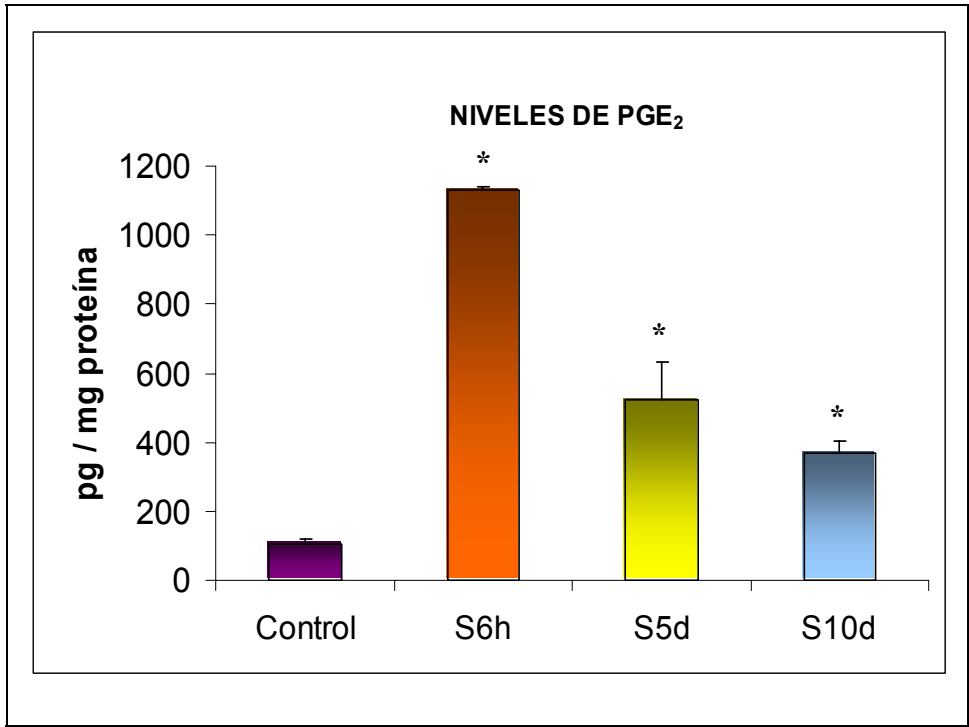
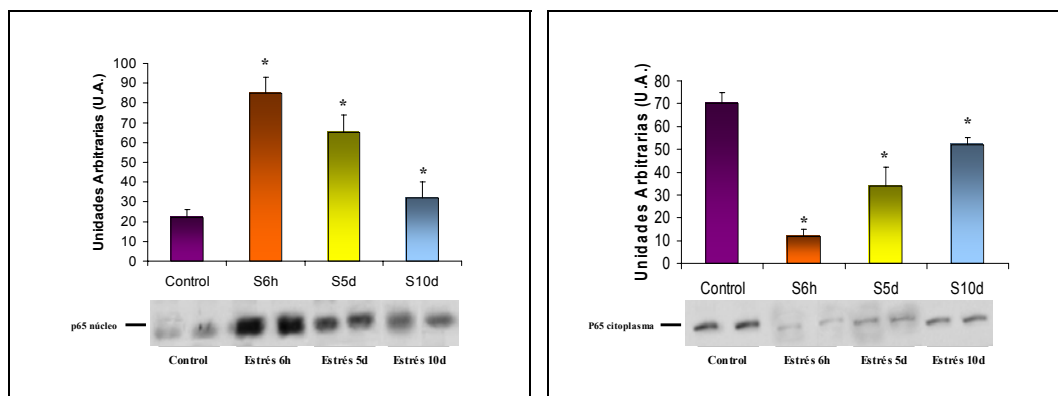


Figura 22: Niveles de PGE₂ expresadas en pg / mg de proteína ± EEM de muestras de colon para cada uno de los grupos. n=12 ratas por grupo. * p<0.05 vs control.

7. PAPEL DEL NF-κB EN MUCOSA COLÓNICA TRAS ESTRÉS.

La translocación de NF-κB fue determinada por la expresión mediante western-blot de la subunidad p65 en extractos citoplasmáticos y nucleares de células epiteliales del colon de ratas sometidas a estrés. Ello permite comprobar la existencia de translocación en S6h, S5d y S10d; siendo máxima en el primero y experimentando una progresiva disminución en los restantes grupos (Figuras 23 y 24).



Figuras 23 y 24: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para p65 en extractos de núcleo y citoplasma de células colónicas para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. n=12 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

8. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VÍA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS.

8.1. Producción de prostaglandina PGJ_2 inducida por estrés en mucosa de colon.

Los niveles basales de PGJ_2 en el grupo control fueron de $41,53 \pm 13,88$ pg por mg de proteína. El grupo S6h presentó unos niveles de $139,1 \pm 20,53$ pg por mg de proteína y el S5d de $108,27 \pm 8,22$ pg por mg de proteína. En S10d los valores fueron algo menores ($87,3 \pm 9,5$ pg por mg de proteína), aunque significativamente mayores que los del control (Figura 25).

8.2. Expresión de PPAR- γ inducida por estrés en mucosa de colon.

El estudio de expresión de PPAR- γ mediante western-blot correspondiente a la banda de 52 kDa reveló un incremento acusado en S6h, S5d y S10d respecto al control y una imagen paralela a la de producción de PGJ_2 , máxima en S6h y una disminución progresiva en los subsiguientes grupos (Figura 26).

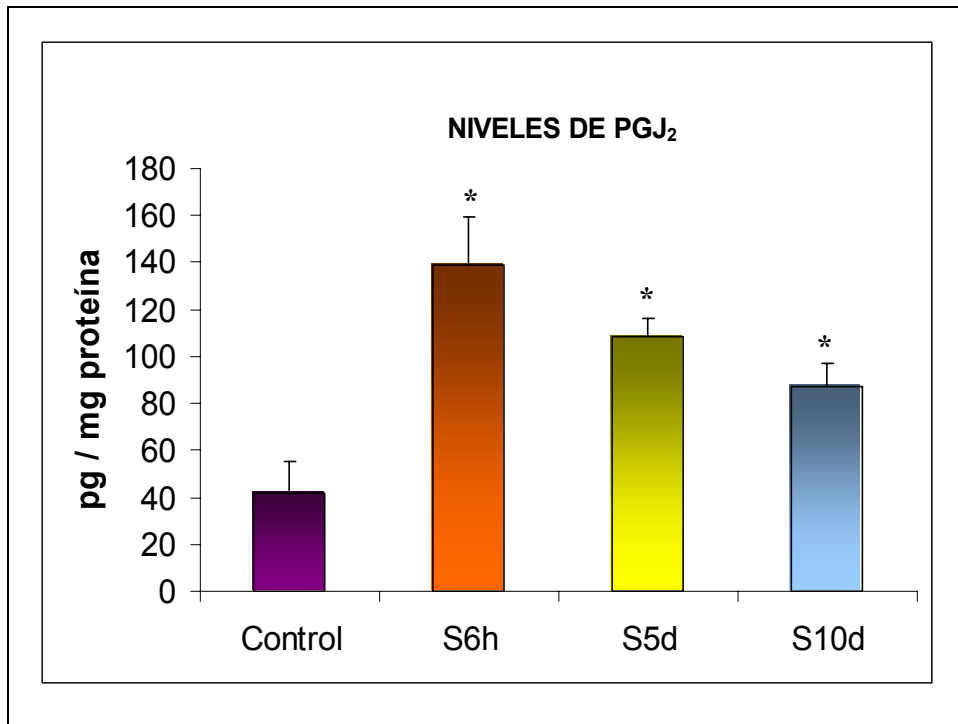


Figura 25: Niveles de PGJ₂ expresadas en pg / mg de proteína ± EEM de muestras de colon para cada uno de los grupos. n=12 ratas por grupo. * p<0.05 vs control.

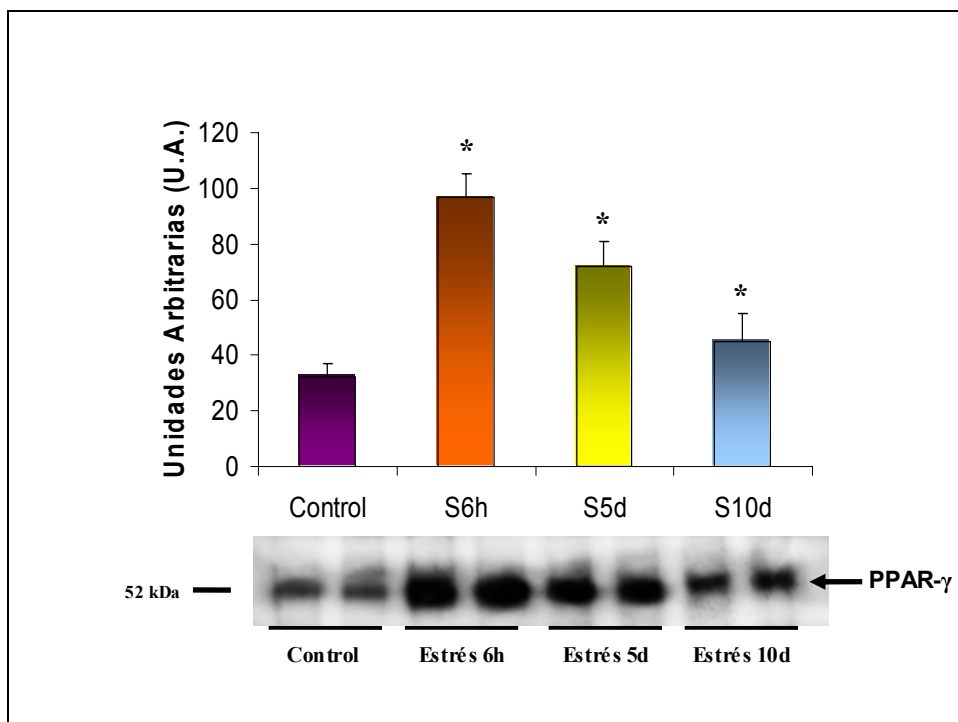


Figura 26: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para PPAR-γ. Muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) ± EEM. n=12 ratas por grupo. * p<0.05 vs control.

9. ALTERACIÓN DE PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS.

9.1. Estudio de permeabilidad paracelular a macromoléculas.

El estudio de permeabilidad paracelular a macromoléculas mediante la instilación rectal de Cr^{51} -EDTA reveló un incremento significativo en los grupos de animales estresados respecto al control ($0,0206 \pm 0,0012$ % permeado). Ese aumento fue máximo en S6h ($0,4586 \pm 0,0178$ % permeado), con reducción progresiva en S5d ($0,0206 \pm 0,0012$ % permeado) y S10d ($0,1133 \pm 0,028$ % permeado); todo ello acorde con la evolución temporal de los diversos mediadores de inflamación anteriormente descritos (Figura 27).

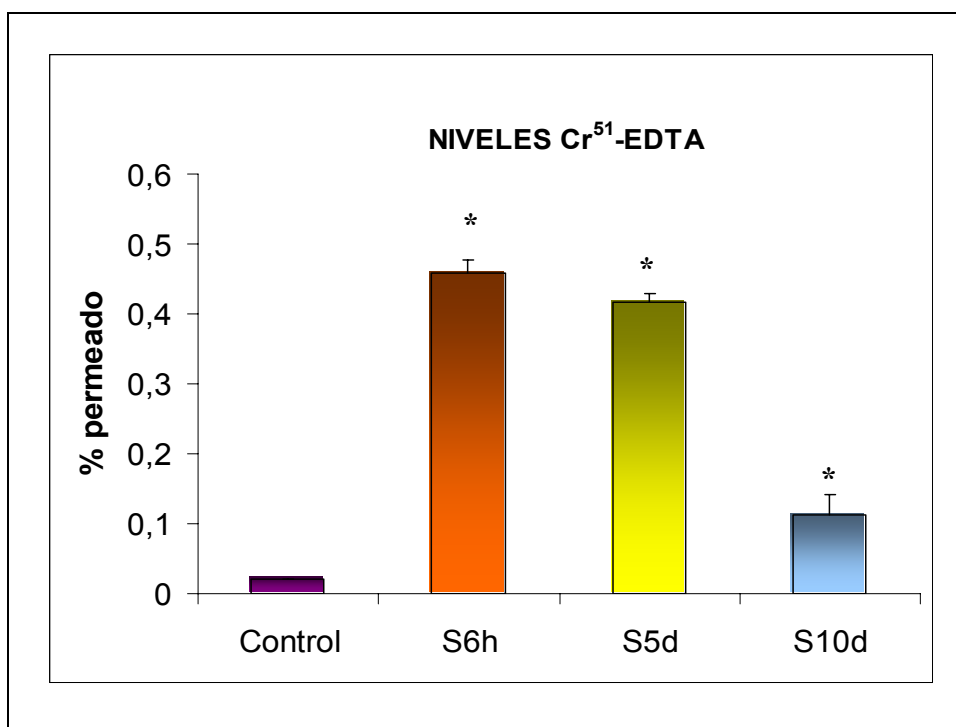
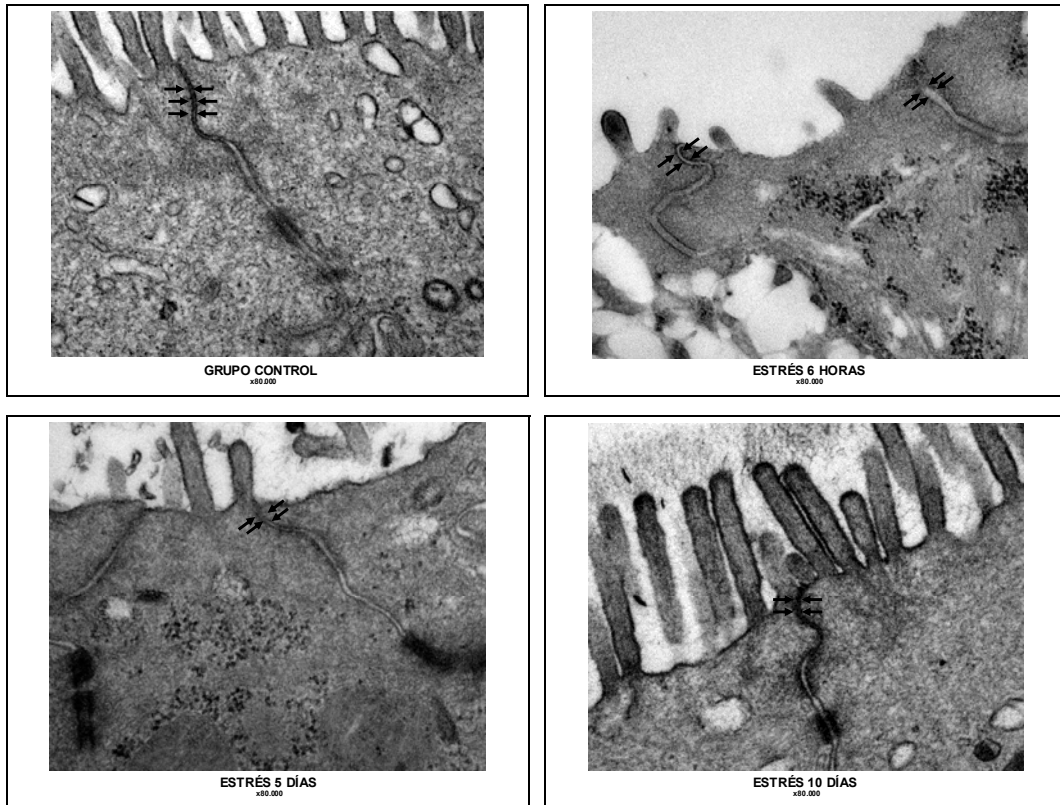


Figura 27: Permeabilidad intestinal de Cr^{51} -EDTA. Expresado en % de permeado \pm EEM de cada uno de los grupos. n=12 ratas por grupo. * $p < 0,05$ vs control.

9.2. Estudio ultramicroscópico de las uniones intercelulares de las células epiteliales.

El estudio mediante microscopía electrónica de las uniones intercelulares (“tight-junctions”) reveló una apertura de las mismas en células epiteliales

procedentes de los grupos S6h y algo menor en S5d, mientras que existe una clara tendencia a la recuperación en el grupo de estrés de 10 días (Figuras 28-31).



Figuras 28-31: Imágenes de la ultraestructura de las células epiteliales del colon de ratas de los distintos grupos donde se aprecia la mayor o menor laxitud de las uniones intercelulares (Aumento x 80.000).

10. TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS.

El análisis microbiológico de las muestras de ganglios mesentéricos, bazo e hígado en cada uno de los grupos demostró la existencia de translocación bacteriana de acuerdo a la siguiente relación:

- En ganglios mesentéricos se observó una marcada translocación en el grupo S6h. En concreto, se identificaron especialmente bacterias aerobias Gram positivas ($139.378,42 \pm 111.278,77$ ufc/g tejido), seguidas de aerobias Gram negativas ($56.396,97 \pm 13.291,47$ ufc/g tejido) y anaerobios ($32.178,94 \pm 12.639,17$ ufc/g tejido). A los 5 días de estrés se observó menor translocación y

sólo de anaerobios ($4.323,65 \pm 2.069,26$ ufc/g tejido) seguidos de Gram positivos ($1.650,93 \pm 521,48$ ufc/g tejido). No se observó translocación ni en el grupo control ni en S10d (Figura 32).

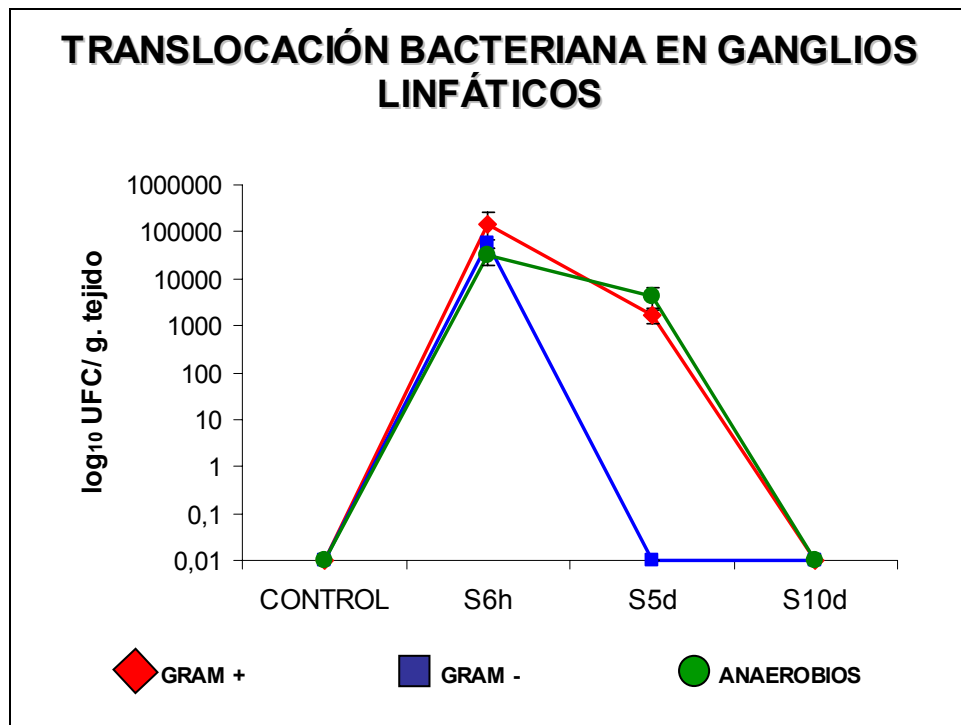


Figura 32: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de ganglios mesentéricos de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=12 ratas por grupo.

- o En bazo se objetivó una translocación menor que en la anterior tanto en el grupo S6h como en S5d, sin encontrarse tampoco translocación en el grupo control ni S10d. En el primero (S6h), se detectaron sobre todo anaerobios ($12.512,08 \pm 9.981,62$ ufc/g tejido) seguidos de Gram negativos ($4.253,26 \pm 1.768,77$ ufc/g tejido); sin embargo no se identificaron Gram positivos. En el segundo (S5d), se objetivaron en menor cantidad anaerobios ($6.065,85 \pm 3.032,93$ ufc/g tejido) seguidos, en este caso, de Gram positivos ($694,74 \pm 475,52$ ufc/g tejido), sin que se detectaran Gram negativos (Figura 33).

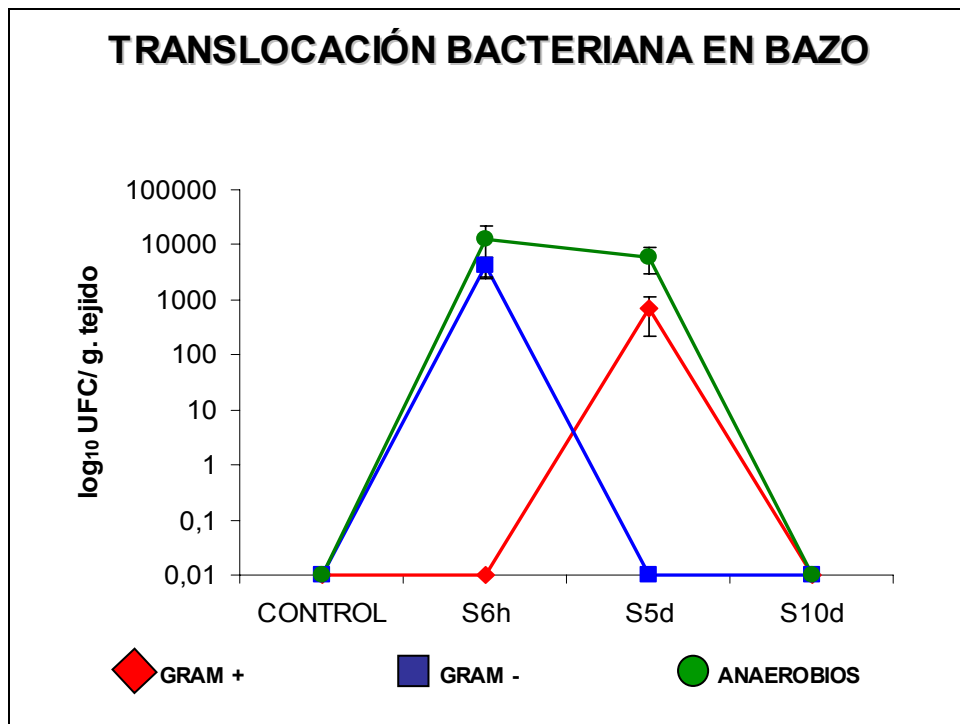


Figura 33: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de bazo de cada grupo de estudio. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=12 ratas por grupo.

- o En el hígado se observó la misma tendencia, con translocación bacteriana fundamentalmente en S6h seguido de S5d y sin que se identificasen bacterias en los grupos control y S10d. En el primero (S6h) se detectó la presencia de anaerobios ($12.424,04 \pm 6.905,17$ ufc/g tejido) seguidos de bacterias aerobias Gram positivas ($1.384,63 \pm 582,56$ ufc/g tejido). En el segundo (S5d) se objetivó la misma observación en menor proporción con anaerobios ($3.646,73 \pm 1396,69$ ufc/g tejido) seguidos de las aerobias Gram positivas ($579,29 \pm 167,28$ ufc/g tejido). En ambos casos no se detectó translocación de Gram negativas (Figura 34).

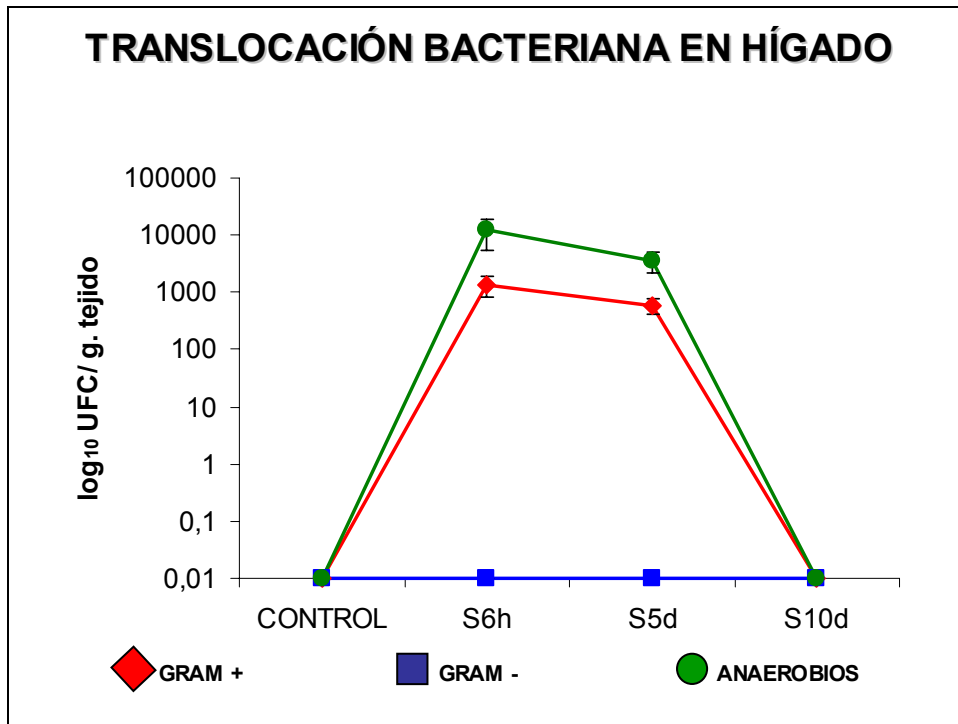


Figura 34: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de hígado de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=12 ratas por grupo.

La relación de las especies bacterianas identificadas a partir de los cultivos de muestras procedentes de ganglios mesentéricos, bazo e hígado para los grupos de ratas estresadas en los que existía translocación (S6h y S5d), se resumen en las tablas 15 y 16 que se describen a continuación.

S6h	GANGLIOS MESENTÉRICOS		BAZO		HÍGADO	
	GRAM +	<i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	29.211,71			S. COAGULASA NEG
<i>BACILLUS</i> sp		35.9712,2				
<i>ENTEROBACTER</i>		37.593,98	<i>ENTEROBACTER</i>	3963,41		
GRAM -	<i>ALCALÍGENES</i>	75.187,96	<i>ALCALÍGENES</i>	7926,82		
			<i>ESCHERICHIA COLI</i>	869,56		
	<i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i>	21.153,85	<i>PEPTOESTEREPTOCOCCUS</i> sp	4458,97	<i>PEPTOESTEREPTOCOCCUS</i> sp	27.910,69
ANAEROBIOS	<i>LACTOBACILLUS</i> sp	61.097,26	<i>LACTOBACILLUS</i> sp	11.464,97	<i>LACTOBACILLUS</i> sp	7974,48
	<i>CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM</i>	14.285,71	<i>BACTEROIDES FRAGILIS</i>	2833,81	<i>BACTEROIDES FRAGILIS</i>	1386,96

Tabla 15: Especies bacterianas detectadas en los cultivos de muestras de ganglios mesentéricos, bazo e hígado de animales sometidos a estrés de 6 horas expresadas en ufc por g de tejido.

S5d	GANGLIOS MESENTÉRICOS		BAZO		HÍGADO	
	GRAM +	S. COAGULASA NEG	1650,93	S. COAGULASA NEG	1277,14	S. COAGULASA NEG
			<i>ENTEROCOCCUS</i> sp	112,35		
GRAM -						
ANAEROBIOS	<i>BACTEROIDES UREOLYTICUS</i>	9090,9	<i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i>	3466,204	<i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i>	1883,895
					<i>PEPTOESTEREPTOCOCCUS</i> sp	7727,97
	<i>LACTOBACILLUS</i> sp	1940,03	<i>LACTOBACILLUS</i>	1733,102	<i>LACTOBACILLUS</i>	3091,19

Tabla 16: Especies bacterianas detectadas en los cultivos de muestras de ganglios mesentéricos, bazo e hígado de animales sometidos a estrés de 5 días expresadas en ufc por g de tejido.

11. RESPUESTA HUMORAL EN MUCOSA DE COLON DE ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS.

Los niveles de IgA secretada en la mucosa de colon de animales procedentes del grupo control fue de 5.264 ± 0.477 ng por mg de proteína. En el grupo S6h los niveles fueron significativamente menores a los del grupo control (2.991 ± 0.452 ng por mg de

proteína). En el grupo S5d en cambio fueron de 4.345 ± 0.625 ng por mg de proteína y en S10d de 4.803 ± 0.887 ng por mg de proteína, muy semejantes a los del grupo control (Figura 35).

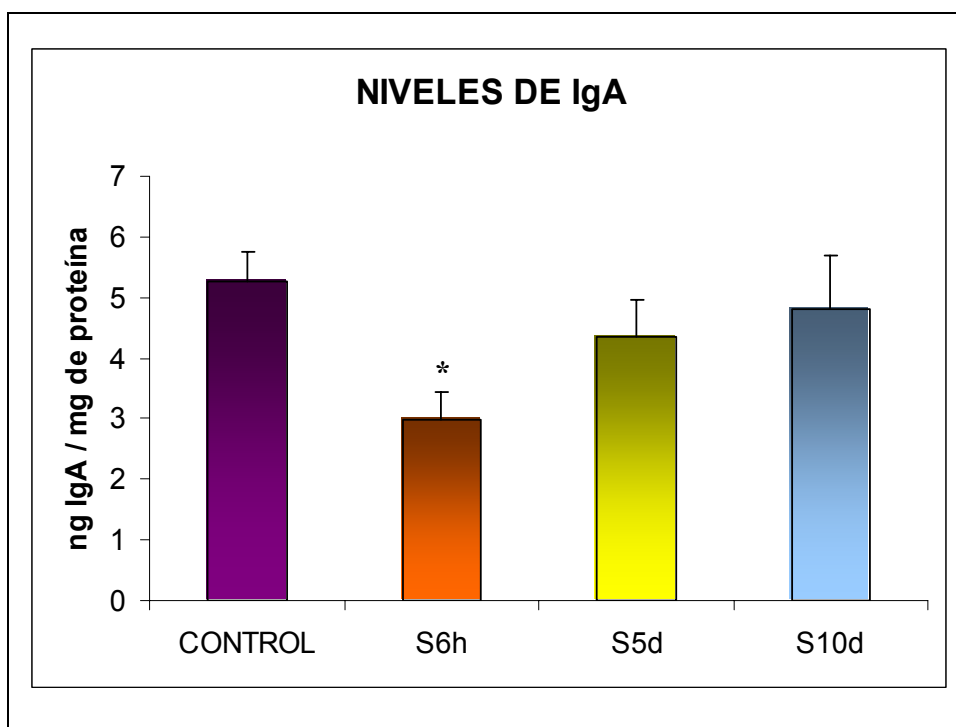


Figura 35: Niveles de IgA expresadas en ng / mg de proteína \pm EEM de muestras de colon para cada uno de los grupos. n=12 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control.

12. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA $PGJ_2/PPAR-\gamma$ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS.

El estudio de los parámetros anteriormente reseñados en los grupos sometidos al mismo protocolo pero previamente tratados con Maleato de Rosiglitazona (1 mg/kg) y PGJ_2 (80 μ g/kg) reveló una normalización de las alteraciones acontecidas por efecto del estrés:

- **La pérdida de peso** observada en el grupo de estrés de 5 días no se detecta en ambos grupos con pérdidas de -1.12% para el grupo tratado con Rosiglitazona y -1,54% en el grupo al que se administró PGJ_2 respecto al inicio del protocolo.

- **La determinación de MPO** en los grupos tratados pero no estresados con PGJ₂ ($0,00405 \pm 0,00014$ mU/mg proteína) y Rosiglitazona ($0,000597 \pm 0,00017$) no demostró diferencias significativas entre ellos ni respecto al grupo no tratado. En S6h se observó una disminución significativa de los niveles de actividad MPO tanto en el grupo tratado con PGJ₂ ($10,597 \pm 1,83$ mU/mg proteína) como en el tratado con Rosiglitazona ($12,083 \pm 4,15$ mU/mg proteína) respecto a su control ($67,128 \pm 7,905$ mU/mg proteína) -Figura 36-. En S5d se aprecia el mismo fenómeno, con niveles en el grupo tratado con PGJ₂ de $12,156 \pm 2,012$ mU/mg proteína y de $13,959 \pm 3,957$ mU/mg proteína en el de Rosiglitazona en relación a su correspondiente control ($41,86 \pm 4,5$ mU/mg proteína) -Figura 36-. Igualmente se produce en S10d una reducción significativa tanto en los animales a los que se administró PGJ₂ ($10,01 \pm 2,608$ mU/mg proteína) como en los que se hizo con Rosiglitazona ($7,261 \pm 2,027$ mU/mg proteína) respecto a su control ($17,797 \pm 1,83$ mU/mg proteína) -Figura 36-.

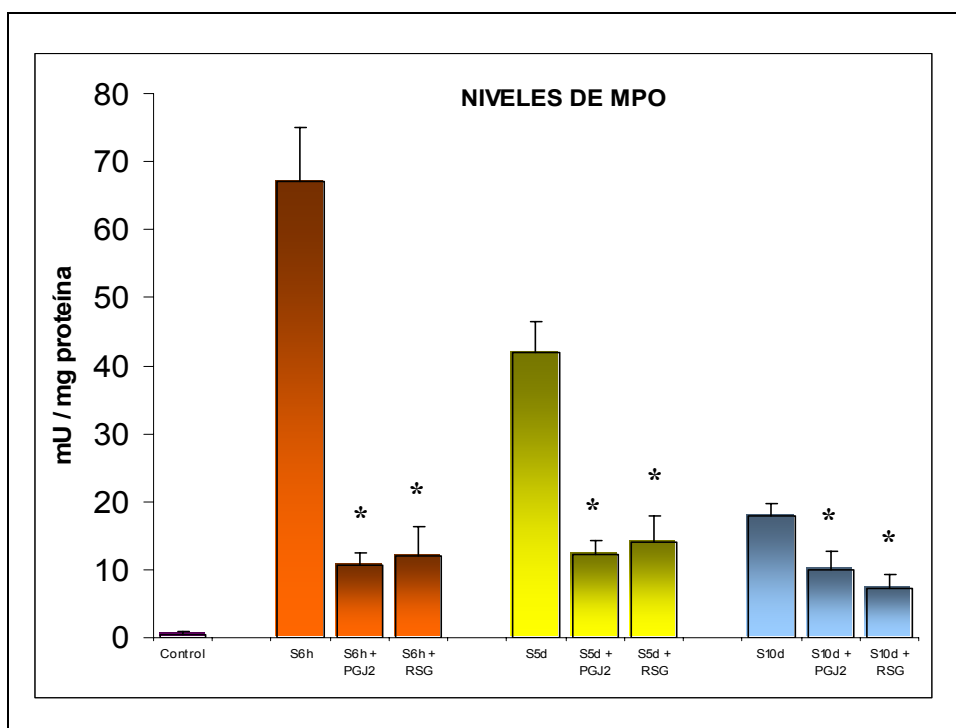


Figura 36: Niveles de actividad MPO expresados en mU / mg de proteína \pm EEM de muestras de colon para cada grupo. n=6 ratas por grupo de tratamiento. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

- La **expresión de banda de iNOS** determinada por western-blot mostró una clara disminución de la inducción de mediadores de daño nitrosativo tanto en los animales tratados con PGJ₂ como con Rosiglitazona en los grupos S6h, S5d y S10d, acercándose a niveles de expresión de banda según el análisis densitométrico semejantes a los del grupo control (Figura 37).
Tampoco se observaron diferencias en los grupos no estresados y tratados con PGJ₂ y Rosiglitazona (Figura 37).

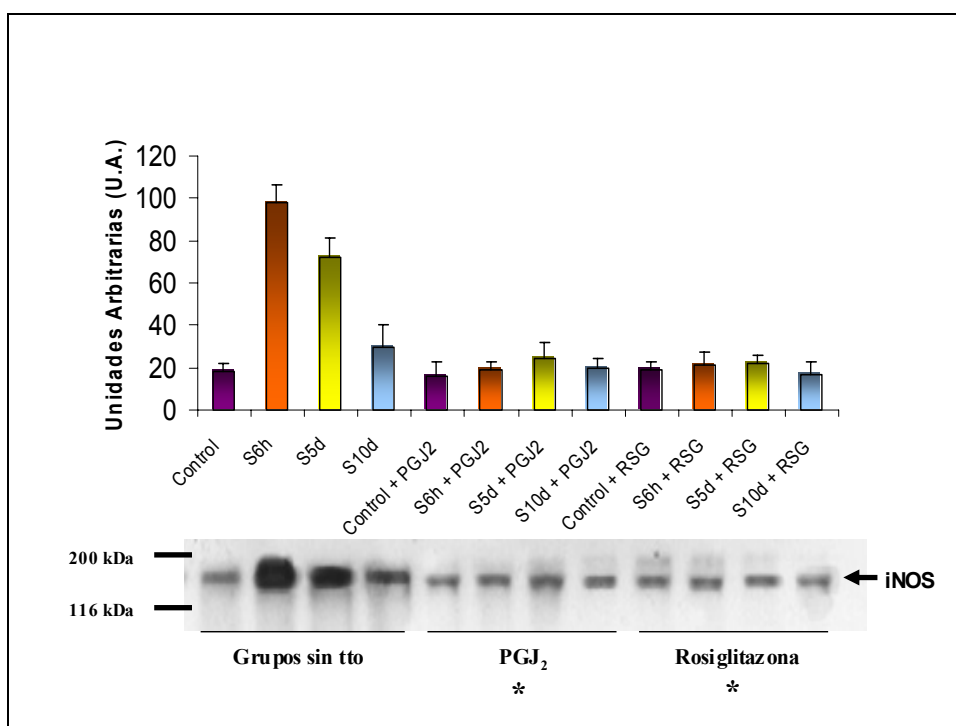


Figura 37: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para iNOS. Muestras de colon para cada uno de los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) ± EEM. n=6 ratas por grupo. * p<0.05 vs control respectivo.

- La **expresión de banda de COX-2** observada en el western-blot demostró un aumento significativo de dicha proteína en todos los animales de ambos grupos de tratamiento y todos los protocolos de estrés en relación a su respectivo control. Asimismo se comprueba como tanto la PGJ₂ como la Rosiglitazona inducen en todos los grupos un incremento de expresión de COX-2 en los animales no inmovilizados (Figura 38).

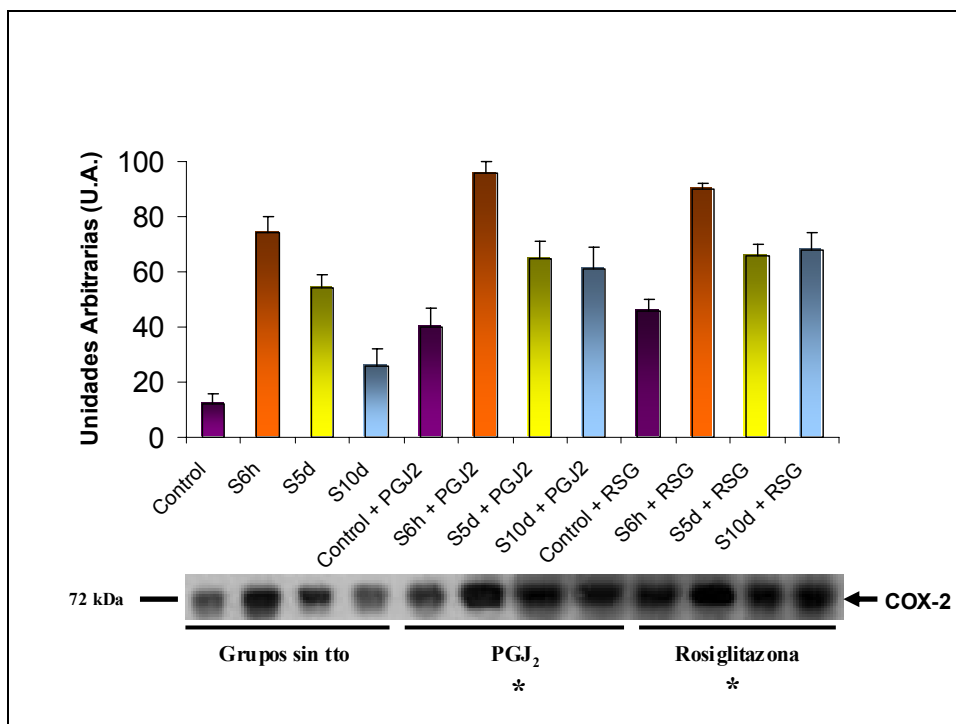


Figura 38: Western-Blot y análisis densitométrico de la banda positiva para COX-2. Muestras de colon para cada grupo. Datos expresados en unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

- o La **producción de prostaglandina inflamatoria PGE₂** en los grupos no estresados tratados PGJ₂ ($115,98 \pm 22,65$ pg/mg proteína) y con Rosiglitazona ($123,89 \pm 31,45$ pg/mg proteína) no fue distinta de la del grupo control no inmovilizado ($104,32$ PGJ₂ $\pm 18,45$ pg/mg proteína).

En S6h se apreció una reducción significativa de su síntesis respecto a su grupo control ($1131,75 \pm 10,667$ pg/mg proteína), con niveles de $406,72 \pm 97,7$ pg/mg proteína para el tratado con PGJ₂ y de $405,64 \pm 94,17$ pg/mg proteína para el que se administró Rosiglitazona (Figura 39).

En S5d se observó igualmente una disminución de los niveles de PGE₂ respecto al control ($523,93 \pm 107,26$ pg/mg proteína), tanto en el grupo tratado con PGJ₂ ($290,802 \pm 40,21$ pg/mg proteína) como en el de Rosiglitazona ($292,23 \pm 21,14$ pg/mg proteína) –Figura 39-.

En cambio, en S10d no se objetiva ninguna reducción significativa en los animales tratados tanto con PGJ₂ ($356,99 \pm 21,14$ pg/mg proteína) ni con Rosiglitazona ($356,12 \pm 5$ pg/mg proteína) respecto a su control ($367,46 \pm 36,97$ pg/mg proteína) –Figura 39-.

En ningún caso se demostraron diferencias entre el grupo al que se administró Rosiglitazona y el de PGJ₂ en cada uno de los grupos de estrés.

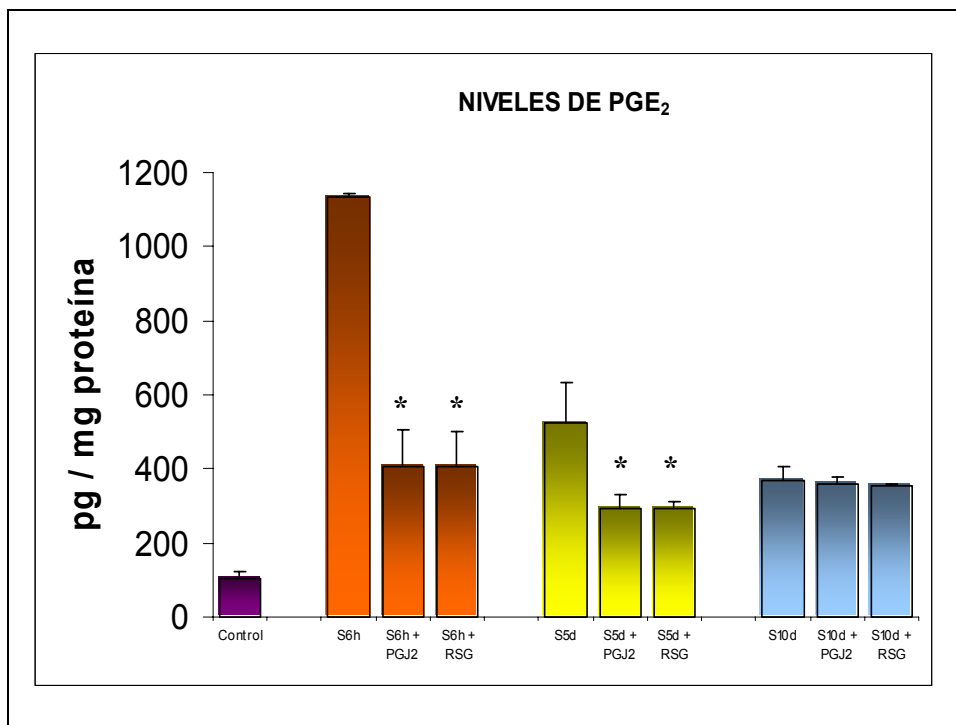


Figura 39: Niveles de PGE₂ expresadas en pg / mg de proteína ± EEM en muestras de colon para cada grupo. n=6 ratas por grupo de tratamiento. * p<0.05 vs control respectivo.

- **Los niveles de prostaglandina antiinflamatoria PGJ₂** en los grupos no estresados tratados exógenamente con PGJ₂ fueron de 107,45 ± 12,33 pg/mg proteína y con Rosiglitazona de 109,67 ± 17,58 pg/mg proteína, significativamente más altos a los del grupo control no inmovilizado (41,53 ± 13,88 pg/mg proteína).

En S6h se observaron unos niveles mayores tanto en el grupo tratado exógenamente con PGJ₂ (185,64 ± 14,4 pg/mg proteína) como en de Rosiglitazona (223,42 ± 26,3 pg/mg proteína) respecto a su control (139,1 ± 20,53 pg/mg proteína) –Figura 40-.

En S5d se objetivaron unos valores de PGJ₂ de 108,27 ± 8,22 pg/mg proteína en el grupo control, 128,48 ± 6,35 pg/mg proteína en el tratado con PGJ₂ y 158,18 ± 22,01 pg/mg proteína en el de Rosiglitazona (Figura 40).

En S10d comprobamos igualmente un aumento significativo de los niveles de ésta en los animales a los que se les administró PGJ₂ exógena ($165,01 \pm 30,56$ pg/mg proteína) y en los de Rosiglitazona ($181,82 \pm 5$ pg/mg proteína), respecto a su control ($87,3 \pm 9,5$ pg/mg proteína) –Figura 40-.

No se han observado diferencias significativas entre ambos grupos de tratamientos para ninguno de protocolos de estrés estudiados.

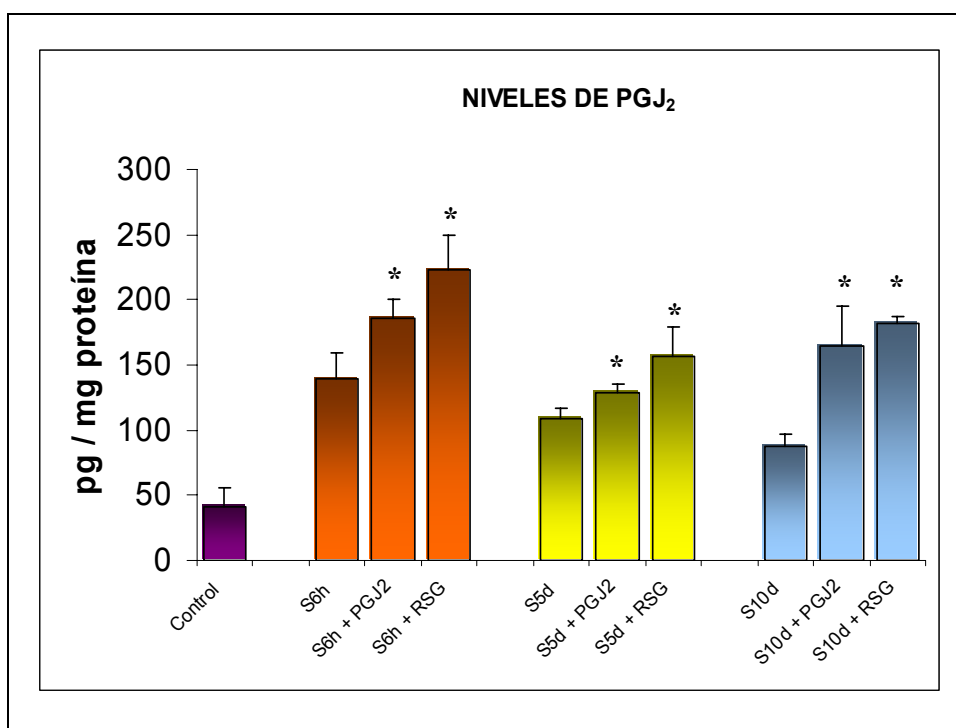


Figura 40: Niveles de PGJ₂ expresadas en pg / mg de proteína \pm EEM de muestras de colon para cada grupo. n=6 ratas por grupo de tratamiento. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

- El estudio de **permeabilidad paracelular a macromoléculas** en S6h demostró una disminución significativa tanto en el grupo al que se administró PGJ₂ ($0,031 \pm 0,00107$ % permeado) como en el de Rosiglitazona ($0,033 \pm 0,0015$ % permeado) respecto a su control no tratado ($0,4586 \pm 0,0178$ % permeado). El mismo comportamiento se observa en el grupo S5d con un porcentaje de permeado en el grupo al que se administró PGJ₂ de $0,038 \pm 0,0033$ % y de $0,039 \pm 0,006$ % en el de Rosiglitazona, valores claramente menores que los de su respectivo control ($0,416 \pm 0,013$ % permeado). En S10d se observa una reducción

significativa de los grupos tratados respecto a su control ($0,1133 \pm 0,028$ % permeado), con valores de $0,0316 \pm 0,0006$ % en el grupo de PGI_2 y de $0,0342 \pm 0,0009$ % en el que se les administró Rosiglitazona (Figura 41).

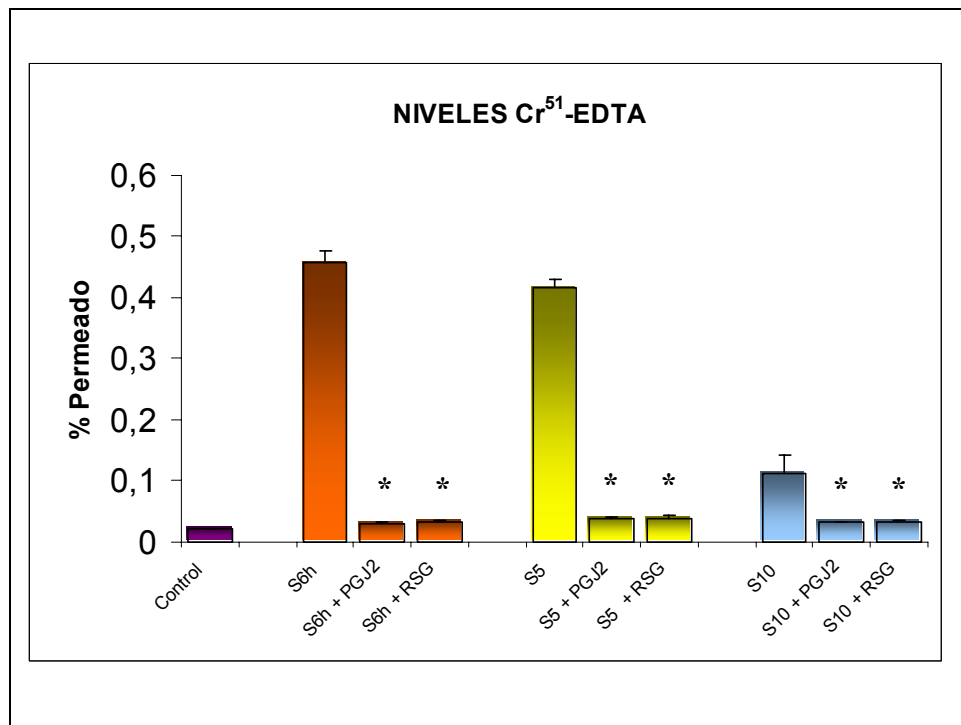


Figura 41: Determinación de permeabilidad intestinal a Cr^{51} -EDTA. Expresado en porcentaje de permeado \pm EEM de muestras de colon para grupo. $n=6$ ratas por grupo. * $p<0,05$ vs respectivo control.

- **La translocación bacteriana** se estudió en los grupos de estrés S6h y S5d, en los que como ya fue mencionado con anterioridad, se había observado dicho fenómeno.

Grupo S6h.

En el grupo S6h no se detectaron colonias de Gram positivos, Gram negativos ni anaerobios en los ganglios mesentéricos tanto en el grupo tratado con PGI_2 como el de Rosiglitazona (Figura 42).

En bazo no se observaron Gram positivos ni negativos en ambos grupos de tratamiento. En el grupo al que se administró PGI_2 tampoco se objetivaron anaerobios. Sin embargo en el tratado con Rosiglitazona sí,

con cifras de $1.041,66 \pm 203,8$ ufc/g tejido, menores a las de su respectivo grupo control ($12.512,08 \pm 9.981,62$ ufc/g tejido) -Figura 43-.

En hígado se observó una tendencia similar, de tal manera que en el grupo de animales tratados con PGJ₂ no se observaron Gram positivos ni negativos. Se objetivó una clara disminución en la cifra de anaerobios ($431,03 \pm 124,57$ ufc/g tejido) respecto a su control ($12.424,04 \pm 6.905,17$ ufc/g tejido). El grupo de animales a los que se administró Rosiglitazona no mostró Gram negativos ni anaerobios, aunque si Gram positivos ($557,61 \pm 151,76$ ufc/g tejido), valores menores aunque no significativos que su respectivo grupo control ($1384,63 \pm 582,56$ ufc/g tejido) –Figura 44-.

Las especies bacterianas identificadas a partir de los cultivos fueron básicamente las mismas que en los controles, de tal forma que se identificaron como Gram positivos *enterococcus* sp y estafilococo coagulasa negativo y como anaerobios, *bacteroides ureolyticus* y *propionibacterium acnes*.

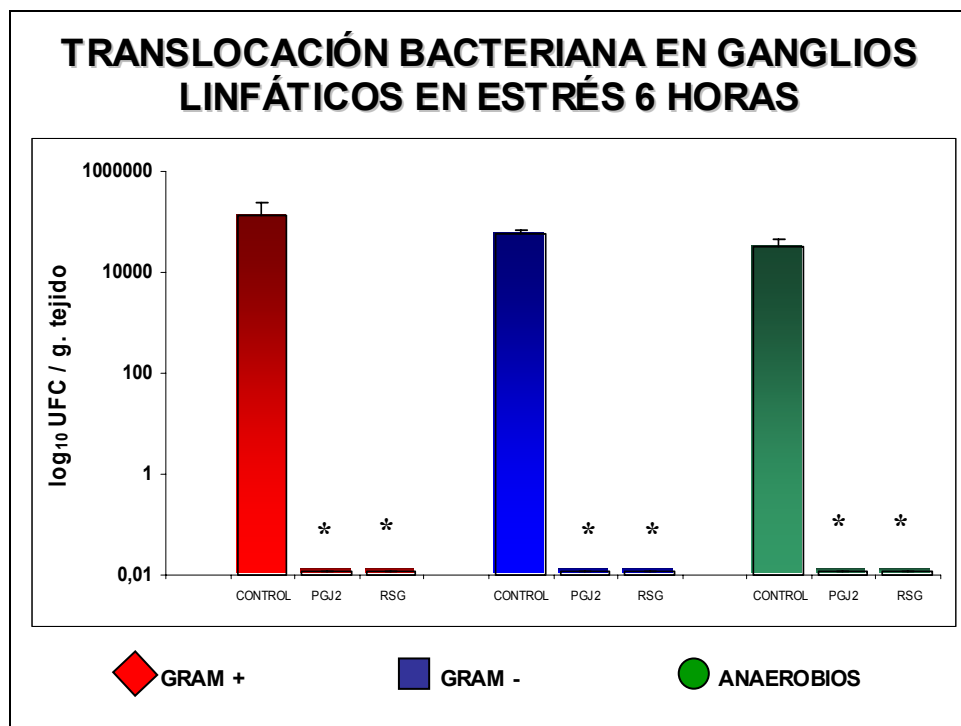


Figura 42: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de ganglios mesentéricos de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

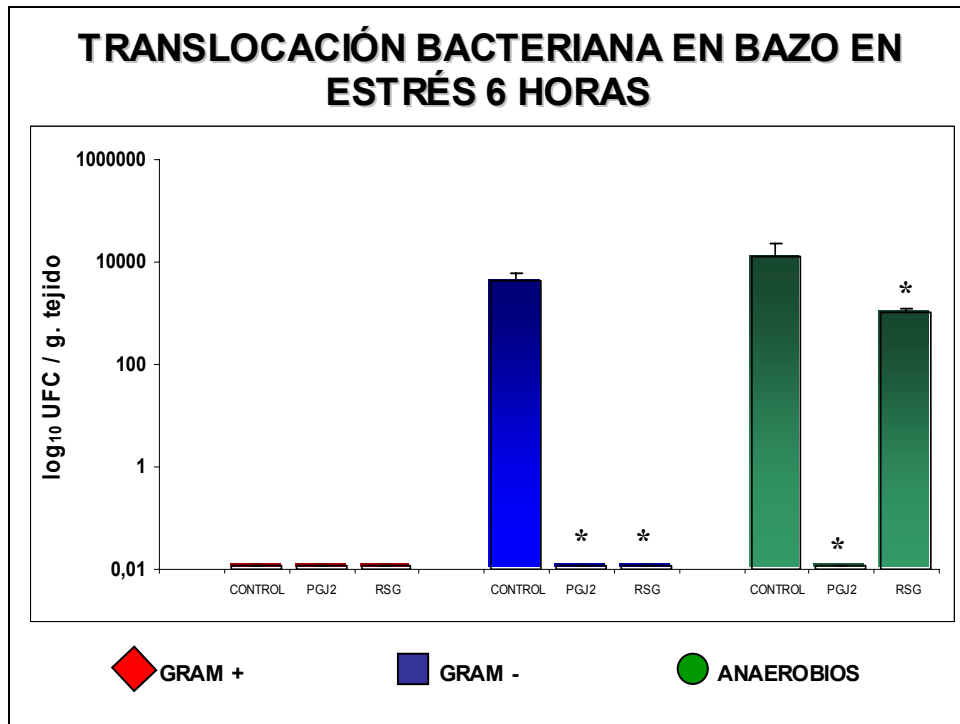


Figura 43: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de bazo de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo control respectivo.

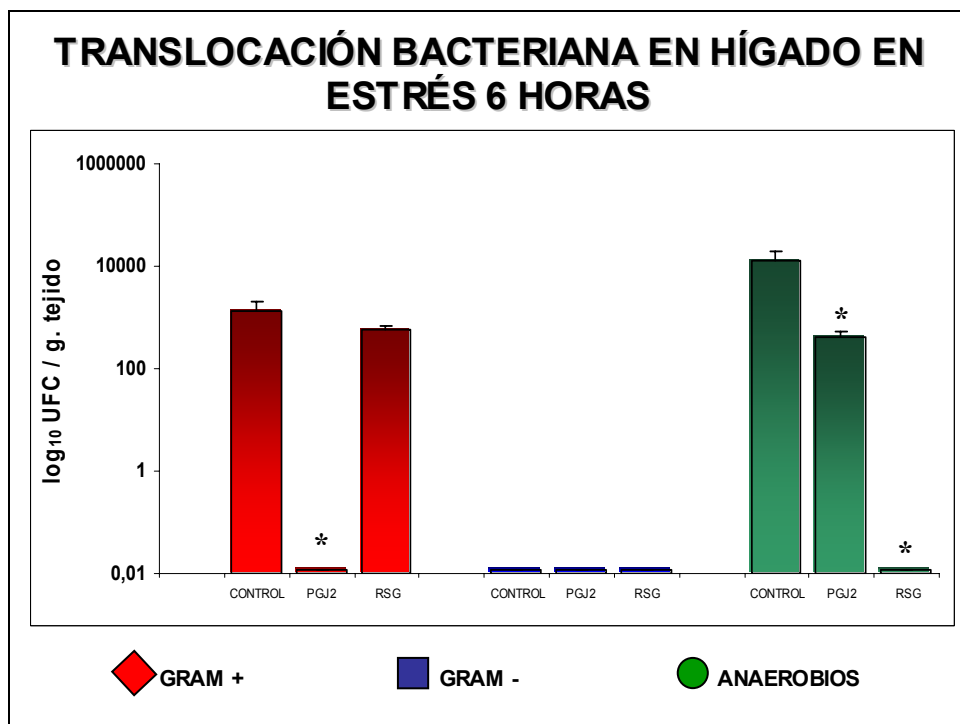


Figura 44: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de hígado de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo control respectivo.

Grupo S5d.

En ganglios mesentéricos se comprobó una reducción de la cifra de Gram positivos tanto en el grupo de PGJ₂, en que era inexistente, como en el grupo de Rosiglitazona (748,209 ± 609,84 ufc/g tejido) respecto al control, aunque sin alcanzar la significación estadística (1.650,93 ± 521,48 ufc/g tejido). No se detectaron Gram negativos en ningún grupo. En lo que respecta a los anaerobios se observó un fenómeno parecido al de Gram positivos, con ausencia de translocación en el grupo de PGJ₂ y descenso en el grupo de Rosiglitazona (1098,026 ± 685,36 ufc/g tejido) respecto a su control (4.323,65 ± 2.069,26 ufc/g tejido) –Figura 45-.

En las muestras de bazo se observó una disminución de la translocación para Gram positivos en el grupo tratado con PGJ₂ (185,872 ± 139,09 ufc/g tejido) y ausencia de translocación el tratado con Rosiglitazona. No se objetivaron Gram negativos en ningún grupo. Los anaerobios no se detectaron en el grupo de PGJ₂, en cambio si se observaron, aunque en numero menor, en el de Rosiglitazona (2136,75 ± 1065,99 ufc/g tejido) –Figura 46-.

En los cultivos procedentes de hígado se observó una reducción de la translocación bacteriana de Gram positivos tanto en el grupo tratado con PGJ₂ (290,53 ± 211,306 ufc/g tejido) como con Rosiglitazona (213,72 ± 150,49 ufc/g tejido) respecto al control (579,29 ± 97,78 ufc/g tejido). No se observó tampoco ningún Gram negativo. Los anaerobios no se observaron en las muestras procedentes del grupo tratado con PGJ₂, mientras que el grupo de Rosiglitazona experimentó una reducción (818,048 ± 406,405 ufc/g tejido) respecto a su control (3646,73 ± 1396,64 ufc/g tejido) –Figura 47-.

Aunque la disminución en estos casos no fue significativa si cabe constar que se experimento una clara reducción del número de animales en el que ocurrieron dichos fenómenos (Ver figura 48).

Las especies bacterianas identificadas a partir de los cultivos fueron básicamente las mismas que en los controles, de tal forma que se identificaron como Gram positivos *enterococcus* sp y estafilococo coagulasa negativo y como anaerobios, *bacteroides ureolyticus*, *bacteroides fragilis*, y *peptoestreptococcus* y *propionibacterium acnes*.

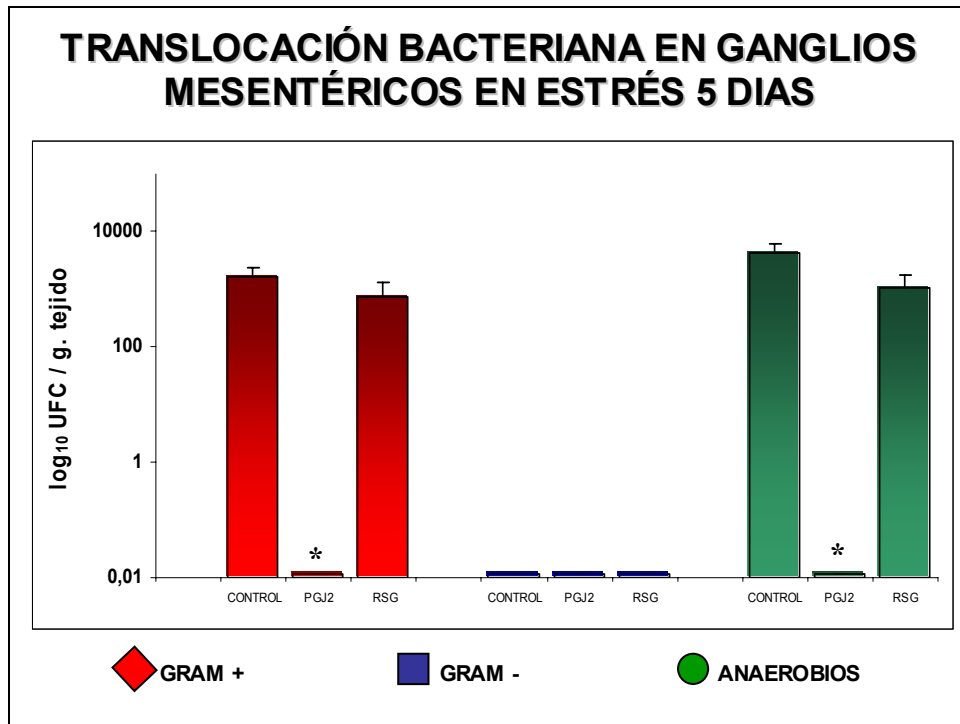


Figura 45: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de ganglios mesentéricos de cada grupo. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EMM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

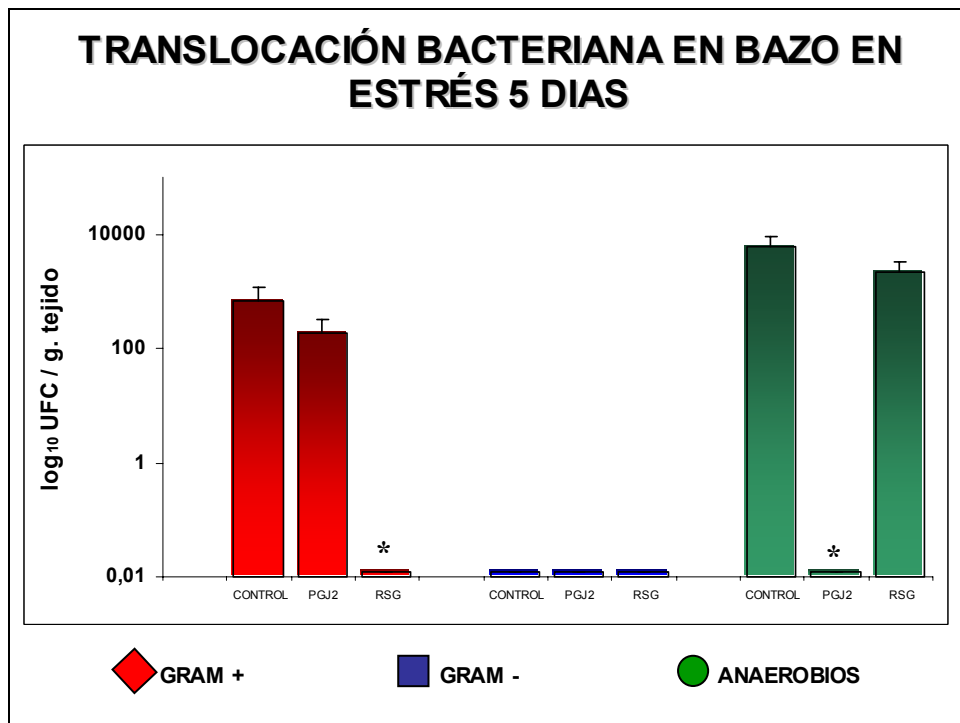


Figura 46: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de bazo de cada uno de los grupos. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs grupo control respectivo.

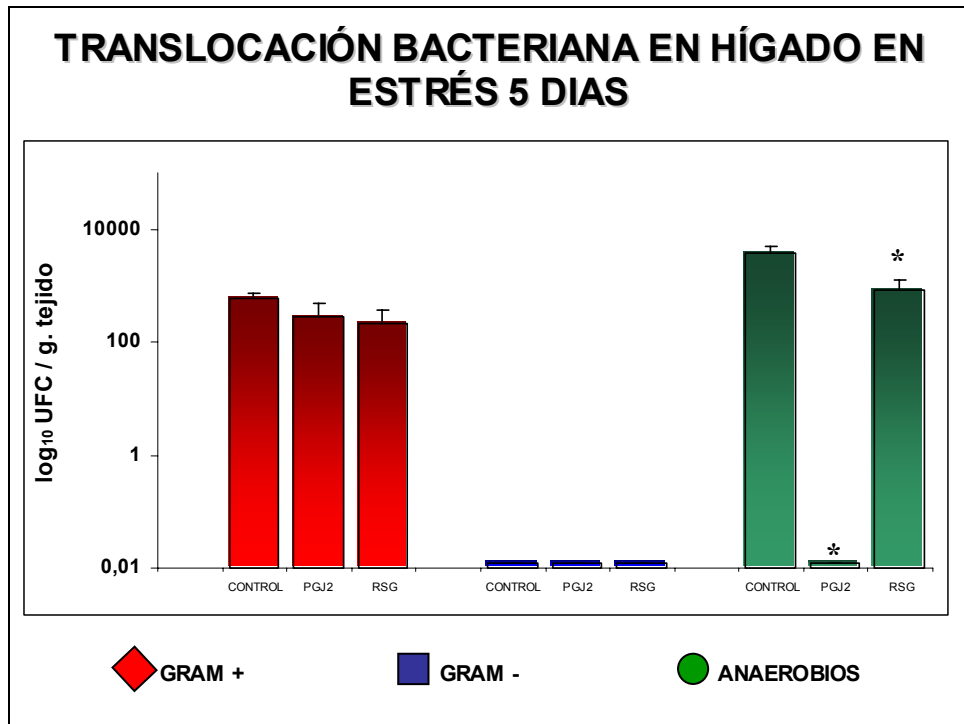


Figura 47: Determinación de las colonias bacterianas observadas en muestras de hígado de cada uno de los grupos. Unidades expresadas en \log_{10} ufc/g tejido \pm EEM. n=6 ratas por grupo. * $p < 0.05$ vs control respectivo.

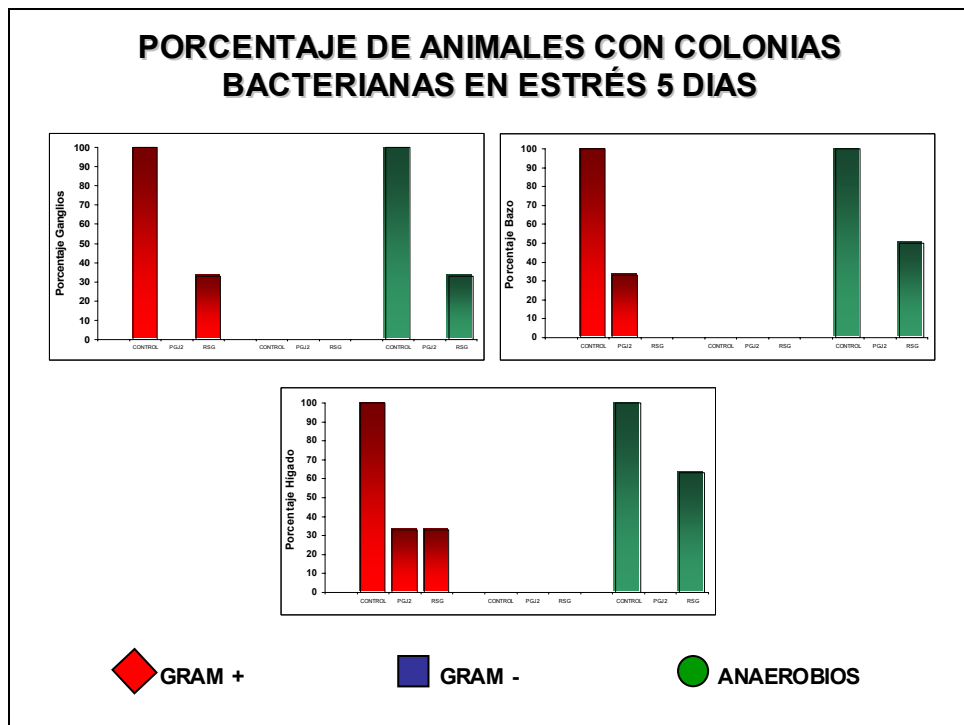


Figura 48: Porcentaje de animales con colonias bacterianas en cada uno de sus órganos según el tipo bacteriano.

- **Los niveles de IgA en la mucosa de colon** de animales no estresados fueron muy semejantes entre el grupo no tratado ($5,26 \pm 0,47$ ng por mg de proteína), el de PGJ₂ ($6,48 \pm 0,65$ ng por mg de proteína) y el de Rosiglitazona ($6,38 \pm 1,38$ ng por mg de proteína).

El déficit de IgA observado en S6h ($2,99 \pm 0,45$ ng por mg de proteína) se normalizó en el grupo de PGJ₂ ($6,63 \pm 0,85$ ng por mg de proteína) y en el de Rosiglitazona ($9,53 \pm 3,21$ ng por mg de proteína) –Figura 49-.

En S5d se observó un aumento de IgA tanto en el tratado con PGJ₂ ($5,85 \pm 1,78$ ng por mg de proteína) como en el de Rosiglitazona ($7,6 \pm 2,49$ ng por mg de proteína) respecto a su control ($4,34 \pm 0,62$ ng por mg de proteína), aunque sin alcanzar la significación estadística –Figura 49-.

En S10d se apreció igualmente un incremento no significativo de su síntesis tanto en el que se administró PGJ₂ ($8,88 \pm 2,73$ ng por mg de proteína) como en el de Rosiglitazona ($7,42 \pm 1,73$ ng por mg de proteína) respecto a su control ($4,8 \pm 0,88$ ng por mg de proteína) –Figura 49-.

No se han observado diferencias significativas entre ambos grupos de tratamientos para ninguno de protocolos de estrés estudiados.

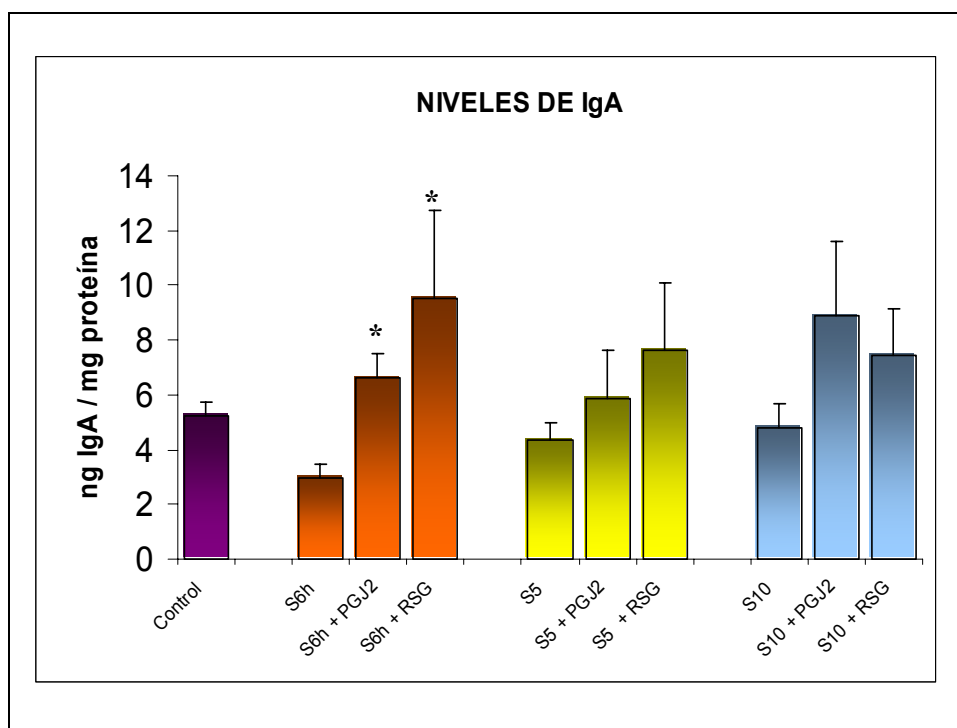


Figura 53: Niveles de Ig A expresadas en ng / mg de proteína ± EEM de muestras de colon para cada uno de los grupos. n=6 ratas por grupo de tratamiento. * p<0.05 vs grupo control respectivo.

DISCUSIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal es una enfermedad es una patología que a pesar de no tener una incidencia elevada (0.6 a 8 casos por 100.000/año para la CU y 0.4 a 5.5 casos por 100.000/año para la EC) afecta seriamente a la calidad de vida de estos pacientes (para rev. ver Pajares y Gisbert, 2001). En el caso concreto de la CU, aunque sus causas principales continúan siendo una incógnita, cada vez se conoce más su patogenia. Una de las teorías más atractivas considera que existe un factor iniciador (un factor medioambiental en un sujeto genéticamente predispuesto) que provoca una pérdida de la tolerancia inmunológica a la flora intestinal saprófita, induciendo una respuesta inflamatoria prolongada e inapropiada en la mucosa cólica (Fiocchi ,1998; Papadakis y Targan, 1999; Panés, 2001; Hugot et al, 2001; Farrell y Peppercorn, 2002). En los últimos años esta patología se ha convertido en eje central de numerosas investigaciones que tratan de dilucidar su difícil entramado inmunopatogénico con el objetivo de encontrar nuevas vías de abordaje en su manejo.

El motivo de esta Tesis fue el de estudiar el papel del estrés como factor contribuyente al desencadenamiento de brotes de la enfermedad ya que desde las primeras descripciones de la CU el estrés se ha implicado en la aparición de reagudizaciones (Sullivan, 1936); creencia aceptada tanto por parte de los gastroenterólogos como por los pacientes (Mitchell et al, 1987; Lewis, 1988; Robertson et al, 1989). Los estudios en humanos que han relacionado este hecho con la aparición de brotes son contradictorios, encontrando datos a favor (Fava et al, 1976; Bach et al, 1990; Garret et al, 1991; Duffy et al, 1991; Levenstein et al, 1994; Greene et al, 1994; Tocchi et al, 1997; Bitton et al, 2003) pero también otros en los que no se ha demostrado tal asociación (North et al 1991; Von Wietersheim et al, 1992). Ello quizás se deba a la enorme dificultad para cuantificar el grado de estrés de forma objetiva, la secuencia temporal de causalidad y el período de latencia entre el factor estresante y el brote, el escaso tamaño muestral de los distintos estudios y la ausencia de estratificación en el diseño y análisis que elimine posibles factores de confusión.

En modelos experimentales de estrés parece existir una mayor evidencia aunque los mecanismos no han sido completamente dilucidados. Al inicio de la presente Tesis doctoral se había documentado cómo el estrés incrementaba la susceptibilidad del colon de ratas al daño oxidativo producido por la instilación de TNBS en etanol al 50% o de DSS, modelos que reproducen en animales la colitis ulcerosa humana (Qiu et al, 1999; Milde y Murison, 2002; Colón et al, 2004). El objetivo fundamental de este trabajo era

demostrar el papel que el estrés “per se” tiene sobre la fisiología del colon a lo largo del tiempo ya que cada vez más estudios experimentales sugieren que varios tipos de estrés físico o psicológico pueden inducir una respuesta inflamatoria aguda y una disfunción de la barrera intestinal provocando translocación bacteriana y el aumento de permeabilidad a antígenos lumbales, los cuales, se asocian a un mantenimiento del estímulo sobre las células inmunes de la lámina propia y submucosa que cronifiquen el proceso (para rev. ver Collins, 2001). En concreto se ha estudiado en el presente trabajo si éste era capaz de inducir inflamación y activar mecanismos de control del mismo, alterar la respuesta inmunitaria humoral y la barrera intestinal favoreciendo la permeabilidad intestinal y la translocación bacteriana.

1. EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE LA PÉRDIDA DE PESO.

Se observa como el estrés por inmovilización 6 horas al día durante 5 días provoca una caída del peso de los animales, hecho que comienza desde el primer día. De todas formas debe tenerse en cuenta que el peso observado tras una sola sesión de estrés de 6 horas se debe fundamentalmente a la pérdida de líquido típica de la primera fase del estrés: vaciamiento vesical e intestinal y taquipnea inicial. Otro hecho que comienza a llamar la atención es que se observa una recuperación a cifras semejantes a las basales al cabo de 10 días, orientando hacia un posible fenómeno de aclimatación al estrés.

Este hecho no se acompañó de daño macroscópico de la mucosa del colon en ninguno de los grupos analizados, a diferencia de lo que ocurre en otros animales capaces de desarrollar colitis espontáneamente como los titís de cabeza de algodón - “cotton-top tamarin”- (Stout y Snyder, 1969; Wood et al, 2000) o como se producía en estos mismos animales cuando concomitantemente se instilaba vía rectal TNBS a dosis subcolítica (Colón et al, 2004).

2. DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA.

El estudio de la actividad mieloperoxidasa, proteína más abundante de los neutrófilos, es una medida indirecta de la infiltración leucocitaria. Se observa cómo el estrés a las 6 horas ya es capaz de inducir infiltración leucocitaria en la mucosa. Este hecho se perpetúa con menor intensidad hacia una normalización progresiva a los 5 días

y 10 días, lo que nos hace presuponer que existen diversos mecanismos locales compensadores o de adaptación que contribuyen a controlar este fenómeno. Esto corrobora la observación de otros autores e indica como incluso sin necesidad de la administración previa de TNBS (Collins et al, 1996), el estrés es capaz de favorecer la adhesión y migración leucocitaria, pero sin llegar a condicionar alteraciones reseñables en la histología del colon (Collins et al, 1996).

3. INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO POR ESTRÉS.

3a) Una sola sesión de 6 horas de estrés por inmovilización es capaz de incrementar significativamente la actividad de la iNOS, hecho que se mantiene a los 5 días. Esto demuestra que se trata de un fenómeno que se produce precozmente. Asimismo se observa una disminución tanto de su actividad como de su expresión a los 10 días. Por tanto, también se demuestra un fenómeno de acostumbramiento a los 10 días para los parámetros inflamatorios dependientes de iNOS que provocarán la producción de óxido nítrico y por tanto, favorecerán el daño nitrosativo por citotoxicidad endotelial y de las células epiteliales (Whittle et al, 1995). Este mismo comportamiento presenta también su expresión determinada por western-blot, en el que se produce un marcado aumento en S6h y una disminución progresiva con la perpetuación del estímulo estresante.

Por el contrario, la actividad de las isoformas constitutivas de NOS a través de la determinación de la actividad calcio dependiente no experimenta cambios significativos en relación con la exposición a estrés.

El incremento de la iNOS y la disminución de la nNOS en la mucosa macroscópicamente normal no inflamada es un marcador pronóstico potencial de la enfermedad inflamatoria intestinal y predice la progresión de la afectación mucosa en la CU (Colón et al, 2000, Menchén et al, 2004). La producción de altas concentraciones de NO provoca daño celular e inflamación mediante la inhibición de múltiples procesos celulares como la síntesis de ADN y la respiración mitocondrial (Gross y Wolin, 1995) por efecto directo o a través de la formación de ONOO^- (Beckman et al, 1990). Por tanto, el estrés puede influir negativamente a través de este mecanismo mediado por iNOS, en el desencadenamiento de brotes de enfermedad inflamatoria intestinal. De la misma manera, el manejo de las situaciones estresantes antes y durante el desarrollo de

la inflamación en modelos de colitis ulcerosa podría ser útil en el tratamiento de estos pacientes.

3b) La isoforma inducible COX-2, se encuentra presente en niveles detectables bajos en la mucosa normal de ratas control de forma constitutiva, coincidiendo lo que ocurre en colon de modelos murinos (Mc Naughton et al, 2000) y en sistema nervioso central, estómago o riñón (Hoffmann, 2000). Por otro lado destaca cómo el estrés aumenta la actividad de la isoforma inducible de COX desde fases precoces. Así se incrementa notoriamente en el grupo de ratas estresadas únicamente durante 6 horas. Esta inducción se perpetúa a lo largo de 5 y 10 días de repetición del agente estresante. Sin embargo, llama la atención que en el estrés de 10 días aún continúan los niveles significativamente altos respecto a los del grupo control, de lo que puede deducirse que parece que esta vía inflamatoria se perpetúa más en el tiempo que la vía mediada por iNOS en donde observábamos normalización de los valores a los 10 días. Este hallazgo se confirma analizando los resultados de la determinación de uno de sus productos, la prostaglandina E₂, proteína que aparece igualmente elevada en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Muller-Decker et al, 1999). De esta manera podemos observar cómo sus niveles experimentan un ascenso paralelo en el grupo estrés de 6 horas para disminuir progresivamente a los 5 y 10 días de estrés pero significativamente mayores que los del grupo control. Ésta induce la secreción de epitelial de HCl contribuyendo a la diarrea (Weymer et al, 1985), hiperemia por su efecto vasodilatador (Terragno, 2004) y un incremento de la proliferación epitelial, fenómeno característico de la EII (Uribe, 1992). Además se ha propuesto que la liberación de prostaglandinas, entre otros mediadores, tras la degranulación de los mastocitos de la lámina propia inducida por estrés agudo, contribuyen a un incremento de la permeabilidad intestinal (Santos et al, 2000).

La isoforma COX-1 en cambio, no experimenta grandes variaciones en los distintos grupos respecto al control.

Estos acontecimientos son superponibles a lo que ocurre en pacientes con EII, en los que se ha observado una inducción de la COX-2 y un aumento de PGE₂ en la mucosa colónica (Wang et al, 2005).

14. PAPEL DE NF- κ B COMO INDUCTOR DE MEDIADORES DE DAÑO OXIDATIVO/NITROSATIVO PROVOCADA POR ESTRÉS.

Numerosos estudios han demostrado que la activación de NF κ B es un requerimiento esencial en la expresión de iNOS y COX-2 (Xie et al, 1994; Mifflin et al, 2002). En relación a este papel de NF- κ B como inductor de la actividad de los enzimas anteriormente citados, se comprueba cómo efectivamente el estrés provoca la translocación nuclear de dicho factor, comportándose de forma paralela a los cambios observados en los mediadores de daño oxidativo/nitrosativo, tal y como también ocurre en la EII (Neurath et al, 1998). Así demostramos por primera vez en un modelo en ratas que el estrés provoca un incremento de la expresión de banda en extractos nucleares y una marcada disminución de la misma en extractos citosólicos de células epiteliales de colon en el grupo de estrés de 6 horas respecto al grupo control. Paralelamente a la inducción de iNOS y COX-2 se produce un incremento de la expresión de banda en extractos nucleares algo menor en estrés de 5 días y menor en el de 10 días (todavía en rango significativo respecto al control), y de forma inversa la de extractos citosólicos. Por consiguiente puede observarse cómo el estrés, a través de este mecanismo, es capaz de inducir la síntesis de mediadores inflamatorios y cómo por tanto, podría favorecer el desencadenamiento de brotes de CU.

15. ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA VIA ANTIINFLAMATORIA POR ESTRÉS.

De forma paralela a la inducción de estos mediadores inflamatorios, se comprueba cómo el estrés conlleva la activación de una vía antiinflamatoria que intenta compensar a los primeros. La mayoría de los organismos superiores han desarrollado complejos sistemas de homeostasis que permiten sobrevivir a las células frente a eventos estresantes. Un posible mecanismo protector puede mediar a través de los receptores activadores de la producción de peroxisomas. En concreto, una de sus isoformas, el PPAR- γ predominante a nivel intestinal, parece jugar un papel fundamental en el control de la respuesta inflamatoria al reducir las citoquinas proinflamatorias (Dubuquoy et al, 2002; Feinstein, 2003), la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria como VCAM e ICAM (Pasceri et al, 2001) o la expresión y

actividad de iNOS (Colville-Nash et al, 1998). Todos estos efectos parecen estar mediados por inhibición de la vía de señalización mediada por NF- κ B por inhibición de la degradación de I κ B- α (Su et al, 1999) o la regulación del paso de relA núcleo-citoplasma (Kelly et al, 2004).

En nuestro caso demostramos un marcado aumento de la expresión de PPAR- γ en el grupo de animales estresados durante 6 horas respecto al control, exactamente igual a como ocurre en la corteza cerebral de ratas sometidas a estrés (García-Bueno et al, 2005b). Asimismo, se observa una disminución progresiva de su expresión en el estrés de 5 y 10 días. Ello podría comportar un mecanismo compensatorio precoz a los fenómenos proinflamatorios que el estrés favorece a través de su acción inhibitoria sobre NF- κ B entre otros (Desreumaux et al, 2001). Los glucocorticoides parecen jugar un papel fundamental en esta regulación ya que inducen la expresión de PPAR- α y PPAR- γ en varios tipos celulares (Lemberger et al, 1994 y 1996; Wu et al, 1996; Inoue et al, 1998). Este mecanismo protector parece ser defectuoso en los pacientes con CU por razones aún no aclaradas (Katayama et al, 2003; Dubuquoy et al, 2003).

El mismo comportamiento presenta la PGJ₂, análogo natural de PPAR- γ . De esta forma se demuestra un marcado incremento de sus niveles en el grupo de estrés de 6 horas para disminuir progresivamente según se mantiene en el tiempo. Este fenómeno se ha observado también en cerebro pero los mecanismos no han sido completamente dilucidados, sugiriéndose que se trate de un receptor activado por ligando (García-Bueno et al, 2005a). Teniendo en cuenta que ésta es producto de la activación de COX-1 y COX-2 como ya se ha demostrado en otros estudios previos (Yamagata et al, 1993; Madrigal et al 2003), podemos suponer el doble rol de la COX-2, como inductor de inflamación y como activador de una vía compensatoria antiinflamatoria a través de PPAR- γ (Forman et al, 1995), que poco a poco iría autorregulando la inducción tan marcada observada en el estrés agudo. Este fenómeno dual de la COX-2 acontece en dos fases: Una primera en la que predomina la síntesis de PGE₂ fundamental en la fase inflamatoria y otra segunda en que se es sustituida la PGE₂ por 15-deoxi-PGJ₂ que actuaría como mecanismo contrarregulador de la respuesta inflamatoria (Gilroy et al, 1999; Shibata et al, 2002). Si este mecanismo compensador fuese defectuoso en pacientes con CU, este control no se produciría y ello podría favorecer el desencadenamiento de brotes de enfermedad.

16. ALTERACIÓN DE PERMEABILIDAD INTESTINAL INDUCIDA POR ESTRÉS.

Una posible conexión entre el estrés y el desarrollo de enfermedad puede ser la alteración de la barrera mucosa. Varios estudios han demostrado que el estrés agudo es capaz de inducir la permeabilidad a macromoléculas y la secreción de iones mediado por el sistema colinérgico (Saunders et al, 1997), mastocitos (Santos et al, 2000; Söderholm et al, 2002b), el eje HHA (Meddings y Swain, 2000) y linfocitos T CD4+ (Qiu et al, 1999; Ferrier et al, 2003). En nuestro modelo observamos como el estrés es capaz de alterar morfológicamente y funcionalmente la barrera intestinal. Induce un aumento de la permeabilidad paracelular a macromoléculas al objetivarse un incremento evidente del Cr⁵¹-EDTA en sangre de animales estresados durante 6 horas y 5 días para disminuir en el grupo de 10 días a niveles semejantes a los del control. Una posible explicación a este fenómeno la encontramos en el análisis con microscopio electrónico de las células epiteliales del colon, donde observamos una mayor laxitud de las uniones intercelulares en los grupos de estrés de 6 horas y 5 días. El mecanismo por el cual ocurre este hecho puede encontrarse en parte en la excesiva producción de NO secundaria a la inducción de iNOS comprobada anteriormente, hecho descrito *in vivo* en la barrera epitelial hepatobiliar de modelos murinos en los que se indujo una respuesta inflamatoria con lipopolisacárido (Han et al, 2004) o *in vitro* en mucosa intestinal expuesta a lipopolisacárido, Zymosan, agua oxigenada o a donantes de NO como la S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (Unno et al, 1997; Cuzzocrea et al, 2000; Banan et al, 2001; Xu et al, 2002). Este fenómeno parece producirse por una modificación en el citoesqueleto inducida por el NO y la subsiguiente disfunción de las uniones intercelulares como consecuencia de una disrupción de la F-actina (Banan et al, 2001) y de una disminución de la polimerización de la tubulina (Banan et al, 2003) o de las proteínas de la “zonula ocludens” (ZO) ZO-1, ZO-2 y ZO-3 así como de la expresión de ocludina (Han et al, 2004). En este sentido, el incremento de la permeabilidad del colon observada tras estrés agudo ha sido recientemente asociado con una regulación a la baja de ZO-2 y ARN mensajero de ocludina (Demaude et al, 2006). Asimismo contribuyen otros factores como el incremento de corticosterona (Meddings y Swain, 2000; Söderholm et al, 2002c) y la hiperactivación del sistema colinérgico como consecuencia del estrés (Saunders et al, 1997).

17. ESTUDIO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS.

Paralelamente a los fenómenos de permeabilidad se observa inducción de la translocación de la flora bacteriana en los grupos estresados durante 6 horas y 5 días. Sin embargo este hecho no se comprueba en los animales estresados durante 10 días.

En ganglios mesentéricos es donde más unidades formadoras de colonias se observan. Se objetivó cómo precozmente translocan todos los tipos bacterianos mientras que en el estrés de 5 días sólo lo hacen Gram positivos y anaerobios. En el bazo a las 6 horas se observan anaerobios y Gram negativos mientras que a los 5 días desaparecen Gram negativos para aparecer al igual que en los anteriores Gram positivos y anaerobios. En el hígado no se observa translocación de Gram negativos en ningún momento ni anaerobios.

En conjunto destaca si tenemos en cuenta las especies bacterianas, el enorme predominio de los Gram positivos (estafilococos, enterococos, lactobacilos, propionibacterias, clostridios y peptoestepococos) sobre los Gram negativos en todos los órganos estudiados, contrario a lo que suele ocurrir en humanos. Este hecho coincide con lo descrito en otros modelos de estrés animal (Anderlik et al, 1990; Ando et al, 2000). Se ha propuesto como posible explicación a este hecho que translocan aquellos que se encuentren en una mayor proporción en el intestino de estos animales. Así Gram positivos como *Lactobacillus* y *Enterococcus* entre otros (10^{7-8} /g ciego), mientras que Gram negativos como *E. Coli* y *Enterobacterias* se encuentran en menor proporción - 10^{4-5} /g ciego- (Ando et al, 2000). Los anaerobios estrictos como *Bacteroides* y *Clostridium*, aunque constituyen el 99,9% de la microflora endógena (10^{9-10} /g ciego) se detectan mucho menos dada su extrema sensibilidad al oxígeno. En cambio, los anaerobios facultativos como *Lactobacillus* y *Enterococcus* al poseer mayor tolerancia al oxígeno se objetivan más en las distintas muestras (Steffen et al, 1988).

El estrés es capaz de estimular los mastocitos a través de la sustancia P y el CRF liberados en el “eje del estrés” produciendo un aumento de histamina. Recientemente se ha demostrado que ésta junto con catecolaminas como la dopamina y noradrenalina, aumentan la adherencia bacteriana y con ello, la translocación (Mawdsley y Rampton, 2005).

La integridad de la mucosa es fundamental para prevenir este fenómeno de translocación bacteriana, de tal forma que la alteración de las uniones intercelulares que

demostramos puede ser también un factor fundamental para que ocurra este hecho. Así vía linfática llega a ganglios mesentéricos y vía hematógena a bazo e hígado. Este fenómeno a su vez ha demostrado inducir el eje HHA y cambios en el sistema nervioso central a través de la acción de diversas citoquinas como la IL-1, IL-6 y TNF- α , aumentando los niveles de corticosterona y catecolaminas, lo que podría contribuir a la potenciación y perpetuación de la respuesta inflamatoria (Dunn et al, 2003).

18. PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL EN MUCOSA DE COLON DE ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS.

En el intestino se observa que el estrés es capaz de alterar el sistema inmunitario, de forma que precozmente (S6h) es capaz de disminuir la síntesis de IgA. Ésta constituye la primera línea de defensa contra virus y bacterias y por supuesto media en el equilibrio y mantenimiento de la pared intestinal frente a la flora intestinal. La IgA secretada controla la estrecha asociación entre las bacterias y el epitelio y reduce la penetración bacteriana en él. Esta deplección de IgA junto a un incremento de sus niveles séricos, ha sido demostrada anteriormente en saliva y secreción vaginal de ratas a las que se les administró dexametasona (Wira et al, 1990; Guhat y Hau, 1996), sin embargo esta es la primera descripción de este fenómeno en colon. Parece que el incremento de los niveles séricos de IgA mediado por éstos podría ser un mecanismo más eficaz de combatir la infección sistémica. En las secreciones lumbinales de la superficie mucosa, la IgA está constituida por un dímero en asociación con dos polipéptidos, la cadena J y el componente secretor. Así, se ha observado que la IgA polimérica activa la vía alternativa del complemento de forma más efectiva que la IgA monomérica (Rits et al, 1988). Por tanto, el proceso por el que se produce este fenómeno parece mediado a través del incremento de la producción de glucocorticoides, los cuales favorecen la redistribución de la producción de IgA por parte de células plasmáticas desde el tejido linfoide asociado a mucosas hacia lugares más “centrales” como bazo y ganglios linfáticos. Estos datos apoyan una vez más la estrecha relación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central y el endocrino.

Dado que la disminución observada en el estrés agudo de 6 horas y la progresiva recuperación en los subsiguientes grupos de 5 y 10 días, es paralela al fenómeno de translocación bacteriana acontecido en la pared intestinal, parece que quizás este sea un mecanismo que contribuya a que se produzca esta alteración de la permeabilidad

intestinal a la flora bacteriana luminal. De la misma manera, los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides sobre células del sistema inmune como linfocitos o macrófagos colaboran sin duda a este fenómeno de translocación (para rev. ver Tuckermann et al, 2005).

19. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA PGJ₂/PPAR- γ EN LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR ESTRÉS.

El colon es el órgano junto con el tejido adiposo con mayor concentración de PPAR- γ del organismo (Fajas et al, 1997) lo que sugiere que tenga un rol fundamental en la homeostasis cólica. Numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado el papel antiinflamatorio de PPAR- γ en el tracto intestinal, de forma que el uso de agonistas como tiazolindionas, 15d-PGJ₂ u otros miembros de las familia ciclopentona de las PG, o ácido linoleico conjugado, han demostrado un efecto protector en procesos inflamatorios a este nivel (Su et al, 1999; Desreumaux et al, 2001; Saubermann et al, 2002; Takagi et al, 2002; Katayama et al, 2003; Bassaganya-Riera et al, 2004). Asimismo se ha observado que ratones heterocigotos PPAR- γ muestran un aumento de la susceptibilidad a la colitis inducida por TNBS (Desreumaux et al, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la PGJ₂ es una prostaglandina que podría jugar un papel fundamental como regulador de la respuesta inflamatoria y por ello nos propusimos determinar si la administración exógena de este ligando natural de PPAR- γ era capaz de disminuir los fenómenos que se habían observado como consecuencia del estrés. Asimismo se han descrito multitud de ligandos sintéticos de PPAR- γ , de los cuales uno de los más potentes es la Rosiglitazona (para rev. ver Storer et al, 2005). Por ello utilizamos estos fármacos para determinar una posible implicación terapéutica en estos acontecimientos.

A la vista de nuestros resultados tiene un claro efecto preventivo de la inducción de los mediadores inflamatorios de daño nitrosativo (iNOS) en el colon de ratas sometidas a estrés por inmovilización. De tal forma que este fenómeno demostrado previamente a otros niveles, como en el sistema nervioso central (Heneka et al, 1999; García-Bueno et al, 2005b, Pereira et al, 2005b) o a nivel coronario (Choi et al, 2004) queda corroborado en colon. Este mismo efecto se observa con su análogo natural PGJ₂ que reduce significativamente de la misma manera la expresión de iNOS en todos los

grupos de estrés. Además de su efecto como PPAR- γ agonista, se ha demostrado que vía PPAR- γ independiente produce inhibición de la vía de activación transcripcional de NF- κ B (Petrova et al, 1999), probablemente a través de una inhibición directa de I κ B quinasa (Rossi et al, 2000) y la subsiguiente resistencia de I κ B- α a la degradación (García-Bueno et al, 2005b). Otro mecanismo PPAR- γ independiente por el que disminuye la expresión de iNOS es a través de la inhibición de la actividad catalítica de TACE y por tanto, de la reducción de los niveles de TNF- α (García-Bueno et al, 2005b).

Esto es de especial interés ya que la activación de esta isoforma de NOS conlleva la producción de enormes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que ocasionan daño celular en múltiples sistemas (Gross y Wolin 1995). Existen trabajos previos que demuestran el efecto beneficioso de la administración de inhibidores selectivos y específicos de la iNOS en modelos experimentales de colitis (Zingarelli et al, 1998). Por tanto cabe esperar este mismo efecto beneficioso con estos fármacos a través de esta vía.

La expresión de **ciclooxigenasa** experimenta un aumento en todos los grupos tratados con Rosiglitazona y PGJ₂. Sin embargo la PGE₂, uno de sus productos, sufre una clara reducción de su síntesis en las primeras fases del estrés (estrés de 6 horas y 5 días) aunque no en el de 10 días. Asimismo, la determinación de niveles de PGJ₂ tras administrar ambos fármacos demuestra el lógico aumento en el grupo de tratado con PGJ₂ exógena en todos los grupos de estrés y un incremento en el grupo al que se administró Rosiglitazona, hecho derivado de su acción agonista sobre PPAR- γ . En conclusión, el resultado global sería una disminución de las prostaglandinas de la vía inflamatoria y un aumento de las de la vía antiinflamatoria. Los estudios previos acerca de las acciones de los agonistas de PPAR- γ sobre la expresión de COX-2 son variados, de tal forma que algunos han demostrado una inhibición de la misma en macrófagos o cultivos de células epiteliales humanas (Inoue et al, 2000; Subbaramaiah et al, 2001), otros que no han demostrado ningún efecto sobre ésta en cerebro de rata o células de la musculatura lisa vascular (Staels et al, 1998; García-Bueno et al, 2005a) y la mayoría, que como en nuestro caso, los aumenta en diversas extirpes celulares como monocitos humanos, células epiteliales humanas, hepatocitos murinos inmortales o células musculares lisas del árbol respiratorio humano (Ledwith et al, 1997; Meade et al, 1999;

Pontsler et al, 2002; Pang et al, 2003). Probablemente esta variabilidad se deba, entre otras, a que se trata de diferentes protocolos de daño en distintos tipos celulares con diversos métodos de cultivo. Esta inducción tiene la peculiaridad de ser en cierto modo selectiva hacia la vía antiinflamatoria, de tal forma que la activación de PPAR- γ por estos agonistas, provocaría su unión a una región promotora de COX-2 que aumentaría su síntesis y por tanto, su expresión (Meade et al, 1999). Esto conduciría a un incremento de producción de PGJ₂. En cambio según un estudio reciente, parece que el propio PPAR- γ es capaz de inhibir la Prostaglandina E sintasa microsomal y por tanto, ello se traduce en una disminución de los niveles de PGE₂ en monocitos de sangre periférica (Peng et al, 2005), condrocitos (Bianchi et al, 2005) y en células epiteliales intestinales (Schroder et al, 2006). Esta inhibición conlleva entre otros, una disminución del peristaltismo y de la secreción intestinal favorecida por la acción de PGE₂, cuya producción se favorecía por el estrés como quedo demostrado en los hallazgos anteriormente expuestos. Este fenómeno puede explicar también en parte porque la expresión de COX-2 en el grupo de estrés de 10 días continuaba significativamente elevada por cierto efecto de la inducción intrínseca PPAR- γ .

La **permeabilidad paracelular a macromoléculas** consigue reducirse significativamente en los grupos en los que se encontraba aumentada hasta valores semejantes a los del grupo control. En este sentido, la activación de PPAR- γ por butirato –producido en grandes cantidades por las bacterias comensales del colon- ha demostrado reducir en otros modelos la permeabilidad cólica probablemente a través de la promoción de la diferenciación de células epiteliales intestinales y el consecuente reforzamiento de las uniones intercelulares entre las células epiteliales intestinales (Kinoshita et al, 2002), ya que el número de uniones intercelulares es mayor en células epiteliales diferenciadas de la punta de la vellosidad intestinal que en las de la cripta – menos diferenciadas- (Madara et al, 1980) y que la expresión de ZO-1 aumenta en células Caco-2 con el tiempo (Anderson et al, 1989). Paralelamente, en lo que respecta a la **translocación bacteriana** se puede apreciar en el estrés de 6 horas como se produce una clara disminución de la translocación en ambos grupos de tratamiento. El grupo de animales estresados durante 5 días experimentó una disminución menor de la translocación en ambos grupos de tratamiento. Esto puede deberse a una menor translocación que hace que las diferencias sean menos apreciables. Sin embargo, demostramos como hay una enorme variabilidad y existen muchos animales en los que

no se demuestra translocación, por lo que parece claro que existe una mejoría en este grupo. Esto puede servir de base a estudios ulteriores específicamente diseñados para analizar este fenómeno. Las causas de este control de la translocación las tenemos en los fenómenos observados anteriormente. Por un lado, la inducción de iNOS incrementa la producción de radicales libres que provocaban una alteración de las uniones intercelulares (Han et al, 2004). Por otro, la producción de PGE₂ como consecuencia de la inducción de COX-2, el aumento de actividad mieloperoxidasa y otros factores inflamatorios, contribuyen al deterioro de las mismas como quedo demostrado anteriormente. Puesto que estos fármacos a través de PPAR- γ son capaces de atenuar la producción de estas moléculas, es lógico que se controle este fenómeno de translocación y disminuya la permeabilidad a macromoléculas como ha quedado demostrado en los experimentos realizados en esta Tesis. Si estos receptores son capaces de modular la unión intercelular a través de un efecto sobre las proteínas que la regulan, están aún por demostrar, existiendo recientes indicios de ello a nivel renal (Efrati et al, 2005).

La **determinación de IgA** en los grupos tratados permite concluir como la estimulación de PPAR- γ puede tener también un efecto beneficioso especialmente en el grupo de estrés de 6 horas. En éste se producía una inhibición de su síntesis a través de la redistribución de su producción por parte de células plasmáticas como consecuencia de la acción de los corticoides liberados por el estrés, lo cual también contribuye a controlar en cierto modo la translocación bacteriana. No hay datos acerca de porqué son capaces de incrementar los niveles de IgA pero este hecho permite conjeturar que los PPARs puesto que son miembros de una superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, quizás su estimulación module los efectos de los corticoides liberados por el estrés sobre el sistema inmune, siendo una posible hipótesis para nuevos estudios en el futuro.

En resumen, queda demostrado el potencial efecto beneficioso de estos agonistas de PPAR- γ a nivel de la mucosa de colon alterada por efecto del estrés. Como resultado de la mejoría de todos estos parámetros, ambos fármacos mejoran parámetros clínicos, al conseguir evitar la pérdida de peso que se producía a los 5 días como consecuencia del efecto de estrés. Esto apoya datos de estudios previos sobre este mismo hecho en mucosa inflamada con DSS (Su et al, 1999; Sánchez-Hidalgo et al, 2005) y por tanto, representando una potencial terapia novedosa en el tratamiento de la EII humana. De

hecho, un estudio piloto que evaluó la eficacia de rosiglitazona en pacientes con CU ha mostrado resultados prometedores que pueden servir de base para futuros estudios randomizados y controlados (Lewis et al, 2001). A otros niveles como en cerebro se ha observado una mayor potencia antiinflamatoria de PGJ₂ que de Rosiglitazona, atribuyéndose a la actuación de la primera no sólo a través de PPAR- γ sino a través de una reducción de la actividad iNOS, una inhibición de la producción de PGE₂ y de la liberación de TNF- α o una prevención de la degradación de I κ B y por tanto inhibiendo a NF- κ B (García-Bueno et al, 2005a; Pereira et al, 2005b). En cambio, en nuestro caso hemos demostrado como la Rosiglitazona presenta una potencia muy similar a la PGJ₂. Probablemente eso pueda ser debido por un lado a que en una inducción “leve” como se produce en el estrés aislado, ambos sean suficientes para controlar la respuesta inflamatoria, y por otro, a que estos fármacos lleguen perfectamente a las células diana, al tratarse de un órgano muy vascularizado y sin ninguna barrera como ocurre en encéfalo con la barrera hemato-encefálica.

En conclusión, en esta Tesis queda demostrado el efecto perjudicial del estrés sobre la mucosa del colon, siendo inductor de parámetros inflamatorios, favoreciendo la permeabilidad intestinal, produciendo translocación bacteriana y alterando la función del sistema inmune. La perpetuación del estímulo estresante genera un fenómeno de acostumbamiento que tiende a estabilizar estos parámetros. No están claramente determinados si estos mecanismos de compensación en relación con el estrés pueden estar alterados en pacientes con EII, lo que puede servir de base para nuevos estudios. Uno de los estudiados en este trabajo, la inducción compensadora de la vía PGJ₂/PPAR- γ puede modularse farmacológicamente, siendo en este modelo capaz de mejorar estas alteraciones y convirtiéndolo en un enfoque terapéutico prometedor. Aún están por dilucidar completamente los mecanismos moleculares a través de los cuales modulan la mejoría en el sistema inmune humoral, la permeabilidad intestinal y las uniones intercelulares y como resultado de todo ello, la translocación bacteriana; lo que supone un punto de partida para trabajos futuros.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. La exposición a estrés por inmovilización no conlleva daño macroscópico de la mucosa del colon, aunque sí se produce una pérdida de peso de los animales sometidos a estrés.
2. La exposición a estrés por inmovilización favorece la infiltración leucocitaria en la mucosa del colon determinada por un aumento de la actividad mieloperoxidasa.
3. La exposición a estrés por inmovilización provoca la translocación al núcleo del factor nuclear κ B con la consiguiente inducción de una vía inflamatoria mediada por iNOS y COX-2 incrementando la producción de NO y PGE₂ respectivamente.
4. La exposición a estrés por inmovilización, a través de estos factores, favorece la apertura de las uniones intercelulares epiteliales. Ello provoca un aumento de la permeabilidad paracelular a macromoléculas y favorece la translocación bacteriana.
5. La exposición a estrés provoca una disminución de la síntesis luminal de IgA lo que contribuye al fenómeno anterior.
6. Todos los cambios anteriores se producen de forma especialmente significativa y precoz en el estrés agudo con una tendencia a la normalización en el estrés mantenido.
7. Simultáneamente como mecanismo compensador, se activa una vía antiinflamatoria de las deoxiPGs y sus receptores nucleares diana PPAR- γ que pueden contribuir a la normalización de los parámetros inflamatorios anteriores.
8. La estimulación de esta vía antiinflamatoria con un ligando endógeno y otro sintético de PPAR- γ (PGJ₂ y Rosiglitazona) atenúa todos los cambios inducidos por estrés, lo que la convierte en un nuevo enfoque terapéutico en las enfermedades intestinales relacionadas con el estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Ader R, Cohen N, Felten D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 1995; 345: 99-103.
- Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62: 527-535.
- Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 731-748.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680.
- Alcalá MJ, Casellas F, Pallares J, de Torres I, Malagelada JR. Infection by cytomegalovirus in patients with ulcerative colitis requiring colonic resection. *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 201-204.
- Almer S, Kald B, Franzen L, Strom M, Tagesson C. Concentrations of platelet-activating factor in rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Eur J Surg* 1996; 5: 391-396.
- Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 843-850.
- Anderlik P, Szeri I, Banos Z, Barna Z. Bacterial translocation after cold stress in young and old mice. *Acta Microbiol Hung* 1990; 37: 289-294.
- Anderson JM, Van Itallie CM, Peterson MD, Stevenson BR, Carew EA, Mooseker MS. ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 1047-1056.
- Anderson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001; 344: 808-814.
- Ando T, Brown RF, Berg RD, Dunn AJ. Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R2164-2172.
- Annese V, Piepoli A, Latiano A, Lombardi G, Napolitano G, Caruso N, Cocchiara E, Accadia L, Perri F, Andriulli A. HLA-DRB1 alleles may influence disease phenotype in patients with inflammatory bowel disease: a critical reappraisal with review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 57-64.
- Apgar JT. Newer aspects of inflammatory bowel disease and its cutaneous manifestations: a selective review. *Semin Dermatol* 1991; 10: 138-147.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302: 723-727.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 1999; 160: 1-12.
- Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, Watanabe M, Kobayashi K, Hibi T, Ando K, Takata H, Sekiguchi S. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982; 82: 413-418.
- Bacaner MB. Quantitative measurement of regional colon blood flow in the normal and pathological human bowel. *Gastroenterology* 1966; 51: 764-777.
- Bach O, Wild HJ. Life stress events preceding illness episodes in multiple sclerosis and ulcerative colitis. A comparison. *Z Gesamte Hyg* 1990; 36: 442-443.
- Balan V, Larusso NF. Hepatobiliary disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 647-669.
- Balazs R, Cotterrell M. Effect of hormonal state on cell number and functional maturation of the brain. *Nature* 1972; 236: 348-350.
- Baldwin Jr A. The NFκB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683.
- Banan A, Farhadi A, Fields JZ, Mutlu E, Zhang L, Keshavarzian A. Evidence that nuclear factor-κB activation is critical in oxidant-induced disruption of the microtubule cytoskeleton and barrier integrity and that its inactivation is essential in epidermal growth factor-mediated protection of the monolayers of intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 13-28.
- Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1234-1246.
- Barclay GR, Turnberg LA. Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 1988; 94: 994-998.
- Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 2001; 56: 928-936.

- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
- Barthet M, Hastier P, Bernard JP, Bordes G, Frederick J, Allio S, Mambrini P, Saint-Paul MC, Delmont JP, Salducci J, Grimaud JC, Sahel J. Chronic pancreatitis and inflammatory bowel disease: true or coincidental association?. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2141-2148.
- Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777-791.
- Bauerle PA, Baichwal UR. NF κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997; 65: 111-137.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9237-9242.
- Baum A, Posluszny DM. Health psychology: mapping biobehavioral contributions to health and illness. *Health Psychology* 1999; 50; 137-163.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-1437.
- Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: G622-630.
- Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ₂ and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* 2003; 112: 945-955.
- Belluzzi A, Boschi S, Brignola C, Munarini A, Cariani G, Miglio F. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(Suppl 1): S339-342.
- Bhagat S, Das KM. A shared and unique epitope on human colon, eye, and joint detected by a monoclonal antibody. *Gastroenterology* 1994; 107: 103-108.
- Bhatia V, Tandon RK. Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 332-339.
- Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1325-1337.
- Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, Niles JL, Shah S, Bousvaros A, Ransil B, Wild G, Cohen A, Edwardes MD, Stevens AC. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001; 120: 13-20.
- Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB Edwardes MD, Shah S, Ransil B, Locke SE. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2203-2208.
- Bioque G, Bouma G, Crusius JB, Koutroubakis I, Kostense PJ, Meuwissen SG, Pena AS. Evidence of genetic heterogeneity in IBD: 1. The interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 105-110.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 2001; 21: 4668-4677.
- Bonner GF, Fakhri A, Vennamaneni SR. A long-term cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and disease activity in outpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 751-757.
- Bouma G, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Meijer BU, Hellemans HP, Hakvoort RJ, Schreuder GM, Kostense PJ, Meuwissen SG, Pena AS. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 294-300.
- Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades B. Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 268-278.

- Bradley PP, Priebat PA, Christensen RD, Rothstein GR. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-209.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339: 89-91.
- Breidt DS, Hwang PM, Glatt CE, Löwestein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718.
- Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker Smith JA, MacDonalds TT. Interleukin 2 and interferon gamma secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993; 78: 127.
- Bremner, J. Douglas, Southwick, Steven M, Charney, Dennis S. Animal models for the neurobiology of trauma. *PTSD Res Quart* 1999; 2: 1-7.
- Brittain T, Blackmore R, Greenwood C, Thomson AJ. Bacterial nitrite-reducing enzymes. *Eur J Biochem* 1992; 209: 793-802.
- Bru C, Sans M, Defelitto MM, Gilabert R, Fuster D, Llach J, Lomena F, Bordas JM, Pique JM, Panes J. Hydrocolonic sonography for evaluating inflammatory bowel disease. *AJR* 2001; 177: 99-105.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-347.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 219-229.
- Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1841-1854.
- Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48: 132-135.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017.
- Carroll BJ, Curtis GC, Mendels J. Neuroendocrine regulation in depression I. Limbic system-adrenocortical dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* 1976. 33:1039-1044.
- Casellas F, Guarner F. Eicosanoids in inflammatory bowel disease. Therapeutic implications. *Clin Immunother* 1996; 6: 333-340.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002; 99: 13926-13931.
- Chen YM, Qian ZM, Zhang J, Chang YZ, Duan XL. Distribution of constitutive nitric oxide synthase in the jejunum of adult rat. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 537-539.
- Chiarantini E, Valanzano R, Liotta AA, Cellai AP, Ilari I, Prisco D, Antonucci E, Tonelli F, Abbate R. Persistence of hemostatic alterations in patients affected by Crohn's disease after bowel surgery. *Thromb Res* 1997; 87: 539-546.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49: 497-505.
- Choi D, Kim SK, Choi SH, Ko YG, Ahn CW, Jang Y, Lim SK, Lee HC, Cha BS. Preventative effects of rosiglitazone on restenosis after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2654-2660.
- Chuah SY, Jayanthi V, Lee CN, McDonald B, Probert CS, Mayberry JF. Dietary fats and inflammatory bowel disease in Asians. *Ital J Gastroenterol* 1992; 24: 386-388.
- Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000; 68: 1542-1548.
- Cohen S, Williamson GM. Perceived stress in probability sample of the United States. In: Spacapan S, Oskamp S, eds. *The social psychology of health*. Newbury Park, CA: Sage, 1988: 31-67.
- Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, Weingarten HP. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology* 1996; 111: 1509-1515.
- Collins SM. Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G315-G318.
- Colon AL, Madrigal JL, Menchen LA, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC. Stress increases susceptibility to oxidative/nitrosative mucosal damage in an experimental model of colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1713-1721.

- Colon AL, Menchen LA, Hurtado O, De Cristobal J, Lizasoain I, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. Implication of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis. *Cytokine* 2001; 16: 220-226.
- Colon AL, Menchen L, Lizasoain I, Leza JC, Menchen P, Gonzalez-Lara V, Moro MA, Lorenzo P. Inducible nitric oxide synthase activity is expressed not only in inflamed but also in normal colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: a potential prognostic marker. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1371-1373.
- Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* 1998; 161: 978-984.
- Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 1998; 27: 397-404.
- Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, Paul WE, Meltzer MS. B-cell stimulatory factor 1 (interleukin-4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of antigens. *J Immunol* 1987; 139: 135.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP. Role of free radicals and poly(ADP-ribose) synthetase in intestinal tight junction permeability. *Mol Med* 2000; 6: 766-778.
- Das KM. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease. New insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1-13.
- Dayal Y, DeLellis RA. Colitis ulcerosa idiopática. En: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Eds. *Patología estructural y funcional*, 4ª edición. Madrid: McGraw-Hill - Interamericana, 1990: 934-937.
- de la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Lopez-Nava G, Martin E, Allcock RJ, Conejero L, Paredes JG, Diaz-Rubio M. Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology* 2000; 119: 1491-1495.
- de Leon MJ, Golomb J, George AE, Convit A, Tarshish CY, McRae T, De Santi S, Smith G, Ferris SH, Noz M. The radiologic prediction of Alzheimer disease: the atrophic hippocampal formation. *AJNR* 1993; 14: 897-906.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999a; 274: 32048-32054.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999b; 85: 394-402.
- Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 2006; 55: 655-661.
- Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB* 1991; 5: 2068-2077.
- Derogatis LR. SCL-90-R. Symptom checklist-90-R. administration, scoring, and procedures manual, 3rd ed. Minneapolis: National Computer Systems, 1994.
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193: 827-838.
- Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin-1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991; 12: 404.
- Dohrenwend BS, Krasnoff L, Askenasy AR, Dohrenwend BP. Exemplification of a method for scaling life events: the Peri Life Events Scale. *J Health Soc Behav* 1978; 19: 205-229.
- Domenech E. Tratamiento general del brote de colitis ulcerosa. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002: 135-141.
- Dom LD, Chrousos GP. The endocrinology of stress and stress system disorders in adolescence. *Endocrinol. Metab. Clin. N.Am* 1993; 22: 685-700.

- Drossman DA, Leserman J, Mitchell CM, Li ZM, Zagami EA, Patrick DL. Health status and health care use in persons with inflammatory bowel disease. A national sample. *Dig Dis Sci* 1991; 36:1746-1755.
- Du XX, Doerschuk CM, Orazi A, Willians DA. A bone marrow stromal-derived growth factor, interleukin 11, stimulates recovery of small intestinal mucosal cells after cytoablative therapy. *Blood* 1994; 83: 33.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-1073.
- Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 2002; 360: 1410-1418.
- Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1265-1276.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1265-1276.
- Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer-zum-Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur Immunol* 1996; 26: 934.
- Duffy LC, Zielezny MA, Marshall JR, Byers TE, Weiser MM, Phillips JF, Calkins BM, Ogra PL, Graham S. Relevance of major stress events as an indicator of disease activity prevalence in inflammatory bowel disease. *Behav Med* 1991; 17:101-110.
- Duffy LC, Zielezny MA, Marshall JR, Weiser MM, Phillips JF, Byers TE, Calkins BM, Graham S, Ogra PL. Lag time between stress events and risk of recurrent episodes of inflammatory bowel disease. *Epidemiology* 1991; 2: 141-145.
- Duncan C, Dougall H, Johnston P. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med* 1995; 1: 546-551.
- Dunn AJ, Ando T, Brown RF, Berg RD. HPA axis activation and neurochemical responses to bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 992: 21-29.
- Efrati E, Arsentiev-Rozenfeld J, Zelikovic I. The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell-specific expression and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F272-283.
- Elson CO. Genes, microbes, and T cells. New therapeutic targets in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 614-616.
- Engel GL. Studies of ulcerative colitis, V. Psychological aspects and their implications for treatment. *Am J Dig Dis* 1958; 3: 315-337.
- Eutamene H, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats. *J Physiol* 2003; 553: 959-966.
- Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 619-622.
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993; 54: 248-255.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 18779-18789.
- Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, Di Marco P, Boirivant M, Dianzani F, Torsoli A. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease: kinetics of in vitro response to interferon gamma inducer. *Gut* 1991; 32: 403.
- Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history and progression of ulcerative colitis. A long-term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1137-1146.
- Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical patterns and prognosis. *Gastroenterology* 1985; 88: 1818-1825.
- Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002; 359: 331-340.
- Fava GA, Pavan L. Large bowel disorders I. Illness configuration and life events. *Psychother Psychosom.* 1976; 27: 93-99.

- Feinstein DL. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol Ther* 2003; 5: 67-73.
- Feldman F, Cantor D, Soll S, Bachrach W. Psychiatric study of a consecutive series of 34 patients with ulcerative colitis. *Br Med J* 1967; 3: 14-17.
- Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, Gonzalez-Huix F, Riera J, Gonzalez-Lara V, Dominguez-Abascal F, Gine JJ, Moles J, Gomollon F, Gassull MA. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 427-433.
- Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 795-804.
- Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 4338-4344.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: aetiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995; 83: 803-812.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 16737-16740.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC. The anti-inflammatory prostaglandin 15d-PGJ2 decreases oxidative/nitrosative mediators in brain after acute stress in rats. *Psychopharmacology* 2005a; 180: 513-522.
- García-Bueno B, Madrigal JL, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Leza JC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry* 2005b; 57: 885-894.
- Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 309-315.
- García Rodríguez LA, Wallander MA, Johansson S, Olbe L. Detection of colorectal tumor and inflammatory bowel disease during follow-up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 306-311.
- Garrett VD, Brantley PJ, Jones GN, McKnight GT. The relation between daily stress and Crohn's disease. *J Behav Med* 1991; 14: 87-96.
- Geboes K, Riddell R, Ost A, Jensfelt B, Persson T, Lofberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 404-409.
- Giannadaki E, Potamianos S, Roussomoustakaki M, Kyriakou D, Fragkiadakis N, Manousos ON. Autoimmune hemolytic anemia and positive Coombs test associated with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1872-1874.
- Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rozen P. Inflammatory Bowel Disease in Jews. *Front Gastrointest Res* 1986; 11: 135-140.
- Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; 5: 698-701.
- Glassman MS, Newman LJ, Berezin S, Gryboski JD. Cow's milk protein sensitivity during infancy in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 838-840.
- Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37: 668-673.
- Godkin AJ, De Belder AJ, Villa L, Wong A, Beesley JE, Kane SP, Martin JF. Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 867-872.

- Goldman H. Interpretation of large intestinal mucosal biopsy specimens. *Hum Pathol* 1994; 25: 1150-1159.
- Gore RM, Balthazar EJ, Ghahremani GG, Miller FH. CT features of ulcerative colitis and Crohn's disease. *AJR* 1996; 167: 3-15.
- Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996; 334:1106-1115.
- Green BT, Lyte M, Kulkarni-Narla A, Brown DR. Neuromodulation of enteropathogen internalization in Peyer's patches from porcine jejunum. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 74-82.
- Greene BR, Blanchard EB, Wan CK. Long-term monitoring of psychosocial stress and symptomatology in inflammatory bowel disease. *Behav Res Ther.* 1994; 32: 217-226.
- Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 344: 859-861.
- Grisham MB, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions in inflammatory bowel disease. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999: 55-64.
- Grisham MB, Jour'd'heuil D, Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276 (Gastrointest Liver Physiol. 39): G315-G321.
- Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
- Grottrupwolffers E, Moeller J, Karbach U, Mullerlissner S, Endres S. Elevated cell associated levels of interleukin 1 beta and interleukin 6 in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 115-122.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742.
- Guhad FA, Hau J. Salivary IgA as a marker of social stress in rats. *Neurosci Lett* 1996; 216: 137-140.
- Gupta SK, Fitzgerald JF, Chong SK, Croffie JM, Garcia JG. Expression of inducible nitric oxide mRNA in inflamed esophageal and colonic mucosa in pediatric population. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 795-798.
- Gwee KA, Graham JC, McKendrick MW, Collins SM, Marshall JS, Read NW. Psychological scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhea. *Lancet* 1996; 347: 150-153.
- Gwee KA, Leong YL, Graham C, McKendrick MW, Collins SM, Walters SJ, Underwood JE, Read NW. The role of psychological and biological factors in post infective gut dysfunction. *Gut* 1999; 44: 400-406.
- Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004; 21: 261-270.
- Harries AD, Baird A, Rhodes J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J* 1982; 284: 706.
- Hata Y, Kawabe T, Hiraishi H, Ota S, Terano A, Ivey KJ. Hydrogen peroxide mediated cytotoxicity to cultured colonic epithelial cells. *Life Sci* 1997; 60: 2221-2230.
- Hawkey CJ, Dube LM, Rountree LB, Linnen PJ, Lancaster JF. A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 718-724.
- Heim C, Newport DJ, Heit S, Graham YP, Wilcox M, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* 2000; 284: 592-597.
- Heim C, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of early adverse life events in the etiology of depression and posttraumatic stress disorder. Focus on corticotropin-releasing factor. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 821: 194-207.
- Hendriksen C, Kreiner S, Binder V. Long term prognosis in ulcerative colitis--based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen. *Gut* 1985; 26: 158-163.
- Heneka MT, Feinstein DL, Galea E, Gleichmann M, Wullner U, Klockgether T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 156-168.
- Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; 7: 1124-1134.
- Hill HD, Straka JG. Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem* 1988; 170: 203-208.
- Hinson JP. Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medula?. *J Endocrinol* 1990; 124: 95-164.

- Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E₂ and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000a; 278: 790-796.
- Hinz B, Brune K, Pahl A. Prostaglandin E₂ up-regulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; 272: 744-748.
- Hislop IG. Onset setting in inflammatory bowel disease. *Med J Aust* 1974; 1: 981-984.
- Hofmann C. COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use. *Curr Med Chem* 2000; 7: 1113-1120.
- Holmes TH, Rahe RH. The Social Readjustment Rating Scale. *J Psychosom Res* 1967; 11: 213-218.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999; 400: 378-382.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- Hulten L, Lindhagen J, Lundgren O, Fasth S, Ahren C. Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1977; 72: 388-396.
- Hu Y, Cardounel A, Gursoy E, Anderson P, Kalimi M. Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone. Protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 753-762.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
- Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 1997; 272: 20108-20117.
- Ikeda I, Kasajima T, Ishiyama S, Shimojo T, Takeo Y, Nishikawa T, Kameoka S, Hiroe M, Mitsunaga A. Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1339-1341.
- Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2441-2446.
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000; 275: 28028-28032.
- Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 370-374.
- Isaacs KL, Sartor RB, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase reaction amplification. *Gastroenterology* 1992; 103: 1587-1595.
- Jantschek G, Zeitz M, Pritsch M, Wirsching M, Klor HU, Studt HH, Rasenack J, Deter HC, Riecken EO, Feiereis H, Keller W. Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1289-1296.
- Jayanthi V, Chuach SY, Probert CSJ, Mayberry M, Mayberry JF. Proctitis and Proctosigmoiditis- A need to identify the extend of disease in epidemiological surveys. *Digestion* 1993; 54: 61-64.
- Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, Theodossi A, Williams GT. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic ideopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J Clin Pathol* 1997; 50: 93-105.
- Jewel P. Ulcerative colitis. En: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, Eds. *Gastrointestinal and Liver Disease*, 6th edition. Philadelphia: WB Saunders, 1998:1735-1761.
- Joyce DA, Gimblett G, Steer JH. Targets of glucocorticoid action on TNF-alpha release by macrophages. *Inflamm Res* 2001; 50: 337-340.
- Junger WG, Cardoza TA, Liu FC, Hoyt DB, Goodwin R. Improved rapid photometric assay for qualitative measurement of PMN migration. *J Immunol Methods* 1993; 160: 73-79.
- Kam L, Pizarro TT, Cominelli F. Cytokines and chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1995; 11: 305-309.

- Katayama K, Wada K, Nakajima A, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nagai R, Kamisaki Y, Blumberg RS, Mayumi T. A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2003; 124: 1315-1324.
- Katz J. The course of inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1275-1280.
- Katz S. Update in medical therapy of ulcerative colitis: newer concepts and therapies. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 557-569.
- Kaplan JM, Cook JA, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Zingarelli B. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J₂ (15D-PGJ₂), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock. *Shock* 2005; 24: 59-65.
- Kappel M, Poulsen TD, Galbo H, Pedersen BK. Effects of elevated plasma noradrenaline concentration on the immune system in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998; 79: 93-98.
- Karltnnen R, Breese E, Walker Smith JA, MacDonald TT. Decreased mucosal interleukin-4 (IL-4) production in gut inflammation. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1015.
- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; 5: 104-112.
- Kennedy M, Denenberg AG, Szabó C, Salzman AL. Poly (ADP ribose) synthase activation mediates increased permeability induced by peroxynitrite in Caco-2Bbe cells. *Gastroenterology* 1998; 114: 510-518.
- Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P. Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* 1987; 93: 919-924.
- Kewenter J, Ahlman H, Hulten L. Cancer risk in extensive ulcerative colitis. *Ann Surg* 1978; 188: 824-828.
- Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiau JA, Groot JA, Perdue MH. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 1998; 275: G1037-1044.
- Kimmel PL, Peterson RA, Weihs KL, Simmens SJ, Boyle DH, Umana WO, Kovac JA, Alleyne S, Cruz I, Veis JH. Psychologic functioning, quality of life, and behavioral compliance in patients beginning hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 2152-2159.
- Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1998; 42: 180-187.
- King PA, Jamison E, Strahs D, Anderson VE, Brenowitz M. "Footprinting" proteins on DNA with peroxonitrous acid. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2473.
- Kinoshita M, Suzuki Y, Saito Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPARgamma activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 827-831.
- Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-819.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
- Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1042-1048.
- Koenigs KP, McPhedran P, Spiro HM. Thrombosis in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1987; 9: 627-631.
- Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998; 43: 56-63.
- Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inova M. Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver evidence for a role of superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992; 262: 6669-6676.
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; 51: 85-94.
- Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 171-176.

- Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992; 293: 391-400.
- Krawisz J, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350.
- Kubes P and McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000; 109: 150-158.
- Kubota Y, Petras RE, Ottaway CA, Tubbs RR, Farmer RG, Fiocchi C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1242-1251.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263.
- Kuhn CM, Schanberg SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16: 261-270.
- Kusugami K, Youngman KR, West GA, Fiocchi C. Intestinal immune reactivity to interleukin 2 differs among Crohn's disease, ulcerative colitis and control. *Gastroenterology* 1989; 97: 1-9.
- Kuzela L, Vavrecka A, Prikazska M, Drugda B, Hronec J, Senkova A, Drugdova M, Oltman M, Novotna T, Brezina M, Kratky A, Kristufek P. Pulmonary complications in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1714-1719.
- Lanholm E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: Analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994; 107: 3-11.
- Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 113-118.
- Larson SL, Owens PL, Ford D, Eaton W. Depressive Disorder, Dysthymia, and Risk of Stroke. *Stroke* 2001; 32: 1979-1983.
- Ledwith BJ, Pauley CJ, Wagner LK, Rokos CL, Alberts DW, Manam S. Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 3707-3714.
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1992; 267: 25934-25938.
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; 272: 3406-3410.
- Lehn M, Weisner WY, Engelhorn S, Gillis S, Remold HG. IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma. *J Immunol* 1989; 143: 3020.
- Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 1996; 271: 1764-1769.
- Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1994; 269: 24527-24530.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 170: 2-6.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1213-1220.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Luzi C. Psychological stress and disease activity in ulcerative colitis: a multidimensional cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1219-1225.
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Berto E, Luzi C, Andreoli A. Development of the Perceived Stress Questionnaire: a new tool for psychosomatic research. *J Psychosom Res* 1993; 37: 19-32.
- Levine JB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. En: Kirsner JB, Eds. *Inflammatory bowel disease*. Baltimore: Williams and Wilkins; 2000.
- Levine JB, Lukawski-Trubish D. Extraintestinal considerations in IBD. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 633-646.

- Lewis JD, Deren JJ, Lichtenstein GR. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 459-477.
- Lewis JD, Lichtenstein GR, Stein RB, Deren JJ, Judge TA, Fogt F, Furth EE, Demissie EJ, Hurd LB, Su CG, Keilbaugh SA, Lazar MA, Wu GD. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3323-3328.
- Lewis MC. Attributions and inflammatory bowel disease: patients' perceptions of illness causes and the effects of these perceptions on relationships. *American Association of Registered Nurse News Letter* 1988; 44: 16-17.
- Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW. The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1397-1403.
- Li FX, Sutherland LR. Assessing disease activity and disease activity indices for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4: 490-496.
- Li J, Norgard B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1129-1133.
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2078-2086.
- Lindberg E, Tysk C, Anderson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case-control study. *Gut* 1988; 29: 352-357.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BS. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 1996; 10: 1532-1538.
- Liu Z, Geboes K, Colpaert S, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, de Boer M, Boon L, D'Haens G, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J Immunol* 2000; 164: 6005-6014.
- López San Román A. Manifestaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002a:125-133.
- López San Román A. Tratamiento quirúrgico de la colitis ulcerosa. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002b:153-162.
- Lossos A, River Y, Eliakim A, Steiner I. Neurologic aspects of inflammatory bowel disease. *Neurology* 1995; 45: 416-421.
- Lundberg JON, Hellstrom PM, Lundberg JM, Alving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* 1994; 344: 1673-1674.
- Ma A, Datta M, Margosian E, Chen J, Horak I. T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med* 1995; 182: 1567.
- MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SL. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today* 1999; 20: 505-510.
- MacDonald TT, Murch SH. Etiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 1994; 8: 1-34.
- Madara JL, Trier JS, Neutra MR. Structural changes in the plasma membrane accompanying differentiation of epithelial cells in human and monkey small intestine. *Gastroenterology* 1980; 78: 963-975.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1579-1588.
- Madrigal JLM, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24: 420-429.
- Magariños AM, Verdugo García JM, McEwen BM. Chronic restraint stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14002-14008.
- Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1 β by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gut* 1989; 30: 835.
- Maldve RE, Kim Y, Muga SJ, Fischer SM. Prostaglandin E₂ regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J Lipid Res* 2000; 41: 873-881.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835-839.
- Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994; 106: 637-642.
- Mardini HE, Kip KE, Wilson JW. Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 492-497.
- Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1988; 1: 249-257.
- Márquez LA, Dunford HB, Wart HV. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; 265: 5666-5570.
- Martínez-Salmeron JF, Rodrigo M, de Teresa J, Nogueras F, Garcia-Montero M, de Sola C, Salmeron J, Caballero M. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the province of Granada, Spain: a retrospective study from 1979 to 1988. *Gut* 1993; 34: 1207-1209.
- Martínez V, Wang L, Rivier J, Grigoriadis D, Tache Y. Central CRF, urocortins and stress increase colonic transit via CRF1 receptors while activation of CRF2 receptors delays gastric transit in mice. *J Physiol* 2004; 556: 221-34.
- Markwell MAK, Fox CF. Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3-diphenylglycoluril. *Biochemistry* 1978; 17: 4807.
- Maté Jiménez J, Pajares García JM, Ruiz Aladros E. Epidemiología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: sexo, edad, raza, herencia y genética. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86: 606-611.
- Matilla A, Escudero M, de la Cruz G, González-Lara V. Papel de los aminosalicilatos en la enfermedad inflamatoria intestinal. En, V González Lara, Ed. Tratamiento médico en el año 2000. *Enfermedad inflamatoria intestinal*. Madrid; Ediciones. Ergon, 2001: 25-61.
- Maunder RG, Lancee WJ, Greenberg GR, Hunter JJ, Fernandes BJ. Insecure attachment in a subgroup with ulcerative colitis defined by ANCA status. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2127-2132.
- Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1481-1491.
- May M, McCarron P, Stansfeld S, Ben-Shlomo Y, Gallacher J, Yarnell J, Smith GD, Elwood P, Ebrahim S. Does Psychological Distress Predict the Risk of Ischemic Attack?. *Stroke* 2002; 33: 7-12.
- Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of crohn's disease: a review of the literature. *Gut* 1984; 25: 886-899.
- Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861-869.
- Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1990; 86: 1255-1260.
- Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C. Expression of interleukin 8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144: 997.
- McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1245-1250.
- McGovern DP, Van Heel DA, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP. Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1465-1466.
- McKay DM. Bacterial superantigens: provocateurs of gut dysfunction and inflammation?. *Trends Immunol* 2001; 22: 497-501.
- McLaughlan JM, Seth R, Vautier G, Robins RA, Scott BB, Hawkey CJ, Jenkins D. Interleukin-8 and inducible nitric oxide synthase mRNA levels in inflammatory bowel disease at first presentation. *J Pathol* 1997; 181: 87-92.
- Mc Naughton WK, Cushing K. Role of constitutive cyclooxygenase-2 in prostaglandin-dependent secretion in mouse colon in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 593-544.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 8328-8334.
- Meddings JB, Swain MG. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 2000; 119: 1019-1028.
- Menchen L, Colon AL, Madrigal JL, Beltran L, Botella S, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Menchen P, Cos E, Lorenzo P. Activity of inducible and neuronal nitric oxide synthases in colonic mucosa predicts progression of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1756-1764.

- Menchen LA, Colon AL, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Menchen P, Alvarez E, Lorenzo P. N-(3-(Aminomethyl)benzyl)acetamide, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, decreases colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Life Sci* 2001; 69: 479-491.
- Meucci G, Vecchi M, Torgano G, Arrigoni M, Prada A, Rocca F, Curzio M, Pera A, de Franchis R. Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD Study Group). *Gastroenterology* 1992; 103: 514-519.
- Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341: 465-466.
- Mifflin RC, Saada JI, Di Mari JF, Adegboyega PA, Valentich JD, Powell DW. Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C824-834.
- Milde AM, Enger O, Murison R. The effects of postnatal maternal separation on stress responsivity and experimentally induced colitis in adult rats. *Physiol Behav* 2004; 81: 71-84.
- Milde AM, Murison R. A study of the effects of restraint stress on colitis induced by dextran sulphate sodium in singly housed rats. *Integr Physiol Behav Sci* 2002; 37: 140-150.
- Milne B, Joachim G, Niedhardt J. A stress management programme for inflammatory bowel disease patients. *J Adv Nurs* 1986; 11: 561-567.
- Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Creminon C, Levi G. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in cultured microglia by prostaglandin E₂, cyclic AMP and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 934-940.
- Mínguez Pérez M, Benagues Martínez A, Mora Miguel F. Megacolon tóxico y colitis fulminante. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002:169-175.
- Mitchell CM, Drossman DA. Survey of the AGA membership relating to patients with functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 1987; 92: 1282-1284.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 432.
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, Xavier RJ, Terhorst C, Podolsky DK, Bhan AK. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 134-144.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2495-2501.
- Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Monnikes I. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2001; 19: 201-211.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 1997; 385: 733-736.
- Mourad FH, Turvill JL, Farthing MJG. Role of nitric oxide in intestinal water and electrolyte transport. *Gut* 1999; 44: 143-147.
- Mourelle M, Casellas F, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, Malagelada JR. Induction of nitric oxide synthase in colonic smooth muscle from patients with toxic megacolon. *Gastroenterology* 1995; 109: 1497-1502.
- Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausning K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR Jr. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1425-1433.
- Muller-Decker K, Albert C, Lukanov T, Winde G, Marks F, Furstenberger G. Cellular location of cyclo-oxygenase isozymes in Crohn's disease and colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 212-218.

- Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993; 34: 1705-1709.
- Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32: 913-917.
- Musch MW, Chang EB. Diarrhea inflammatory bowel diseases. En: Targan SR, Shanahan E, Eds. *Inflammatory bowel disease: From Bench to Bedside*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994: 239-254.
- Nagase S, Takemura K, Ueda A. A novel non-enzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 150-153.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998; 93: 229-240.
- Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 853-859.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78: 915-918.
- Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43: 856-860.
- Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W, Kollias G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1743-1750.
- Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 (Suppl 216): 149-159.
- Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 359-367.
- Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1621-1628.
- North CS, Alpers DH, Helzer JE, Spitznagel EL, Clouse RE. Do life events or depression exacerbate inflammatory bowel disease? A prospective study. *Ann Intern Med* 1991; 114: 381-386.
- Nos P, Hinojosa J. Criterios diagnósticos y clínicos en la Enfermedad de Crohn. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002: 209-217.
- Nos P, Hinojosa J. Valoración de la gravedad clínica y de la actividad inflamatoria. En: *Conductas de actuación en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal*, 3ª edición. Nos P, Hinojosa J, Eds. Adalia Farma; 2003.
- Obrador A, Riera J. Cáncer y Enfermedad inflamatoria intestinal. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002: 335-349.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201:167-180.
- Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 2000; 74: 785-791.
- OMGE Research Committee Team. Definitions and descriptions of inflammatory bowel disease. En: *Inflammatory Bowel Disease, Second Edition*. Dombal FT, Myren J, Bouchier IAD, Watkinson G, Softley A, Eds. Oxford: University Press; 1993.
- Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I, Suda T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol* 1996; 156: 758-764.
- Orchard TR, Wordsworth BP, Jewell DP. Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut* 1998; 42: 387-391.
- Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075-1081.
- Oudkerk Pool M, Bouma G, Visser JJ, Kolkman JJ, Tran DD, Meuwissen SG, Pena AS. Serum nitrate levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 784-788.

- Paar GH, Bezenberger U, Lorenz-Meyer H. The correlation of psychosocial stress and disease activity in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 1988; 26: 648-657.
- Pace F, Molteni P, Bollani S, Sarzi-Puttini P, Stockbrugger R, Porro GB, Drossman DA. Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1031-1038.
- Pajares JM, Gisbert JP. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en España. Una revisión sistemática. *Rev Esp Enferm Dig.* 2001; 93:9-20.
- Pajares García JM, Rodríguez Muñoz S, Maté Jiménez J. Prevalencia de la Enfermedad de Crohn en la zona central de España. Estudio Epidemiológico Cooperativo de la Asociación Castellana de Aparato Digestivo. *Rev Esp Enferm Dig* 1987; 71: 313-317.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
- Palmer RM, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1992; 105:11-12.
- Palmer RM, Feffige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activities of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
- Panés J. Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 159-165.
- Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Immunol* 2003; 170: 1043-1051.
- Papadakis KA, Targan SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 283-296.
- Papo M, Quer JC, Gutierrez C, Broch M, Casellas F, Pastor RM, Olona M, Richart C. Genetic heterogeneity within ulcerative colitis determined by an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 413-420.
- Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000; 101: 235-238.
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of inflammatory bowel disease by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *J Biol Chem* 1995; 270: 14214-14219.
- Peng Y, Liu H, Liu F, Wang H, Liu Y, Duan S. Inhibitory effect of PPAR-gamma activator on IL-6 and mPGES protein expression in PBMC induced by homocysteine. *Hemodial Int* 2005; 9 (Suppl 1): S15-20.
- Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A, Alonso-Escolano D, Bosca L, Vivancos J, Nombela F, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005a; 64: 797-805.
- Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A, Bosca L, Castillo J, Davalos A, Vivancos J, Serena J, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005b; 1: 1-12.
- Pérez-Miaranda M, Pajares JM, Maté J. Role of Tonsilectomy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106: A751.
- Persson PG, Leijonmarck CE, Bernell O, Hellers G, Ahlbom A. Risk indicators for inflammatory bowel disease. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 268-272.
- Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4668-4673.
- Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, McCracken JT, Chang L, Ernst T. Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by -sup-1H MRS are reduced in adult rats subjected to perinatal stress: Preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiat Res* 1999; 33: 41-51.
- Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2002; 277: 13029-13036.
- Porcelli P, Leoci C, Guerra V. A prospective study of the relationship between disease activity and psychologic distress in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31: 792-796.

- Porcelli P, Zaka S, Centonze S, Sisto G. Psychological distress and levels of disease activity in inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol* 1994; 26: 111-115.
- Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. A comparison of oral prednisolone given as single or multiple daily doses for active proctocolitis. *Scand J Gastroenterol* 1978; 13: 833-837.
- Present DH, Banks PA. The role of pANCA and ASCA in differentiating ulcerative colitis, Crohn's disease, and indeterminate colitis. *Inflam Bowel Dis* 1999; 5: 66-67.
- Probert CS, Bhakta P, Bhamra B, Jayanthi V, Mayberry JF. Diet of South Asians with inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol* 1996a; 33: 132-135.
- Probert CS, Chott A, Turner JR, Saubermann LJ, Stevens AC, Bodinaku K, Elson CO, Balk SP, Blumberg RS. Persistent clonal expansion of peripheral blood CD4+ lymphocytes in chronic inflammatory bowel disease. *J Immunol* 1996b; 157: 3183-3191.
- Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 811-815.
- Quinn PG, Binion DG, Connors PJ. The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1331-1352.
- Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999; 5: 1178-1182.
- Raab Y, Sundberg C, Hallgren R, Knutson L, Gerdin B. Mucosal synthesis and release of prostaglandin E2 from activated eosinophils and macrophages in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 614-620.
- Rachmilewitz D. Coated mesalazine versus sulphasalazine in the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Br Med J* 1989; 298: 82-86.
- Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995; 36: 718-723.
- Radford-Smith D, Jewell DP. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1996; 10: 151-164.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991a; 266: 4244.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991b; 288: 481.
- Raithel M, Matek , Baenkler HW, Jorde W, Hahn EG. Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108: 127-133.
- Raithel M, Schneider HT, Hahn EG. Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 496-503.
- Rao SS, Hatfield RA, Suls JM, Chamberlain MJ. Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 985-990.
- Ray A, Sehgal PB. Cytokines and their receptors: molecular mechanism of interleukin-6 gene repression by glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2 (Suppl 12): S214-221.
- Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 1993; 329: 1246-53.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16: 144-150.
- Rees DD, Cunha FQ, Assreoy J, Herman AG, Moncada S. Sequential induction of nitric oxide synthase by *C. parvum* in different organs of the mouse. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 689-693.
- Reynolds PD, Middleton SJ, Hansford GM, Hunter JO. Confirmation of nitric oxide synthesis in active ulcerative colitis by infra red diode laser spectroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 463-466.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferators-activate receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82.
- Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Lucas S. Why do patients with ulcerative colitis relapse?. *Gut* 1990; 31:179-183.
- Rits M, Hiemstra PS, Bazin H, Van Es LA, Vaerman JP, Daha MR. Activation of rat complement by soluble and insoluble rat IgA immune complexes. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1873-1880.
- Robertson DA, Ray J, Diamond I, Edwards JG. Personality profile and affective state of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1989; 30: 623-626.

- Rodrigo L, Riestra S, Nino P, Cadahia V, Tojo R, Fuentes D, Moreno M, Gonzalez Ballina E, Fernandez E. Incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en población general en el área de Oviedo. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 296-305.
- Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389.
- Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestión* 1997; 58: 176-180.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 2000; 403: 103-108.
- Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 1845-1853.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers W, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *NEJM* 2005; 353: 2462-2476.
- Ruiz V. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en España. ¿Presenta características que la diferencian de los países anglosajones?. *Controversias en la enfermedad inflamatoria intestinal*. J Hinojosa del Val y F Díaz de Rojas Eds, 1998; Cap 1:1-13.
- Rusell MG, Stockburger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 417-427.
- Sakai M, Matsushima-Hibiya Y, Nishizawa M, Nishi S. Suppression of rat glutathione transferase P expression by peroxisome proliferators: interaction between Jun and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res* 1995; 55: 5370-5376.
- Salem SN, Shubair KS. Non-specific ulcerative colitis in Bedouin Arabs. *Lancet* 1967; 1: 473-475.
- Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 1991; 291: 145-149.
- Sanchez-Hidalgo M, Martin AR, Villegas I, Alarcon De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1733-1744.
- Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 423-433.
- Sandler RS, Sandler DP, McDonnell CW, Wurzelmann JI. Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 603-608.
- Sandoval M, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells is attenuated by mesalamine. *Gastroenterology* 1997; 113: 1480-1488.
- Sans Cuffí M, Panés Díaz J. Criterios diagnósticos y clínica de la colitis ulcerosa. En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002: 99-109.
- Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G847-854.
- Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 1998; 114: 640-648.
- Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* 1999; 277: G391-399.
- Sapolsky RM. *Why Zebras Don't Get Ulcers*. WH Freeman & Co. New York; 1998.
- Sarason IG, Levine HM, Basham RB, Sarason BR. Assessing social support: The social support questionnaire. *J Pers Soc Psychol* 1983; 44: 127-139.
- Saro Gismera C, Riestra Menendez S, Sanchez Fernandez R, Milla Crespo A, Lacort Fernandez M, Arguelles Fernandez G, Chobak Z, Florido Mancheno JI, Anton Magarzo JL, Altadill Arregui A, Vizoso F, Pineda Garcia E, Fernandez de Ocariz Archs E, Albert Colomer J, Garcia Perez J, Lopez Rivas L, Lombrana JL. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica en cinco áreas de Asturias. España. *An Med Interna* 2003; 20: 232-238.

- Saro Gismera C, Ruiz Ochoa V. Epidemiología y factores de riesgo de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: En: MA Gasull, F Gomollón, A Obrador, J Hinojosa, Eds. *Enfermedad inflamatoria intestinal.*, 2ª edición. Madrid: Ediciones Ergón, 2002: 7-19.
- Sartor RB, DeLa Cadena RA, Green KD, Stadnicki A, Davis SW, Schwab JH, Adam AA, Raymond P, Colman RW. Selective kallikrein-kinin system activation in inbred rats differentially susceptible to granulomatous enterocolitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1467-1481.
- Sartor RB, Powell DW. Mechanisms of diarrhea in intestinal inflammation and hypersensitivity: Immune system modulation of intestinal transport. En: Fields M, Eds. *Controversies in Gastroenterology: Diarrheal Diseases*. New York: Elsevier Science; 1991: 75-114.
- Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995; 57: 2049-2055.
- Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsuhashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 330-339.
- Saunders PR, Hanssen NP, Perdue MH. Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol* 1997; 273: G486-490.
- Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* 1994; 267: G794-799.
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 202-210.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.
- Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1434.
- Schmidt C, Fels T, Baumeister B, Vetter H. The effect of 5-aminosalicylate and paraaminosalicylate on the synthesis of prostaglandin E2 and leucotriene B4 in isolated colonic mucosal cells. *Curr Med Res Opin* 1996; 13: 417-425.
- Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.
- Scholmerich J, Schmidt E, Schumichen C, Billmann P, Schmidt H, Gerok W. Scintigraphic assessment of bowel involvement and disease activity in Crohn's disease using technetium 99m-hexamethyl propylene amine oxine as leukocyte label. *Gastroenterology* 1988; 95: 1287-1293.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302: 93-109.
- Schroder O, Yudina Y, Sabirsh A, Zahn N, Haeggstrom JZ, Stein J. 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits expression of microsomal prostaglandin E synthase type 2 in colon cancer cells. *J Lipid Res* 2006; En prensa.
- Schulte-Bockholt A, Fink JG, Meier DA, Otterson MF, Telford GL, Hopp K, Koch TR. Expression of messenger RNA for vasoactive intestinal peptide in normal human colon and during inflammation. *Mol Cell Biochem* 1995; 142: 1-7.
- Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 318-332.
- Schwarz SP, Blanchard EB. Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease. *Behav Res Ther* 1991; 29: 167-177.
- Scotinotis I, Rubesin SE, Ginsberg GG. Imaging modalities in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 391-421
- Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumor cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 933-937.
- Seitz R, Lerch L, Immel A, Egbring R. D-dimer tests detect both plasmin and neutrophil elastase derived split products. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 193-195.
- Selby WS, Janossy G, Mason DY, Jewell DP. Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1983; 53: 614-618.
- Selye H. *The Stress of Life*. McGraw-Hill. New York; 1956.
- Seo M, Okada M, Maeda K, Oh K. Correlation between endoscopic severity and the clinical activity index in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2124-2129.

- Seo M, Okada M, Yao T, Okabe N, Maeda K, Oh K. Evaluation of disease activity in patients with moderately active ulcerative colitis: comparisons between a new activity index and Truelove and Witts' classification. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1759-1763.
- Seo M, Okada M, Yao T, Ueki M, Arima S, Okumura M. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 971-976.
- Sewitch MJ, Abrahamowicz M, Bitton A, Daly D, Wild GE, Cohen A, Katz S, Szego PL, Dobkin PL. Psychological distress, social support, and disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1470-1479.
- Shanahan F. Pathogenesis of ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 342: 407-411.
- Sheth SG, LaMont JT. Toxic megacolon. *Lancet* 1998; 351: 509-513.
- Shetty A, Kalantzis C, Polymeros D. Hypnotherapy for inflammatory bowel disease. A randomised, placebo-controlled trial. *Gut* 2004; 53(suppl 6):A226.
- Shibata T, Kondo K, Osawa T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* 2002; 277: 10459-10466.
- Silverberg M, Satsangi J, Ahmad T, Arnott I, Bernstein Ch, Brandt SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewel DP, Karban A, Loftus EV, Salvador Peña A, Ridell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan S, Vermeire S, Warren BF. Toward and integrated clinical, molecular, and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 (Suppl A): 5A-36A.
- Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 871-885.
- Snyder SH, Brecht DS. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 125-128.
- Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C, Sjødahl R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 2002a; 50: 307-313.
- Söderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002b; 123: 1099-1108.
- Söderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, MacQueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002c; 283: G1257-1263.
- Spiller RC. Effects of serotonin on intestinal secretion and motility. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 99-103.
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1920-1929.
- Stadnicki A, DeLa Cadena RA, Sartor RB, Bender D, Kettner CA, Rath HC, Adam A, Colman RW. Selective plasma kallikrein inhibitor attenuates acute intestinal inflammation in lewis rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 912-920.
- Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebreton M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998; 393: 790-793.
- Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 1988; 157: 1032-1038.
- Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401.
- Storer PD, Xu J, Chavis J, Drew PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 161: 113-122.
- Stout C, Snyder RL. Ulcerative colitis-like lesion in Siamang gibbons. *Gastroenterology* 1969; 57: 256-261.
- Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 16-26.

- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4844-4849.
- Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol relat areas Mol Bio* 1992; 65: 287-346.
- Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104: 383-389.
- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 2001; 276: 12440-12448.
- Sullivan AJ. Psychogenic factors in ulcerative colitis. *Am J Digest Dis Nutr* 1936; 2: 651-656.
- Sutherland LLR. Clinical course and complications of ulcerative colitis and ulcerative proctitis. En: Targan SR, Shanatan F, Eds. *Inflammatory bowel disease from bench to bedside*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1993: 279-295.
- Szigethy E, Whitton SW, Levy-Warren A, DeMaso DR, Weisz J, Beardslee WR. Cognitive-behavioral therapy for depression in adolescents with inflammatory bowel disease: a pilot study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; 43: 1469-1477.
- Tache Y, Martinez V, Million M, Wang L. Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G173-177.
- Takagi T, Naito Y, Tomatsuri N, Handa O, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Pioglitazone, a PPAR-gamma ligand, provides protection from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice in association with inhibition of the NF-kappaB-cytokine cascade. *Redox Rep* 2002; 7: 283-289.
- Tamai H, Gaginella TS. Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon. *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 229-239.
- Tanaka T, Itoh H, Doi K, Fukunaga Y, Hosoda K, Shintani M, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Sawada N, Saito T, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nakao K. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* 1999; 42: 702-710.
- Tannenbaum SR, Weissman M, Fett B. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 1976; 14: 549-552.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180: 2359-2364.
- Telner JJ, Singhal RL. Psychiatric progress. The learned helplessness model of depression. *J Psychiatr Res* 1984; 18: 207-215.
- Tepperman BL, Brown FJ, Whittle BJ. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 1993; 265: G214-218.
- Terragno NA, Terragno A. Farmacología de los eicosanoides. En: P Lorenzo, A Moreno, JC Leza, L Lizasoain, MA Moro, Eds. *Velazquez, Farmacología Básica y clínica., 17ª edición*. Madrid: Editorial Panamericana, 2004: 501-511.
- Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 15-22.
- Tocchi A, Lepre L, Liotta G, Mazzoni G, Costa G, Taborra L, Miccini M. Familial and psychological risk factors of ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 395-398.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004; 112: 85-91.
- Truelove SC, Richards WCD. Biopsy studies in ulcerative colitis. *Br Med J* 1956; 1: 1315-1318.
- Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048.
- Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42: 71-104.
- Turnbull GK, Vallis TM. Quality of life in inflammatory bowel disease: the interaction of disease activity with psychosocial function. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1450-1454.

- Ueki T, Mizuno M, Uesu T, Kiso T, Nasu J, Inaba T, Kihara Y, Matsuoka Y, Okada H, Fujita T, Tsuji T. Distribution of activated complement, C3b, and its degraded fragments, iC3b/C3dg, in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 286-292.
- Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1246-1257.
- Uribe A. Indomethacin accelerates clearance of labeled cells and increases DNA synthesis in gastrointestinal mucosa of the rat. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 403-408.
- Van der PT, Lowry SF. Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 beta production: roles of tumor necrosis factor-alpha and IL-10. *Am J Physiol* 1997; 273: R1885-1890.
- van Deventer SJH. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997; 40: 443-448.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232-235
- Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JI, Vidrich A, Targan SR. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; 110: 1810-1819.
- Velin AK, Ericson AC, Braaf Y, Wallon C, Soderholm JD. Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* 2004; 53: 494-500.
- von Wietersheim J, Kohler T, Feiereis H. Relapse-precipitating life events and feelings in patients with inflammatory bowel disease. *Psychother Psychosom* 1992; 58: 103-112.
- Walker EF, Diforio D. A neural diathesis-stress model. *Psychological Review* 1997; 104: 667-685.
- Wallace JL, Miller MJS. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; 119: 512-520.
- Wang D, Mann JR, Dubois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2005; 128: 1445-1461.
- Wang SX, Wu WC. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2016-2021.
- Weymer A, Huott P, Liu W, McRoberts JA, Dharmasathaphorn K. Chloride secretory mechanism induced by prostaglandin E1 in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 1985; 76: 1828-1836.
- Whitehead WE. Psychosocial aspects of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 21-34.
- Whittle BJR. Nitric oxide. A mediator of inflammation or mucosal defense. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1026-1032.
- Whittle BJR, Laszlo F, Evans SM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indometacin. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2286-2290.
- Wilson LM, Baldwin AL. Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation* 1999; 6: 189-198.
- Wira CR, Sandoe CP, Steele MG. Glucocorticoid regulation of the humoral immune system. I. In vivo effects of dexamethasone on IgA and IgG in serum and at mucosal surfaces. *J Immunol* 1990; 144: 142-146.
- Vittoria A, Costagliola A, Carrese E, Mayer B, Cecio A. Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin. *Arch Histol Cytol* 2000; 63: 357-368.
- Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Stonerook MJ, Caniano DA, Mutabagani KH, Lhotak S, Sharma HM. Evidence that colitis is initiated by environmental stress and sustained by fecal factors in the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Dig Dis Sci*. 2000; 45: 385-393.
- Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 1873-1877.
- Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4128-4136.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2692-2696.
- Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 2002; 17: 139-145.
- Yang VW. Eicosanoids and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 317-332.

- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000; 275: 4541-4544.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371-386.
- Yamamoto H, Morise K, Kusugami K, Furusawa A, Konagaya T, Nishio Y, Kaneko H, Uchida K, Nagai H, Mitsuma T, Nagura H. Abnormal neuropeptide concentrations in rectal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996; 31: 525-532.
- Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 888-894.
- Yue G, Sun FF, Dunn C, Yin K, Wong PYK. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276: 265-270.
- Zhou YC, Waxman DJ. Cross-talk between janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) signaling pathways. Growth hormone inhibition of ppar- α transcriptional activity mediated by stat5b. *J Biol Chem* 1999; 274: 2672-2681.
- Zhu L, Gunn C, Beckman JS. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 452.
- Zingarelli B, Cuzzocrea S, Szabo C, Salzman A. Mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 1048-1055.