

Patogenia e inmunoterapia de la enfermedad inflamatoria intestinal: lecciones de los modelos animales

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal actúa no sólo como un órgano de absorción de nutrientes, sino también como barrera para agentes patógenos. Una consecuencia directa de esta función fisiológica es la presencia de una compleja red de interacciones inmunes, que proporcionan un balance de la respuesta inmunológica finamente regulado. Los antígenos externos, como los de la dieta o las bacterias entéricas, están sujetos a tolerancia inmune, de forma que estos antígenos no dan lugar a la aparición de reacciones inmunes exageradas que provoquen una lesión orgánica. Se supone que diversas alteraciones en esta tolerancia inmune son la causa de la colitis ulcerosa (CU) y de la enfermedad de Crohn (EC), pero los mecanismos patogénicos de estas enfermedades siguen siendo todavía desconocidos. La falta de modelos experimentales adecuados para el estudio de la inflamación intestinal ha sido una de las razones que ha dificultado la comprensión de estos mecanismos. Sin embargo, en la última década se ha producido una proliferación de nuevos modelos experimentales de inflamación intestinal crónica, la mayoría en el ratón, que ha despertado un notable interés entre los investigadores de este tipo de patología. En combinación con los avances producidos en la biología celular y molecular, la genética y la inmunología, estos modelos experimentales nos están ayudando a comprender distintos aspectos de la patogenia. En conjunto, los conocimientos derivados de estos modelos apoyan la hipótesis de que la inflamación intestinal, y las complicaciones sistémicas asociadas, son el resultado de una respuesta inmune exagerada a antígenos bacterianos normalmente presentes, mediada por linfocitos T CD4⁺ y macrófagos. Los factores predisponentes serían de origen genético y condicionarían una alteración en la

TABLA I. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Espontáneos	
	Tití de cabeza algodón
	<i>CeH-HeJBir</i>
	<i>SAMP1/Yit</i>
Inducidos	
1. Agentes exógenos	
Enema	
Ácido acético	
Ácido trinitrobenenosulfónico (TNBS)	
Formol/complejos inmunes	
Oxazolona	
Oral	
Indometacina	
Carragenina	
Sulfato dextrano sódico (DSS)	
Subcutáneo	
Cicospolina A	
Intramural (colónico)	
Peptidoglicano/polisacárido (PG/PS)	
2. Manipulación genética	
<i>Knockout</i>	
IL-2 ^{-/-}	
IL-10 ^{-/-}	
STAT3 ^{-/-}	
CRFB4 ^{-/-}	
TNFΔARE	
<i>Goi2</i> ^{-/-}	
TCRα ^{-/-}	
Transgénicos	
IL-7	
STAT4	
HLA-B27	
3. Transferencia de células a animales inmunodeficientes	
CD45RB ^{hi} a SCID o Rag ^{-/-}	
Médula ósea a Tgτ2	
Células T CD8 ⁺ específicas para hsp60	

regulación de la respuesta inmune y de la permeabilidad intestinal, cuyo inicio está desencadenado por factores ambientales. Estos modelos están siendo útiles también para probar nuevas aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de la inflamación intestinal. Sin embargo, sería prudente moderar el entusiasmo generado por la investigación desarrollada a partir de estos modelos, ya que desconocemos hasta qué punto reflejan fielmente las alteraciones que se producen en la enfermedad inflamatoria intestinal humana.

Correspondencia: Dr. J. Panés.
Servei de Gastroenterologia. Hospital Clínic de Barcelona.
Villarreal, 170. 08036 Barcelona. España.

LOS MODELOS

Como se resume en la tabla I, los modelos experimentales de inflamación intestinal pueden clasificarse en 4 categorías principales: modelos de colitis espontáneas, modelos de colitis inducida en ratones con un sistema inmune normal, modelos de reconstitución (*adoptive transfer*) en animales inmunodeficientes, y modelos con manipulación genética (*knockout* [KO] o transgénicos)¹. Estos modelos han conllevado una rápida progresión en nuestra comprensión de la inmunopatología intestinal, con cerca de 20 nuevos modelos de inflamación intestinal aparecidos en los últimos 10 años. La mayoría de estos modelos pertenece a los grupos de reconstitución de animales inmunodeficientes y a modelos manipulados genéticamente. La génesis de estos modelos ha sido posible por los progresos en las técnicas de manipulación genética. Un buen número de los modelos más utilizados para el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal no fue creado inicialmente con este propósito, pero se observó que determinados cambios genéticos y/o inmunes se asociaban con la aparición de inflamación intestinal crónica, lo que ha supuesto un considerable avance en el conocimiento del papel que determinadas poblaciones celulares desempeñan en la patogenia de la inflamación intestinal. Algunos de estos modelos, incluidos los que se han desarrollado más recientemente, se discuten en esta revisión.

MODELOS ESPONTÁNEOS

Este grupo incluye modelos muy atractivos para el estudio de factores genéticos y desencadenantes de la enfermedad inflamatoria intestinal, ya que aparece sin manipulaciones exógenas, al igual que ocurre en la enfermedad inflamatoria humana. Dentro de este grupo se han caracterizado 3 modelos:

Tití de cabeza de algodón

Los titís de cabeza de algodón mantenidos en cautividad en climas templados desarrollan una colitis recurrente a partir del segundo año de vida. Cuando los animales envejecen tienen una alta incidencia de adenocarcinoma de colon, que es una causa de muerte frecuente. Cuando la enfermedad está establecida, la totalidad del colon presenta una inflamación de tipo crónico, sobre la que pueden superponerse fenómenos de inflamación aguda, entre los que se incluyen la infiltración por neutrófilos, los abscesos de cripta, la depleción de mucina y las úlceras².

La patogenia es desconocida; probablemente es multifactorial y dependiente de factores genéticos y ambientales. La susceptibilidad genética viene apoyada por la ausencia de colitis entre otros titís mantenidos

en cautividad. No se han aislado patógenos específicos asociados con el desarrollo de colitis. Como factores ambientales se han sugerido el estrés derivado de la temperatura fría y la cautividad, ya que los titís de cabeza de algodón mantenidos en su medio natural en Colombia no desarrollan colitis¹.

Este modelo tiene una serie de ventajas. El curso de la enfermedad, que aparece de forma espontánea y presenta brotes de exacerbaciones y remisiones, junto a la secuencia de colitis crónica sobre la que aparece displasia y cáncer normalmente tras 5-8 años, remeda lo que ocurre en la enfermedad humana. Las desventajas incluyen la limitada disponibilidad de estos animales, las restricciones legales, al tratarse de una especie en peligro de extinción, y el elevado coste del modelo.

CH3/HeJBir

Esta cepa de ratones desarrolla colitis de forma espontánea, localizada principalmente en el ciego y el colon derecho hacia la tercera o cuarta semana de vida. La enfermedad suele ser leve y tiende a la curación cuando los animales alcanzan las 10-12 semanas de vida³. Histológicamente, se manifiesta como una inflamación con componentes agudo y crónico, ulceración, abscesos de cripta y regeneración epitelial. Las lesiones se localizan predominantemente en la mucosa, aunque puede haber edema en la submucosa. Se ha detectado un aumento de los valores de interferón (IFN)- γ y de interleucina (IL)-12 en los linfocitos de la lamina propia, lo que sugiere que la colitis en este modelo es una respuesta Th1⁴. Estos animales son muy susceptibles a otras formas de colitis inducidas por agentes químicos, entre los que se incluyen TNBS y DSS. El inicio de la enfermedad coincide con la colonización bacteriana del tracto intestinal, y estos animales presentan con una elevada frecuencia anticuerpos contra antígenos de la flora bacteriana normal.

Las ventajas de este modelo incluyen la naturaleza espontánea de la inflamación; la principal desventaja es el desconocimiento de la patogenia de las lesiones. De cualquier forma, este modelo es útil para estudiar las posibles interacciones entre la flora bacteriana y el sistema inmune intestinal.

SAMP1/Yit

Este modelo se desarrolló tras cruzamientos repetidos entre hermanos de ratones con senescencia acelerada (SAM). Los ratones resultantes (SAMP1/Yit) desarrollan ileítis hacia las 20 semanas de edad, que alcanza una penetrancia del 100% hacia las 30 semanas⁵. Las características histológicas de este modelo

remedan la ileítis de Crohn humana, con una inflamación transmural, presencia de granulomas y alteración en la arquitectura epitelial. Al igual que ocurre en otros modelos de enfermedad inflamatoria intestinal, la ileítis puede transferirse de forma adoptiva mediante la trasfusión de células T CD4⁺ a ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID)⁶. Otra característica de este modelo que remeda la EC es una producción de citocinas asociadas al fenotipo Th1 de las células T CD4⁺, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el INF- γ y la IL-12. Además, un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento con anticuerpo anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1 mejora el curso clínico de la colitis en este modelo⁷, lo que sugiere que esta aproximación terapéutica puede ser también útil para los pacientes con EC. Una de las ventajas de este modelo es que la ileítis no tiende a la curación, sino que se agrava hasta las 80 semanas. La naturaleza espontánea de este modelo, con persistencia de las lesiones a lo largo de la vida, ofrece la oportunidad de analizar los genes determinantes de la susceptibilidad a la enfermedad.

MODELOS INDUCIDOS

Agentes exógenos

A continuación se describen una serie de modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal inducidos por agentes exógenos y agrupados según la vía de administración del agente inductor. Son relativamente simples y, aunque no reproducen el curso intermitente de la enfermedad humana, permiten estudiar los mecanismos de la inflamación intestinal inducida, que es variable para cada modelo.

Agentes administrados por vía rectal

En este grupo se incluyen los modelos experimentales basados en una breve exposición de la mucosa del colon a un irritante químico capaz de producir una colitis difusa. El procedimiento consiste en la aplicación del irritante sobre la mucosa del colon a través de la vía rectal, o bien por inyección del irritante en el colon ascendente previa ligadura en el colon y el recto, con el fin de limitar la lesión en un segmento¹.

Colitis inducida por ácido acético. La instilación intrarrectal de ácido acético diluido actúa como un irritante químico local, desencadenando una colitis aguda difusa y transitoria⁸. La lesión inicial es una necrosis epitelial que varía extensamente dentro de la lámina propia, la submucosa y las capas musculares en función de la concentración y el tiempo de exposición⁹. La isquemia local transitoria puede contribuir a la le-

sión aguda en la que los neutrófilos no parecen tener un papel inicial. La respuesta inflamatoria es una secuela de la pérdida de la barrera epitelial y remite a los pocos días en el ratón, y a las 2-3 semanas en la rata¹⁰. Las ventajas del modelo se centran en su bajo coste y fácil realización. Sin embargo, la naturaleza no específica de la lesión mucosa y la ausencia de cronicidad lo hacen cuestionable como modelo de enfermedad inflamatoria intestinal.

Colitis por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Este modelo experimental se basa en la hipótesis de que en la EC se produce un aumento de la permeabilidad de la mucosa que facilitaría el contacto de la lámina propia con antígenos de la luz intestinal. Morris et al¹¹ describieron este modelo de inflamación crónica en la rata con la simple administración de un enema de TNBS disuelto en etanol. El ácido^{2,4,6} trinitrobenzenosulfónico es un hapteno que al unirse a sustancias de suficiente tamaño molecular adquiere la capacidad de inducir una respuesta inmune. El etanol actúa como «destructor de la barrera mucosa», facilitando que el TNBS penetre en la pared del colon y reaccione con los grupos lisina de las proteínas; así, se suscita una respuesta inflamatoria con características inmunológicas que se perpetúa en el tiempo (8 semanas). La lesión incluye una afección segmentaria de la mucosa (áreas de úlcera con áreas de mucosa normal), una afección transmural con engrosamiento de la pared intestinal, el intenso infiltrado inflamatorio, el edema y las fisuras de la mucosa profundas (longitudinales y transversales), que dan a la mucosa un aspecto de «empedrado». En la fase crónica pueden observarse granulomas no caseificantes, adherencias y fístulas, y zonas de estenosis causantes de dilataciones preestenóticas, donde suelen perpetuarse las úlceras. Los animales presentan pérdida de peso y leucocitosis durante la fase aguda, y diarrea sanguinolenta mientras persisten las úlceras. Los macrófagos aislados del intestino de estos animales producen una considerable cantidad de IL-12, y los linfocitos producen IFN- γ e IL-12¹². El tratamiento con anticuerpos anti-IL-12 mejora el curso de esta colitis¹², al igual que ha sido recientemente reportado para la EC humana¹³, y el tratamiento con un anticuerpo anti-VCAM-1 mejora también en curso de la colitis¹⁴, observación en coincidencia con el beneficioso efecto del bloqueo de las integrinas α -4 en la EC¹⁵. Éste es uno de los modelos más utilizados en la última década, recuerda a la EC y ofrece varias ventajas: fácil obtención de la lesión, especie animal relativamente asequible y barata, y evolución de las lesiones a la cronicidad.

Colitis inducida por formol/inmunocomplejos. Una modificación del fenómeno de Auer ha dado lugar al modelo experimental de colitis inducida por inmunocomplejos. Consiste en provocar una colitis suave e

inespecífica mediante la instilación de formalina diluida, y aproximadamente 2 h después se perfunde por vía intravenosa una disolución de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo con exceso de antígeno, en animales no presensibilizados¹⁶. El inmunocomplejo que se usa habitualmente consiste en albúmina humana con anticuerpos anti-albúmina humana obtenidos en animales de la misma especie a la empleada en el experimento. De esta manera, en el lugar de la colitis se inicia una inflamación grave por depósito de los inmunocomplejos que puede evolucionar durante unos 10 días. Las características histológicas incluyen la ulceración de la mucosa, un infiltrado inflamatorio celular en la lámina propia, la hemorragia, la depleción del moco y la formación de abscesos en las criptas. A las 6 semanas la única secuela es la distorsión de las criptas.

Colitis inducida por oxazolona. La oxazolona es una sustancia hapténizante desencadenante de una reacción de hipersensibilidad de contacto. La oxazolona administrada mediante enema (disuelta o no en etanol) causa una colitis de inicio rápido, y desarrolla una inflamación rápida que alcanza la máxima gravedad a los 3 días de la instilación. La lesión afecta invariablemente a la mitad distal del colon. Histopatológicamente, es una lesión superficial (no afecta a todo el espesor de la pared intestinal) y presenta un infiltrado inflamatorio compuesto sobre todo por neutrófilos. Finalmente, presenta una ulceración del epitelio, una pérdida de células caliciformes y *debris* intraluminales compuestos de restos celulares. Esta lesión inflamatoria remedia a la CU. Además, los linfocitos de la lámina propia estimulados muestran un aumento de producción de IL-4 e IL-5, pero no de IFN- γ , lo que sugiere que la colitis en este modelo está inducida por una respuesta Th2. El hallazgo de que el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-4 mejora la colitis, y un anticuerpo anti-IL-12 empeora el curso de la enfermedad, concuerda con el hecho de que la respuesta inmune es de tipo Th2. En este modelo la mortalidad es alta, pero los animales supervivientes se recuperan en casi su totalidad^{17,18}.

Agentes administrados por vía oral

La administración de ciertos fármacos o tóxicos alimentarios por vía oral puede causar una lesión inflamatoria en el tubo digestivo.

Enteropatía inducida por antiinflamatorios no esteroideos. Ciertos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como la indometacina, el ácido acetilsalicílico, el ácido flufenámico, la fenilbutazona o el diclofenaco sódico, inducen lesiones inflamatorias intestinales en animales y en el ser humano. Este daño es particularmente grave en la rata cuando se administra indometacina^{19,20}. La

lesión está en relación con la dosis administrada y con la capacidad del AINE de inhibir la vía de la ciclooxigenasa¹⁹. Puede variar desde una inflamación difusa de la mucosa yeyunoileal con úlceras puntiformes, en las primeras horas después de la administración de indometacina, hasta nódulos inflamatorios con adherencias entre asas intestinales adyacentes, serosa engrosada, abscesos, ulceración y perforaciones a las 72 h de la administración.

El mecanismo por el cual la indometacina induce la lesión intestinal es el resultado de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas¹⁹ y la presencia de bacterias en la luz intestinal²¹. La reducción de la síntesis de prostaglandinas provoca una alteración en la permeabilidad de la mucosa que es la anomalía que más temprano se detecta, confiriéndole una menor resistencia a la penetración de agentes nocivos²⁰. El papel decisivo de las bacterias en este modelo ha sido sugerido al observar que las lesiones están totalmente ausentes en animales libres de gérmenes o en los tratados con antibióticos²¹. La solubilidad de la indometacina y su administración con alimentación (en ayunas las lesiones resultan atenuadas) influyen en la reproducibilidad de este modelo.

Colitis inducida por carragenina. Watt y Marcus²² describieron un modelo de colitis al alimentar a diversos animales de experimentación (conejos, ratas, ratones, cobayas) con extracto de varias algas marinas rojas (principalmente el alga roja *Eucheima spinosum*) añadido al agua para beber. La molécula activa de este extracto es la carragenina, un polisacárido sulfatado de alto peso molecular que, al degradarse mediante una suave hidrólisis ácida, se transforma en un producto de menor peso molecular que conserva el grupo sulfato original con propiedades polianiónicas, causantes de las lesiones²². El tiempo necesario para conseguir zonas ulceradas múltiples en el colon varía según la concentración de carragenina en el agua y de la especie animal empleada.

La administración de estos productos sulfatados provoca un cambio de la flora intestinal, incrementándose la población de gérmenes gramnegativos²³ con una respuesta inmunológica anormal por una inapropiada función de los macrófagos, como consecuencia de la toxicidad del grupo sulfato sobre estas células²³. También se produce un efecto tóxico directo sobre las células epiteliales, y ambos serían los responsables de los cambios inflamatorios de la mucosa del colon²⁴.

Los animales presentan diarrea con sangre y moco y pérdida de peso. La lesión obtenida se caracteriza macroscópicamente por una ulceración de áreas variables de la mucosa, las formaciones pseudopolipoideas y las estenosis causantes de obstrucción. Histológicamente, se aprecian múltiples ulceraciones de la

mucosa con infiltrado celular alrededor de las úlceras y, en ocasiones, abscesos de las criptas²².

Colitis inducida por dextrano. La administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) disuelto en el agua para beber induce una colitis de predominio distal caracterizada por la aparición de diarrea líquida, úlceras e infiltrado inflamatorio agudo y crónico en el segmento de colon afectado²⁵. El mecanismo lesivo es el mismo que el descrito para la carragenina. Sin embargo, en este modelo, la aparición de la colitis acontece tras un período corto postingesta del tóxico. Por otro lado, con la administración del DSS en forma de ciclos (7 días de DSS en el agua seguidos de 10 días de agua sola), se consigue una colitis de características crónicas entre el tercer y quinto ciclos. Macroscópicamente, se producen un engrosamiento de la pared y un acortamiento de la longitud del colon. En la histología destaca un importante infiltrado celular inflamatorio de células plasmáticas y linfocitos, una alteración de la morfología de los macrófagos de la mucosa y submucosa, y la aparición de cambios regenerativos del epitelio del colon²⁵. El papel de las bacterias en la persistencia de estas lesiones no está claro. La concentración luminal de *Bacteroides* sp., especialmente *B. distosonis*, está aumentada en la fase aguda y crónica de la inflamación. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para ensayar diversas aproximaciones terapéuticas, y se ha demostrado la eficacia del tratamiento con anticuerpos bloqueadores de las moléculas de adhesión²⁶, óxido nítrico²⁷ o antioxidantes²⁸ sobre el curso clínico de la inflamación intestinal.

Agentes administrados por vía subcutánea

Colitis inducida por ciclosporina A. El modelo consiste en trasplantar médula ósea deplecionada de linfocitos T maduros a ratones irradiados, seguido de 6 semanas de inmunosupresión con ciclosporina. A las 2 semanas de retirar el fármaco los animales presentan un cuadro de diarrea e inflamación intestinal²⁹. La lesión se resuelve espontáneamente a los 30 días. La colitis inducida por ciclosporina es parte de un síndrome sistémico semejante a la enfermedad de injerto contra el huésped que afecta además al hígado, el páncreas y la piel. El mecanismo fisiopatológico de la colitis se sustenta en la hipótesis de que las subpoblaciones de linfocitos T intervienen en la inflamación intestinal.

La lesión se caracteriza por un aumento del grosor del colon a expensas de un engrosamiento de la mucosa, la presencia de hiperplasia de las criptas con un elevado infiltrado intraepitelial de linfocitos y macrófagos, cuerpos apoptóticos, depleción de la mucina y abscesos de las criptas. Éste es un modelo experimentalmente complicado.

Agentes administrados por vía intramural

La inyección intramural de sustancias constituyentes de la pared celular de las bacterias a la pared del tubo digestivo puede desencadenar una respuesta inflamatoria.

Colitis inducida por peptidoglicano-polisacárido (PG/PS). El polímero PG-PS es un componente estructural tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas con un amplio espectro de actividades proinflamatorias. Al igual que la endotoxina, activa los macrófagos con secreción de diferentes citocinas. También activa los linfocitos B y T, el sistema del complemento y provoca leucocitosis de varias semanas de duración. La complejidad de estas acciones y su efecto prolongado puede explicarse por las características farmacocinéticas de esta molécula, la cual es fagocitada y biodegradada³⁰.

Tras una laparotomía, se procede a inyectar PG/PS en diferentes lugares: íleon distal, placas de Peyer en el íleon, el ciego y el colon distal. La inyección intramural de este polímero induce una inflamación de curso variable que depende del tipo de animal utilizado³⁰. Se puede conseguir una inflamación local que se resuelve a las 3 semanas en ratas Búfalo y Fisher 344, y una respuesta inflamatoria bifásica en ratas susceptibles (Lewis). En estas ratas aparece una enterocolitis aguda al cabo de 1-2 días, seguida de un período de inactividad de unos 7-9 días y una reactivación espontánea que persiste unos 4 meses. Esta fase crónica se caracteriza por la presencia de inflamación granulomatosa transmural, abscesos de las criptas, extensa fibrosis, abscesos locales y acumulaciones de neutrófilos. En concurrencia con el inicio de la reactivación de la enteropatía inflamatoria, las ratas Lewis presentan artritis erosiva, hepatitis granulomatosa, granulomas y necrosis esplénica, anemia crónica y una considerable leucocitosis. Las ratas Sprague-Dawley desarrollan una enterocolitis granulomatosa, pero sin manifestaciones sistémicas.

Este modelo tiene el inconveniente de intervenir quirúrgicamente al animal, y además precisa una correcta sonicación del PG/PS previa a la administración para evitar los agregados, ya que estos hechos pueden influir en el desarrollo de las lesiones^{30,31}.

Modelos inducidos por manipulación genética

El desarrollo de la metodología para la creación de animales transgénicos o con deficiencias genéticas (*knock-out*) ha revolucionado el campo de los modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal, tras descubrir que una amplia variedad de modelos de ratón manipulados genéticamente desarrollan una inflamación intestinal.

Estos modelos han aportado una gran ayuda para la comprensión del papel que desempeñan determinadas moléculas y genes, incluidas las citocinas específicas, en la patogenia de la inflamación intestinal crónica. En conjunto, estos modelos han demostrado de forma clara que es necesaria una regulación muy fina del sistema inmune intestinal, y han permitido la identificación de componentes clave en la regulación de esta respuesta inmune. Sin embargo, es poco probable que estas mutaciones representen la causa de la enfermedad inflamatoria humana. Por tanto, la utilidad de estos modelos es limitada, en especial cuando quieren analizarse las causas de la enfermedad inflamatoria humana.

Modelos knockout

Deficiencia de IL-2. La IL-2 es una citocina que promueve el crecimiento y la expansión de células T, la diferenciación de células B, la activación de macrófagos y de células NK, así como la muerte celular inducida por la activación. Los ratones con una delección del gen de IL-2 (IL-2^{-/-}) se desarrollan normalmente hasta las 4 semanas de edad³²; la mitad mueren entre las semanas 5 y 10 a causa de una intensa anemia; los que sobreviven más allá de la semana 10 desarrollan uniformemente una pancolitis caracterizada por diarrea, rectorragia y prolapso rectal. Desde el punto de vista histológico aparece un engrosamiento de la pared del colon por hiperplasia de la capa epitelial, depleción de mucina, abscesos de cripta y distorsión de las criptas. El intestino delgado se halla respetado. No se han identificado patógenos específicos que desencadenen la colitis, pero cuando los animales se mantienen libres de gérmenes no desarrollan colitis, por lo que una respuesta inmune anormal a la flora entérica habitual es un elemento en la patogenia de la inflamación en este modelo. Se considera que la colitis en el ratón KO IL-2 se debe fundamentalmente a una anormal respuesta de muerte celular inducida por la activación y la agénesis tímica³³.

Deficiencia de IL-10. La IL-10 es una importante citocina reguladora producida por células T, algunas células B, macrófagos y timocitos. La IL-10 es un potente inhibidor de macrófagos y de linfocitos con fenotipo Th1. Los animales IL-10^{-/-} desarrollan anemia, retardo de crecimiento y una enfermedad inflamatoria intestinal que puede afectar a todo el tracto intestinal^{34,35}. El duodeno, el yeyuno y el colon proximal son las áreas con una afección más grave. Histológicamente, se observa una hiperplasia de las criptas; la lámina propia y la submucosa están densamente infiltradas por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, neutrófilos y alguna célula gigante multinucleada. Pueden aparecer ulceraciones profundas. Al igual que en los ratones KO de IL-2, se supone que la acti-

vación de células CD4⁺ Th1 y la depleción de células T reguladoras contribuyen a la aparición de inflamación intestinal. De todas formas, parece que los mecanismos inmunes que conducen a la lesión intestinal son diferentes en las fases iniciales y tardías de la evolución de la colitis en este modelo³⁶; IL-12 desempeña un papel primordial en las fases iniciales, mientras que la ausencia de esta citocina, junto con un aumento de síntesis de IL-4 y IL-13 en las fases tardías, indica que los mecanismos responsables del mantenimiento de la inflamación crónica son distintos a los mediadores del inicio de la inflamación intestinal.

La flora bacteriana entérica parece ejercer un papel en la patogenia de esta inflamación, ya que cuando estos animales se mantienen libres de patógenos las lesiones se restringen al colon proximal. La patogenia de esta inflamación representa tal vez una respuesta Th1 aumentada a los antígenos bacterianos debido a la deficiencia de IL-10, que normalmente suprime la reactividad de las células T.

Deficiencia de STAT3. STAT3 es una molécula que se halla en la vía de señalización activada por IL-10. Un modelo KO de STAT3 en macrófagos y neutrófilos desarrolla una colitis de características clínicas similares al KO IL-10³⁷. Sin embargo, no aparece colitis en un modelo de deficiencia de STAT3 que afecta de forma selectiva a las células T. Estas observaciones indican que la anormal regulación de la función de macrófagos, pero no de células T, es fundamental en la patogenia de la colitis que aparece en animales KO IL-10.

Deficiencia de CRFB4. El gen *CRFB4* codifica al receptor CRF2-4, que es un miembro de la familia de receptores de citocinas de clase 2 (CRF2). En concreto, CRF2-4 es una subunidad del receptor de IL-10. Se ha generado un ratón con disrupción del gen *CRFB4*. Los ratones que carecen de la proteína CRF2-4 crecen normalmente y son fértiles, pero hacia las 12 semanas de vida la mayoría de los ratones mutantes desarrollan una colitis crónica, con un engrosamiento de las paredes del colon, parecida a la observada en ratones deficientes en IL-10³⁸. Histológicamente, se observa un infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y, en los casos más graves, una hiperplasia del epitelio de las criptas. El intestino delgado no presenta lesiones. La patogenia de estas lesiones es desconocida, aunque debe guardar relación con los cambios observados en los ratones IL-10^{-/-}.

TNF Δ ARE. Los ratones con una delección en la región 3' del gen del TNF rica en elementos AU (ARE), denominados TNF Δ ARE, poseen valores elevados de ARNm y proteína de TNF- α . Estos ani-

males desarrollan entre las 2 y 4 semanas de edad una inflamación en el íleon terminal, que en ocasiones se extiende hasta el colon derecho³⁹. Histológicamente, se trata de una lesión transmural, con infiltrado inflamatorio agudo y crónico; en animales de mayor edad (4-7 meses) hay una pérdida de las estructuras vellositarias y formación de granulomas. Esta inflamación intestinal se asocia con lesiones oculares (cataratas), un cuadro constitucional con una notable pérdida de peso y una intensa artritis inflamatoria. Aunque la enfermedad de Crohn humana no se produce como consecuencia de una mutación en la región ARE del gen del TNF- α , este modelo ofrece la posibilidad de evaluar posibles intervenciones terapéuticas basadas en la modulación de la función del TNF.

Deficiencia de G α_{12} . Las proteínas G participan en la transducción de las señales en las células y regulan diversos procesos biológicos, como la diferenciación y el desarrollo. Los ratones deficientes en la subunidad α_{12} de la proteína G son normales al nacimiento pero presentan después un retraso en el crecimiento y una elevada mortalidad debida a una pancolitis, que empieza a las 8-12 semanas de vida y es de intensidad progresiva⁴⁰. La enfermedad es más grave en el colon distal. Histológicamente, se observa una inflamación aguda y crónica, abscesos de cripta, distorsión de las criptas, fibrosis focal y ulceraciones superficiales y profundas. Una tercera parte de los animales desarrollan adenocarcinoma de colon entre las semanas 15 y 33. Los ratones criados en condiciones libres de patógenos también desarrollan la inflamación intestinal.

Deficiencia de receptores de células T. Las células T reconocen al antígeno a través de los receptores heterodiméricos compuestos de cadenas α y β (TCR α/β) o γ y δ (TCR γ/δ). Los ratones con delección del gen TCR α (TCR $\alpha^{-/-}$) se desarrollan normalmente hasta los 3-4 meses de edad, pero desarrollan después una diarrea crónica y un cuadro consuntivo asociado con un prolapso rectal⁴¹. Estos ratones presentan un claro engrosamiento del recto, el colon y el ciego, con un intestino delgado normal. Histológicamente, aparece un alargamiento y una distorsión de las criptas, una depleción de mucina, una inflamación aguda y crónica en la lámina propia, y algunos abscesos de cripta. La incidencia y la gravedad de la enfermedad inducida por esta mutación varía según las cepas de ratones en que se produce, lo que indica que hay genes de susceptibilidad que actúan modificando la expresión de la enfermedad. Mientras que la mayoría de modelos animales de colitis desarrolla una respuesta Th1 (producción predominante de IFN- γ , IL-12 y TNF- α), se ha sugerido que este modelo tiene una respuesta tipo Th2 (predominan IL-4 e IL5)⁴². Este modelo animal se contempla como semejante a la CU humana

debido a la distribución de las lesiones, los cambios anatomopatológicos y la activación inmune Th2 predominante. Los animales doble KO (TCR- $\alpha^{-/-}$ /I $\mu^{-/-}$) desprovistos de células B desarrollan una colitis más precoz y más grave que los ratones TCR- $\alpha^{-/-}$. Esta observación indica que las células B no se requieren para el inicio de la colitis, y pueden actuar como supresoras de la respuesta inflamatoria en fases más tardías de la evolución de la inflamación intestinal⁴³.

Modelos transgénicos

Transgénico IL-7. La IL-7 sintetizada en las células del epitelio intestinal regula la proliferación y diferenciación de linfocitos en la mucosa intestinal, y se ha hallado elevada en el suero de pacientes con CU⁴⁴. La expresión de IL-7 en la mucosa colónica de animales transgénicos IL-7 se asocia con la aparición de colitis causada por la infiltración de células T CD4⁺⁴⁵. Esta observación sugiere un importante papel de las células T sobre las lesiones intestinales en este modelo. Se ha demostrado mediante otra aproximación experimental el importante papel de IL-7 en el desarrollo de colitis en animales deficientes en IL-7, en un modelo de colitis NoT-noB (RAG-2^{-/-})⁴⁶. En este sistema, la deficiencia de IL-7 previene la intensa respuesta inflamatoria de las células mieloides dirigida frente a la flora bacteriana.

Transgénico STAT4. Las proteínas de la familia STAT actúan en la transmisión de señales inducidas por citocinas desde la superficie celular al núcleo. STAT4 está específicamente relacionada con señales dependientes del receptor de IL-12. Se ha creado un ratón transgénico que expresa de forma inducible elevadas cantidades de STAT4 en células T CD4⁺. A los 7-14 días de la inducción de la expresión de STAT4 los ratones desarrollan un cuadro de diarrea y pérdida de peso⁴⁷. Se produce un engrosamiento difuso del intestino. El proceso inflamatorio se caracteriza histológicamente por una destrucción de la arquitectura de las criptas, y un denso infiltrado de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en la lámina propia. Esta infiltración celular se asocia con una elevada producción de TNF- α e IFN- γ . La inflamación intestinal en este modelo es más intensa en áreas con una mayor carga bacteriana (íleon terminal y colon), lo que sugiere que también en este modelo los antígenos luminales pueden desempeñar un papel en la patogenia de la inflamación intestinal. Las alteraciones primarias que condicionan la aparición de colitis en este modelo están lejos de la enfermedad inflamatoria humana, pero éste ofrece la posibilidad de investigar la eficacia de posibles intervenciones terapéuticas sobre la función de la IL-12 o los mecanismos de transmisión de señales de esta citocina.

Transgénico HLA-B27. Con el fin de estudiar las enfermedades asociadas con la molécula humana de clase I HLA-B27, se crearon ratas transgénicas que expresan los genes *HLA-B27* humano y la β 2-microglobulina. Estos animales desarrollan alteraciones sistémicas manifestadas en forma de inflamación intestinal, artritis, orquitis y lesiones psoriasisiformes de la piel y las uñas⁴⁸. En la cepa más susceptible (21-4H) la enteritis, en especial la colitis, aparece en todos los animales que sobreviven más allá de las 10 semanas. El estudio histológico del intestino muestra un infiltrado inflamatorio mononuclear difuso, una hiperplasia de las criptas y la depleción de mucina. Es menos frecuente la destrucción de criptas, la formación de abscesos de cripta o la aparición de úlceras.

Los mecanismos por los que la molécula B-27 induce la enfermedad no se han dilucidado completamente, pero hay evidencias de que la molécula es reconocida por células T. La expresión de B-27 en el intestino se halla limitada a las células linfoides. La enfermedad puede ser transferida mediante inyección de médula ósea de animales transgénicos B-27 a receptores sanos. Las ratas atímicas portadoras del transgén no desarrollan la enfermedad, aunque las células de la médula ósea de estas ratas pueden transferirla. El conjunto de estas evidencias sugiere que la aparición de enfermedad requiere la expresión de B-27 en las células presentadoras de antígeno, que interactúan con las células T del huésped. Es interesante notar que la colitis y la artritis no aparecen en animales criados en condiciones libres de gérmenes⁴⁹, lo que implica que la flora entérica normal es una fuente de antígenos que puede iniciar estas alteraciones patológicas.

Éste es un excelente modelo para estudiar las posibles interrelaciones entre la inflamación intestinal y articular, y las complejas interacciones entre la flora bacteriana, el sistema inmune y los genes de susceptibilidad en la inducción de la enfermedad.

Transferencia de células T a animales inmunodeficientes

Transferencia de CD45RB^{hi} a ratones SCID o RAG^{-/-}

La transferencia de determinadas subpoblaciones de células T CD4⁺ a ratones SCID o con deficiencia del gen activador de la recombinación (RAG^{-/-}), concretamente de células T que expresan en su membrana una elevada cantidad de la molécula CD45RB (CD4 CD45RB^{hi}), provoca un cuadro clínico caracterizado por diarrea y pérdida de peso. Estos síntomas son de intensidad progresiva y acaban produciendo la muerte del animal⁵⁰. La transferencia de todas las subpoblaciones de células T no da lugar a enfermedad, así como tampoco la transferencia de linfocitos que expresan valores bajos de la molécula CD4 CD45RB

(CD4 CD45RB^{lo}). Desde el punto de vista histológico, la inflamación intestinal resultante de la transferencia de células T CD4 CD45RB^{hi} afecta sobre todo al colon, que se halla notablemente engrosado debido a una hiperplasia del epitelio. La lámina propia, y en menor grado la submucosa, se hallan infiltradas por linfocitos y macrófagos. La lesión es muy similar a la del modelo inducido por ciclosporina A.

Uno de los aspectos interesantes de este modelo es que la cotransferencia de células CD4 CD45RB^{lo} previene la inflamación intestinal. La inflamación también puede ser prevenida mediante tratamiento con anti-IFN- γ , anti-TNF- α , o mediante administración de IL-10⁵⁰. Estas observaciones son consistentes con una patogenia de la inflamación en este modelo, relacionada con la activación de células Th1. Este modelo establece 2 conceptos importantes: en ratones normales están presentes células que pueden producir inflamación intestinal, y también en ratones normales hay células capaces de evitar que esta colitis aparezca.

Trasplante de médula ósea a ratones T γ 26

Los ratones T γ 26 carecen de timocitos, células T y células NK. Cuando se trasplanta médula ósea completa de ratones normales a ratones adultos T γ 26 (BM \rightarrow T γ 26), éstos desarrollan al cabo de 4-5 semanas de la transferencia un cuadro constitucional caracterizado por pérdida de peso y la aparición de una colitis extensa⁵¹. Esta colitis está caracterizada por la infiltración del colon por células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ y TNF- α . Además, las células T de la lámina propia y del compartimiento intraepitelial del colon, aunque no las células periféricas circulantes, de los ratones colíticos BM \rightarrow T γ 26 poseen una elevada actividad citotóxica. Un aspecto característico de este modelo, en común con muchos otros modelos animales de inflamación intestinal, es el papel predominante de las células T activadas, productoras de IFN- γ y TNF- α , consistente con una respuesta inmune polarizada hacia Th1.

Cabe destacar que cuando se efectúa el trasplante de médula ósea normal a ratones T γ 26 que han recibido previamente un trasplante de timo fetal de un ratón T γ 26, los animales no desarrollan colitis. En conjunto, estos hallazgos indican que las células T seleccionadas en un microambiente tímico aberrante contienen una población de células capaces de inducir una colitis grave; ésta puede ser prevenida por células T que han seguido un desarrollo tímico normal.

Transferencia de células T CD8 específicas para la heat shock protein (hsp)60

La transferencia de linfocitos T CD8⁺ preactivados con hsp60 a ratones TCR β ^{-/-} o ratones con SCID de-

sencadena la aparición de inflamación intestinal de predominio en intestino delgado, grave y generalmente letal⁵². El desarrollo de colitis en estos animales requiere la presentación de hsp60 por el CMH de clase I y es dependiente de la función de TNF- α , ya que esta transferencia no provoca el desarrollo de colitis en los ratones TCR β /TNF receptor I/TNF receptor II triple KO. En contraste con las observaciones en la mayoría de modelos animales, la inflamación intestinal en este modelo no depende de la presencia de flora bacteriana residente. Estas observaciones indican que las células T CD8⁺ serían inmunizadas frente a hsp60, y reaccionarían al verse expuestas a hsp60 del medio, mediando así la inflamación intestinal.

LECCIONES DE LOS MODELOS ANIMALES

Tipos celulares de relevancia funcional

Células T y células B

Las células T CD4⁺ desempeñan un papel central en la patogenia de la inflamación intestinal experimental. En muchos de los modelos descritos, incluidos los de transferencia a ratones SCID o T γ 26, algunos de los modelos con deficiencia genética (IL-10^{-/-}, IL-2^{-/-} y TCR α ^{-/-}), así como en modelos inducidos, como el TNBS, la infiltración de la lámina propia por células CD4⁺ es un elemento esencial del trastorno inmunopatológico. Además, la inhibición directa de las células T CD4⁺ mediante anticuerpos monoclonales bloqueadores previene el desarrollo de inflamación⁵³. Por el contrario, las células T CD8⁺, aunque presentes en el infiltrado inflamatorio de muchos de estos modelos, no constituyen un elemento esencial, ya que su eliminación no cambia el curso de la inflamación⁵⁴. Si alguna función tienen las células B en estos modelos experimentales de inflamación es la de frenar la respuesta inflamatoria⁵⁵. Finalmente, las células T γ/δ pueden prevenir la colitis o acelerar su curación mediante la regulación de la función de barrera epitelial a través de la producción de sustancias como el factor de crecimiento queratinocítico⁵⁶.

Aunque las células T CD4⁺ son responsables del inicio de la inflamación intestinal, éstas también tienen un efecto como células contrarreguladoras que limitan o eliminan la inflamación. En la descripción inicial del modelo de transferencia en ratones SCID, por ejemplo, se observó que las células autoagresoras estaban contenidas en la subpoblación CD45RB^{hi}, mientras que las células CD4⁺ CD45RB^{lo} (memoria) tenían una función inhibitoria contrarreguladora, ya que, como se ha comentado, la transferencia simultánea de ambas subpoblaciones no provoca la aparición de colitis. Las características de las células T CD4⁺ autoagresivas en este modelo, y en muchos otros mo-

delos de inflamación intestinal, son las de células Th1, estimuladas por IL-12 y que producen TNF- α ³⁹ e IFN- γ ⁵⁷. Por otro lado, las células T inhibitorias producen citocinas con acción inhibitoria, ya sean células T Th3 que producen TGF- β o las denominadas Tr1 que producen IL-10 y TGF- β ³⁸.

Finalmente, debe tenerse presente que las células T Th2 también pueden ejercer funciones efectoras en algunos modelos de inflamación. Así, en animales TCR α ^{-/-}, o en el modelo inducido por oxazolona, aparece una inflamación relativamente superficial, que remedia la CU humana, mediada por células T Th2 productoras de IL-4; esta inflamación se elimina al cruzar ratones TCR α ^{-/-} con ratones IL-4^{-/-}, o bien mediante la administración de anticuerpos anti-IL-4 en el modelo inducido por oxazolona¹⁸.

Macrófagos

En varios modelos experimentales de inflamación intestinal y en la enfermedad inflamatoria humana, el reclutamiento y la activación de macrófagos es un hecho constante⁵⁸. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que las alteraciones funcionales de los macrófagos pueden desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta posibilidad se ve apoyada por observaciones recientes en ratones con deficiencia de Stat3 en la línea meloide. Estos ratones son incapaces de producir varias citocinas dependientes de Stat3, de forma más notoria la IL-10, que tiene un importante efecto inhibitorio sobre los macrófagos³⁷. Los macrófagos de estos animales tienen un fenotipo igual al resultante de la activación por IFN- γ , y no resultan inhibidos por IL-10. La estimulación de estos macrófagos *in vitro* mediante endotoxina induce una excesiva producción de toda una serie de citocinas proinflamatorias: IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estas observaciones sugieren que las alteraciones en la función de los macrófagos pueden originar una exagerada respuesta inflamatoria.

Células epiteliales

Las células epiteliales forman normalmente una barrera al paso de gérmenes y restringen el paso de otros componentes de la luz intestinal hacia la lámina propia, donde las macromoléculas pueden ser captadas por células presentadoras de antígeno y así estimular a los linfocitos. La relación entre esta función de barrera y la aparición de inflamación intestinal se ha puesto de manifiesto en 2 modelos experimentales. En ratones que expresan un gen de N-caderina «dominante negativo», la función N-caderina es deficiente y la integridad de las uniones intercelulares de las células epiteliales está comprometida⁵⁹. El resultado es una lesión inflamatoria parecida a la CU humana que se localiza en las áreas que expresan el gen defi-

ciente. De forma similar, los ratones con deficiencia del gen de resistencia a multifármacos 1a (*mdr1a*^{-/-}) poseen células epiteliales y linfocitos que son incapaces de eliminar sustancias potencialmente lesivas del interior de la célula, lo que puede producir una muerte celular prematura⁶⁰. Este defecto produce también una inflamación de características parecidas a la CU, probablemente debida a la disfunción de las células epiteliales (más que de los linfocitos), ya que cuando se reemplazan en estos ratones las quimeras de médula ósea mutantes por linfocitos normales todavía desarrollan colitis, mientras que cuando se reemplaza en un ratón normal la médula ósea por linfocitos *mdr1a*^{-/-} esta afección no aparece.

Células endoteliales y reclutamiento de leucocitos

La activación de las células endoteliales tiene un papel central en el reclutamiento de leucocitos circulantes hacia el intestino inflamado⁶¹. Este proceso de reclutamiento es el resultado de la interacción entre moléculas de adhesión localizadas en la superficie de la célula endotelial y sus correspondientes ligandos en la membrana de los leucocitos. La interacción inicial de baja afinidad entre los leucocitos y el endotelio venular se manifiesta como un movimiento de rodamiento. Una proporción de los leucocitos que ruedan a lo largo de la vénula pueden adherirse firmemente a la pared del vaso, e iniciar el proceso de migración transendotelial en respuesta a una señal quimiotáctica del compartimiento perivascular⁵⁸. Cada uno de los 3 estadios del reclutamiento leucocitario (rodamiento, adhesión firme y emigración transendotelial) conlleva la participación de familias diferentes de moléculas de adhesión, que incluyen las selectinas y sus ligandos, las integrinas y las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas⁶².

El desarrollo reciente de un método muy preciso para cuantificar la expresión de moléculas de adhesión de la superficie endotelial *in vivo*, basado en la inyección de anticuerpos marcados⁶³, y la aplicación de las técnicas de microscopía intravital al estudio del colon⁶⁴, han permitido caracterizar la expresión y la función de moléculas de adhesión en diversos modelos experimentales de colitis. Aunque se ha documentado de forma consistente un aumento en la expresión de P y E-selectina en la colitis experimental, la inmunoneutralización de estas moléculas de adhesión tiene poco efecto sobre el proceso inflamatorio en el colon⁶⁴. Se ha demostrado un notable aumento en la expresión de VCAM-1 en diversos modelos de colitis experimental, incluida la inducida por TNBS, por DSS²⁶ o PG-PS⁶⁵, así como en la colitis que aparece en ratones deficientes en IL-10³⁵, o en ratones SCID a los que se transfieren células T CD45RB^{hi66}. En estos modelos animales la expresión de ICAM-1 se halla sólo ligeramente incrementada, mientras que se ha

observado un aumento uniforme en la expresión de MAdCAM-1 de magnitud similar a la de VCAM-1. Los estudios encaminados a determinar el valor terapéutico de la inmunoneutralización de moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas han demostrado uniformemente un beneficio del bloqueo de VCAM-1¹⁴, mientras que los resultados del bloqueo de otras moléculas de adhesión han sido más dispares²⁶.

Mecanismos efectores de la inflamación

La interacción entre los elementos celulares y los mediadores humorales, que regulan tanto la respuesta inmune como los mecanismos de inflamación, son uno de los aspectos actuales de interés. Se han identificado un gran número de sustancias endógenas que intervienen en el proceso inflamatorio, incluidas las aminas biógenas, las quininas, los componentes del sistema del complemento, el óxido nítrico (NO), las citocinas, los radicales libres de oxígeno, diversos neuropéptidos (sustancia P, endorfinas, VIP) y los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), entre los más destacables. El papel de todos estos mediadores en el inicio y el mantenimiento del proceso inflamatorio aún no se ha dilucidado, y en la bibliografía se hallan datos aparentemente contradictorios sobre las acciones biológicas de cada una de estas moléculas. El problema fundamental para comprender e interpretar la enorme cantidad de datos experimentales que se han ido produciendo consiste en discernir qué papel desempeña cada mediador en el proceso inflamatorio, sin olvidar que dicho proceso se integra dentro de una compleja red de mediadores que interactúan entre sí en cada etapa.

La mucosa colónica inflamada se caracteriza por la presencia de abundantes células inflamatorias, cuya activación se expresa mediante la síntesis y la liberación de mediadores inflamatorios. Los modelos experimentales de colitis han sido utilizados para evaluar la participación y la interacción de estos mediadores humorales en los fenómenos inflamatorios del tubo digestivo. Merece la pena destacar el papel de los eicosanoides, el óxido nítrico y diversas citocinas.

Eicosanoides

En diferentes modelos experimentales –colitis por ácido acético¹⁰, carragenina⁶⁷, inmunocomplejos⁶⁸ o TNBS⁶⁹⁻⁷¹– se ha estudiado su participación, y se ha observado que en la mucosa intestinal inflamada hay una sobreproducción de eicosanoides en general, donde las prostaglandinas y los tromboxanos son los más abundantes, mientras que los leucotrienos son los eicosanoides proinflamatorios más importantes. En las respuestas inflamatorias crónicas (principalmente de carácter inmunitario) es donde la participación de

los eicosanoides adquiere un significado mucho más complejo, y pueden ser los responsables directos de la patogenia del proceso o adoptar un papel regulador de la propia inflamación crónica. La complejidad del metabolismo del ácido araquidónico y las dificultades metodológicas, inherentes al diseño experimental, nos llevan a ser extremadamente cautelosos en la interpretación del papel de los eicosanoides en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal^{72,73}.

La acción fundamental de las prostaglandinas es la vasodilatación local y la de potenciar la permeabilidad capilar de otros mediadores; como consecuencia de la combinación de ambas se produce el edema. La PGE₂ potencia muy notablemente el dolor inducido por la histamina, aunque por sí misma no produce dolor. Por otra parte, es interesante señalar que las prostaglandinas tienen una acción citoprotectora al aumentar la resistencia celular por estabilización de la membrana, con lo que su acción global tiende a proteger la integridad de los tejidos. En cuanto a la respuesta inmune, las prostaglandinas intervienen en la retroalimentación inmunosupresora de los macrófagos sobre la proliferación de linfocitos. La mayor parte de estas propiedades no son compartidas por el tromboxano, que tiene una acción vasoconstrictora, provoca la adhesión y la agregación de las plaquetas, y activa a los neutrófilos y los macrófagos. Los leucotrienos destacan por su potente actividad quimio-táctica sobre los neutrófilos, provocan su activación y la liberación de enzimas lisosomales. El LTB₄ actúa como un ionóforo de calcio, aumenta su flujo hacia el interior celular, y activa las fosfolipasas y la síntesis de eicosanoides. Los sulfidopéptido-leucotrienos (LTC₄, D₄ y E₄), leucotrienos asociados a un grupo peptídico, incrementan la permeabilidad de los capilares a macromoléculas y, además, pueden tener una acción venoconstrictora, de modo que aumentan la estasis vascular sobre la circulación capilar y participan en la formación del edema⁷³.

Óxido nítrico

Se han descrito 3 isoformas de la enzima NOS (óxido nítrico sintasa): NOSn neuronal o isoforma I, NOSi inducible o isoforma II, y NOSe endotelial o isoforma III. Las isoformas NOSn y NOSe se expresan de forma constitutiva, mientras que la NOSi se transcribe en respuesta al estímulo inmunológico que las citocinas y endotoxinas ejercen sobre una amplia variedad de células.

El NO generado en la célula endotelial por la isoforma constitutiva de NOS actúa como mediador en la transmisión de estímulos célula-célula, y ejerce un papel determinante en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento del tono vascular; además, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, modela la actividad de

los mastocitos y participa en la integridad de la mucosa intestinal. El NO formado en las neuronas actúa como neurotransmisor no adrenérgico-no colinérgico en el plexo mientérico, y participa en el control de la relajación de la musculatura lisa intestinal. La formación de NO secundaria a la activación de la NOSi desempeña un papel clave en los procesos inflamatorios, la reparación de los tejidos y en los mecanismos inespecíficos de defensa del huésped (efecto citotóxico); una excesiva producción puede lesionar las células y los tejidos que lo sintetizan⁷⁴. El NO también es un importante mediador de la respuesta inmune, que actúa como mediador de la interacción entre las células Th1/Th2. La IL-1, la IL-2, el TNF- α y el INF- γ aumentan la producción de NO en los macrófagos y neutrófilos activados, mientras que los glucocorticoides y otras citocinas, como la IL-4, la IL-10 y el TGF β , ejercen el efecto opuesto. Además, el NO regula por sí mismo la producción de TNF- α , IL-3 y factor de transcripción NF- κ B⁷⁵.

Citocinas

La EC presenta una reacción inmunitaria mediada por células T Th1 (aumento de la producción de INF- γ) y la CU presenta un perfil más complejo en el que parece haber un componente Th2 (aumento de la IL-5)^{76,77}. Los modelos experimentales también se pueden agrupar por la respuesta predominante de las células T. Entre los modelos con un perfil Th1 encontramos los ratones con deficiencia de IL-2, IL-10 y la G_{12 α} , ratones SCID reconstituidos con células T CD45RB^{hi} naive y la colitis por TNBS. La diferenciación Th1 de las células T se produce cuando las células T se comunican con las células presentadoras del antígeno en presencia de IL-12, citocina con un papel fundamental en el crecimiento y la diferenciación de las células T. Se desconoce frente a qué situación las células presentadoras de antígeno producen una secreción aumentada de IL-12, induciendo una producción excesiva de INF- γ por parte de las células T CD4⁺. La producción excesiva de INF- γ activa a los macrófagos, lo cual a su vez conduce a un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , causantes del proceso inflamatorio granulomatoso característico en estos modelos. Finalmente, el INF- γ y el TNF- α actúan de forma sinérgica aumentando la producción de IL-12, es decir, retroalimentando de forma positiva la respuesta Th1.

Entre los modelos Th2 están los producidos en ratones deficientes en TCR- α y el de la colitis inducida por oxazolona. Ambos modelos se asemejan a la CU humana, pero no guardan un paralelismo tan completo como los Th1 y la EC. En el primer modelo hay una sobreproducción de IL-4 y en el segundo de IL-4 y IL-5. En la colitis por oxazolona se produce, ade-

más, un aumento de TGF- β en las zonas adyacentes no afectadas, lo que sugiere que esta citocina ejerce un efecto compensatorio, al comprobar que la administración de anti-TGF- β empeora y aumenta la extensión de la colitis^{18,76,77}.

La inhibición de TNF- α , citocina con actividad proinflamatoria, se utiliza como terapia en la EC⁷⁸. Sin embargo, el TNF- α también tiene un papel importante en la defensa del huésped frente a las infecciones. La producción de TNF- α está incrementada en el colon inflamado por TNBS tanto en la fase aguda como crónica. La inhibición de esta citocina tuvo un efecto beneficioso cuando se administró como tratamiento en la fase crónica, y no así cuando se administró en la fase aguda, momento en que se produce un sobrecrecimiento de bacterias entéricas sobre la mucosa inflamada. Estos resultados sugieren que la inactivación del TNF- α en la fase aguda, donde el papel de esta citocina está en el balance entre su acción como defensa frente a la agresión por el sobrecrecimiento bacteriano y su acción proinflamatoria, puede ser perjudicial para el proceso inflamatorio intestinal experimental⁷⁹.

Bacterias intestinales e inflamación

La mayor parte de los antígenos de la luz intestinal son bacterias, por lo que la interacción entre un sistema inmune mal regulado y la flora bacteriana normal puede desempeñar un papel importante en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. El concepto de que la flora intestinal está implicada en la inflamación de la mucosa se sustenta por los datos obtenidos en diferentes modelos experimentales, en los que se ha observado que los animales libres de bacterias y los tratados con antibióticos no absorbibles desarrollan menos lesión intestinal. Así, las ratas transgénicas HLA-B27⁴⁹, los ratones deficientes en IL-2³³ o los ratones deficientes en IL-10³⁴ no desarrollan el proceso inflamatorio intestinal o éste se ve claramente atenuado cuando se mantienen en condiciones libres de bacterias. Por otro lado, el pretratamiento con antibióticos reduce el proceso inflamatorio intestinal en diferentes modelos experimentales, como la enteropatía por indometacina²¹, DDS²⁵ o TNBS⁸⁰, y en la inducida por la transferencia de linfocitos CD4⁺/CD45RB^{hi} en el ratón SCID⁸¹. En el modelo del TNBS, el tratamiento oral o tópico con enemas de antibióticos de amplio espectro no absorbibles redujo la lesión colónica. Este efecto beneficioso del tratamiento antibiótico fue particularmente manifiesto durante la fase crónica de la colitis, donde raramente los animales desarrollaron las características de cronicidad de la lesión, como la estenosis colónica con dilatación proximal, las adherencias y la fibrosis⁸⁰. Además de la reducción de la lesión, los

antibióticos también causaban una apreciable reducción en el número de bacterias intraluminales⁸⁰. En este mismo modelo y en ratas tratadas con antibióticos, la reintroducción intracolónica de flora fecal procedente de ratas sanas aumentó el proceso inflamatorio y agravó las lesiones. Este efecto sólo fue evidente cuando la suspensión fecal se administró 6 h después de la inducción de la colitis, pero no cuando se administró a los 3 días⁸². Estos hallazgos sugieren que las bacterias de la flora común de la rata estimulan la enfermedad inflamatoria en los estadios iniciales de la colitis, y que es necesaria una reducción en el contenido de bacterias endoluminales para obtener un efecto antiinflamatorio y evitar la progresión a la cronicidad en las lesiones inducidas por el TNBS.

Respuestas inmunoinflamatorias frente a bacterias específicas

Está bien establecido que la flora intestinal ejerce un papel determinante en el desarrollo del sistema inmune intestinal. En un modelo *in vivo* de segmento colónico excluido del tránsito intestinal (se aísla un asa del colon tras una laparatomía y se aboca a la pared abdominal mediante 2 ostomías), el tratamiento antibiótico permite erradicar la flora indígena en esta asa aislada y recolonizarla con bacterias preseleccionadas. Al estudiar la respuesta inflamatoria frente a la instalación intraluminal de TNBS, se observó que sin colonización bacteriana no hay respuesta inflamatoria frente al hapteno TNBS, y las bacterias anaeróbicas son las responsables del desarrollo de lesiones más profundas y de mayor grado de respuesta inflamatoria después de la acción del TNBS^{83,84}.

Inflamación transmural

La estenosis es una complicación frecuente en la inflamación intestinal. Como se ha comentado, la administración de antibióticos de amplio espectro no absorbibles en el modelo del TNBS previene la formación de estenosis⁸⁰. Estas ratas tenían unos valores bajos de TGF- β 1 y una menor acumulación de colágeno en la pared inflamada que las ratas colíticas controles. La inyección de bacterias de la flora intestinal de la rata en la pared del colon estimuló la liberación de TGF- β 1 y depósito de colágeno. Este efecto se redujo con la sonicación previa de las bacterias. La inoculación de lactobacilos, especie predominante en la flora intestinal de la rata y humana, no inducía una respuesta inflamatoria significativa. La inyección de bacterias aeróbicas provocaba una notoria reacción inflamatoria aguda circunscrita en áreas focales de abscesos, y la estimulación de TGF- β 1 y el depósito de colágeno eran insignificantes. Por el contrario, la inyección intramural de bacterias anaeróbicas (*Clostridium ramosorum*, *B. fragilis* y *B. uniformis*) indu-

ieron una respuesta aguda de predominio granulocítico, con infiltración difusa de células mononucleares que envolvía la serosa y se asociaba con una acumulación de colágeno en el tejido⁸⁵. Estos datos sugieren que distintas especies bacterianas entéricas pueden diferir en su capacidad fibrogénica y en su respuesta inflamatoria, y que algunas bacterias anaerobias (predominantes en la flora colónica) poseen una mayor capacidad potencial de inducir una respuesta fibrogénica difusa cuando invaden la pared intestinal.

CONCLUSIONES

El estudio de modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal ha aportado una serie de conceptos importantes a nuestra comprensión de la naturaleza de la enfermedad inflamatoria humana. En primer lugar, sugieren que al igual que en la inflamación experimental –que puede aparecer en distintos modelos como consecuencia de diferentes defectos– son diversos los defectos que podrían llevar a la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal humana. En segundo lugar, los defectos inmunológicos que conducen a la colitis en los modelos animales se deben a una disregulación y no a una inmunodeficiencia; en este sentido, es importante tener presente que los ratones SCID o Rag^{-/-} no desarrollan una inflamación mucosa a menos que se les transfieran determinadas subpoblaciones de linfocitos procedentes de otros animales. En tercer lugar, hay una relación entre las vías inflamatorias que se activan y las características finales de la inflamación. Las vías inflamatorias activadas en la mayoría de modelos experimentales se caracterizan por una excesiva respuesta Th1; este tipo de respuesta parece guardar una relación con la observada en la EC humana. La otra vía inflamatoria común en modelos experimentales es el aumento de la actividad de células Th2; estos modelos tienden a producir un tipo de inflamación que remeda desde el punto de vista histológico la CU, pero en la enfermedad humana la activación de las vías inflamatorias es más compleja y no se corresponde con una activación Th2 pura.

La investigación en modelos animales de enfermedad inflamatoria sigue siendo de utilidad para identificar los aspectos de la respuesta inmune ligados a la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal, para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas, como el uso de moléculas bloqueadoras de citocinas o moléculas de adhesión, y la terapia génica. Finalmente, estos modelos pueden también ayudar a identificar anomalías genéticas, que son la base de la enfermedad humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109:1344-67.

2. Chalifoux LV, Bronson RT. Colonic adenocarcinoma associated with chronic colitis in cotton top marmosets, *Saguinus oedipus*. *Gastroenterology*. 1981;80:942-6.
3. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology*. 1994;107:1726-35.
4. Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP, et al. CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJ-Bir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med*. 1998;187:855-64.
5. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, et al. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*. 1998;43:71-8.
6. Pizarro TT, Arseneau KO, Cominelli F. Lessons from genetically engineered animal models XI. Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278:G665-G9G.
7. Burns RC, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Cominelli F, Ley K. Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology*. 2001;121:1428-36.
8. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978;17:135-150.
9. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*. 1992;102:1524-34.
10. Sharon P, Stenson WF. Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1985;88:55-63.
11. 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.
12. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995;182:1281-90.
13. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004;351:2069-79.
14. Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, et al. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. 1999;116:874-83.
15. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:24-32.
16. Hodgson HJ, Potter BJ, Skinner J, Jewell DP. Immune-complex mediated colitis in rabbits. An experimental model. *Gut*. 1978;19:225-32.
17. Ekstrom GM, Andersson SE. Plasma exudation, hyperaemia, and epithelial permeability in rats with oxazolone-induced colitis: modulatory effects of budesonide. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:190-7.
18. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med*. 1998;188:1929-39.
19. Whittle BJ. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology*. 1981;80:94-8.
20. Bjarnason I, Hopkinson N, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Gumpel JM, et al. Treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy. *Gut*. 1990;31:777-80.
21. Satoh H, Guth PH, Grossman MI. Role of bacteria in gastric ulceration produced by indomethacin in the rat: cytoprotective action of antibiotics. *Gastroenterology*. 1983;84:483-9.
22. Watt J, Marcus R. Experimental ulcerative disease of the colon in animals. *Gut*. 1973;14:506-10.

23. Onderdonk AB, Cisneros RL, Bronson RT. Enhancement of experimental ulcerative colitis by immunization with *Bacteroides vulgatus*. *Infect Immun*. 1983;42:783-8.
24. Ling KY, Bhalla D, Hollander D. Mechanisms of carrageenan injury of IEC18 small intestinal epithelial cell monolayers. *Gastroenterology*. 1988;95:1487-95.
25. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694-702.
26. Soriano A, Salas A, Salas A, Sans M, Gironella M, Elena M, et al. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAcCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Lab Invest*. 2000;80:1541-51.
27. Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, et al. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest*. 2002;82:597-607.
28. Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol*. 2004;76:537-44.
29. Bucy RP, Xu XY, Li J, Huang G. Cyclosporin A-induced autoimmune disease in mice. *J Immunol*. 1993;151:1039-50.
30. Sartor RB, Cromartie WJ, Powell DW, Schwab JH. Granulomatous enterocolitis induced in rats by purified bacterial cell wall fragments. *Gastroenterology*. 1985;89:587-95.
31. Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rats. *Gastroenterology*. 1993;104:759-71.
32. Schorle H, Holtzschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*. 1991;352:621-4.
33. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75:253-61.
34. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75:263-74.
35. Kawachi S, Jennings S, Panés J, Cockrell A, Laroux FS, Gray L, et al. Cytokine and endothelial cell adhesion molecule expression in interleukin-10-deficient mice. *Am J Physiol*. 2000;278:G343-G349.
36. Spencer DM, Veldman GM, Banerjee S, Willis J, Levine AD. Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. *Gastroenterology*. 2002;122:94-105.
37. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999;10:39-49.
38. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, et al. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med*. 1998;187:571-8.
39. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. 1999;10:387-98.
40. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat Genet*. 1995;10:143-50.
41. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*. 1993;75:274-82.
42. Takahashi I, Kiyono H, Hamada S. CD4+ T-cell population mediates development of inflammatory bowel disease in T-cell receptor alpha chain-deficient mice. *Gastroenterology*. 1997;112:1876-86.
43. Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ. T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*. 1997;150:91-7.
44. Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Ueno Y, et al. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol*. 1997;17:282-92.
45. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med*. 1998;187:389-402.
46. Freeden-Jeffrey U, Davidson N, Wiler R, Fort M, Burdack S, Murray R. IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol*. 1998;161:5673-80.
47. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol*. 1999;162:1884-8.
48. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 1990;63:1099-112.
49. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*. 1994;180:2359-64.
50. De Winter H, Cheroutre H, Kronenberg M. Mucosal immunity and inflammation (II). The yin and yang of T cells in intestinal inflammation: pathogenic and protective roles in a mouse colitis model. *Am J Physiol*. 1999;276:G1317-G1321.
51. Hollander GA, Simpson SJ, Mizoguchi E, Nichogiannopoulou A, She J, Gutiérrez-Ramos JC, et al. Severe colitis in mice with aberrant thymic selection. *Immunity*. 1995;3:27-38.
52. Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, Aichele P, Seiler P, Brandt U, et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity*. 1999;11:349-58.
53. Okamoto S, Watanabe M, Yamazaki M, Yajima T, Hayashi T, Ishii H, et al. A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in a rodent model of immune colitis. *Eur J Immunol*. 1999;29:355-66.
54. Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol*. 1995;25:2618-25.
55. Mizoguchi E, Mizoguchi E, Smith RN, Preffer FI, Bhan AK. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med*. 1997;186:1749-56.
56. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science*. 1994;266:1253-5.
57. Simpson SJ, Shah S, Comiskey M, De Jong YP, Wang B, Mizoguchi E, et al. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med*. 1998;187:1225-34.
58. Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*. 1998;114:1066-90.
59. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*. 1995;270:1203-7.
60. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol*. 1998;161:5733-44.

61. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 1999;129:1-14.
62. Panés J. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Pathophysiology.* 1999;5:271-82.
63. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression *in vivo*. *Am J Physiol.* 1995; 269:1955H-64H.
64. Sans M, Salas A, Soriano A, Prats N, Gironella M, Pizcuetta P, et al. Differential role of selectins in experimental colitis. *Gastroenterology.* 2001;120:1162-72.
65. Conner EM, Brand S, Davis JM, Laroux FS, Palombella VJ, Fuseler JW, et al. Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;282:1615-22.
66. Kawachi S, Cockrell A, Laroux FS, Gray L, Granger DN, Van der Heyde HC, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *American Journal of Physiology.* 1999;277: 572G-6G.
67. Hoult JR, Moore PK, Marcus AJ, Watt J. On the effect of sulphasalazine on the prostaglandin system and the defective prostaglandin inactivation observed in experimental ulcerative colitis. *Agents Actions Suppl.* 1979;232-44.
68. Zipser RD, Patterson JB, Kao HW, Hauser CJ, Locke R. Hypersensitive prostaglandin and thromboxane response to hormones in rabbit colitis. *Am J Physiol.* 1985;249: 457G-63G.
69. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1989;96:29-36.
70. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology.* 1989;97: 326-37.
71. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodríguez R, Malagelada JR. Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology.* 1990;98:269-77.
72. Nielsen OH, Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;216:149-59.
73. Videla S, Vilaseca J, Casellas F, Guarner F. Eicosanoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol.* 1991;14:25-34.
74. Barrachina MD, Panés J, Esplugues JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des.* 2001; 7:31-48.
75. Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld RA, Hsueh W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB J.* 2001;15:439-46.
76. Fiocchi C. Cytokines and animal models: a combined path to inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 1993;104:1202-5.
77. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology.* 1998;115:182-205.
78. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.* 1997;337:1029-35.
79. Videla S, García-Lafuente A, Antolin M, Vilaseca J, Guarner F, Crespo E, et al. Antitumor necrosis factor therapy in rat chronic granulomatous colitis: critical dose-timing effects on outcome. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287:854-9.
80. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Treserra F, Crespo E, et al. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut.* 1994;35:1090-7.
81. Morrissey PJ, Charrier K. Induction of wasting disease in SCID mice by the transfer of normal CD4+/CD45RBhi T cells and the regulation of this autoreactivity by CD4+/CD45RBlo T cells. *Res Immunol.* 1994;145:357-62.
82. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, González G, Antolin M, et al. Stimulation of mucosal inflammatory activity by the normal fecal flora in a rat model of colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 1997;3:191-7.
83. García-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Derangement of mucosal barrier function by bacteria colonizing the rat colonic mucosa. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:1019-26.
84. García-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, et al. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol.* 1997; 272:10G-5G.
85. Mourelle M, Salas A, Guarner F, Crespo E, García-Lafuente A, Malagelada JR. Stimulation of transforming growth factor beta1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis. *Gastroenterology.* 1998;114:519-26.