

Revisión

Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal. Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad

J. Mañé Almero

Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Barcelona. España.

Resumen

No existe un modelo animal ideal para el estudio de patologías humanas como la EII o el CCR. En la última década, a los modelos inducidos por agentes exógenos se han incorporado los animales manipulados genéticamente. Los modelos experimentales de EII reproducen procesos inflamatorios intestinales heterogéneos, al igual de sucede en el ser humano. Mientras que los modelos de CCR remedan las mutaciones halladas en el hombre aunque con repercusiones fenotípicas diferentes. En ambos casos, estos sistemas experimentales son influidos por la genética y el ambiente. Hoy por hoy, los modelos animales son unos valiosos bioensayos, complejos y completos, para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas en la EII (IL-10, anti-IL-12, probióticos) y agentes protectores de la CCR (ácidos grasos n3, AINES y inhibidores de COX-2).

(*Nutr Hosp.* 2007;22:178-89)

Palabras clave: *Modelo animal ideal.*

IN VIVO EXPERIMENTAL MODELS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND COLORECTAL CANCER

Abstract

There is no ideal animal model for the study of human pathologies such as IBD or CRC. For the last decade, genetically engineered animal models have been incorporated to models induced by exogenous agents. Experimental models of IBD reproduce heterogeneous intestinal inflammatory conditions, as it occurs in the human being, whereas CRC models imitate those mutations found in man although with different phenotypic repercussions. In both cases, these experimental systems are influenced by genetics and the environment. Today, animal models represent valued, complex, and complete bioassays for the study of new therapeutic strategies in IBD (IL-10, anti-IL-12, probiotics) and protective agents in CRC (n-3 fatty acids, NSAIDS, and COX-2 inhibitors).

(*Nutr Hosp.* 2007;22:178-89)

Key words: *Ideal animal model.*

Introducción

Los mecanismos implicados en la iniciación y perpetuación de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) no se conocen con exactitud, aunque se ha sugerido como principales componentes patológicos la susceptibilidad genética, el sistema inmunológico y el ambiente, principalmente la flora bacteriana intestinal.

Correspondencia: Josep Mané Almero
Servicio de Aparato Digestivo
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Fundació Institut d' Investigació en Ciències de la Salut GTiP
Ctra. Canyet, s/n (Camí de les Escoles)
08916 Badalona (Barcelona)
E-mail: j_maney@yahoo.es
udpde@yahoo.es

Recibido: 2-XI-2006.
Aceptado: 9-XI-2006.

A pesar que no existen modelos animales que reproduzcan con fidelidad la etiopatogenia de la EII, el conocimiento adquirido a través de estos estudios experimentales nos ha permitido comprender aspectos relacionados con la aparición del brote inflamatorio y con el curso de la patología humana. Además, la mayoría de modelos experimentales de inflamación intestinal permiten hacer aproximaciones a nuevas estrategias terapéuticas en fase preclínica.

A diferencia de lo que sucede en la EII, los mecanismos moleculares y celulares asociados a la carcinogénesis colorrectal humana (CCRh) se encuentran algo más caracterizados. En consecuencia, este conocimiento permite una equiparación más ajustada entre el modelo experimental y la CCRh. Aunque los cambios mutacionales asociados al desarrollo oncológico intestinal en animales no coincide exactamente con el humano, ambos procesos carcinogénicos se

asocian a mutaciones de genes clave en el control del ciclo celular y muestran una gran proximidad fenotípica. Los modelos experimentales *in vivo* de CCRh se han utilizado como bioensayos para el estudio de sustancias potencialmente protectoras frente a la carcinogénesis colorrectal¹⁻³. Además, en los modelos animales de CCRh se han contrastado evidencias epidemiológicas sobre los efectos de diferentes elementos nutricionales en la incidencia de cáncer colorrectal⁴⁻⁶. De la misma manera, los modelos experimentales de carcinogénesis intestinal también nos han permitido interpretar acontecimientos epigenéticos relacionados con determinadas mutaciones⁴.

En las últimas décadas la introducción de técnicas de manipulación genética en los laboratorios de fisiología animal ha permitido crear nuevos modelos experimentales. Hoy en día disponemos de modelos en ratas y ratones que pueden sobreexpresar o silenciar una proteína concreta. Existen interesantes modelos experimentales de EII con animales transgénicos que sobreexpresan proteínas como la HLA-B27 humana, el STAT4 o la IL-7 y que muestran una elevada susceptibilidad a cambios en la ecología bacteriana del intestino⁷⁻⁹. Por otra parte, la delección del gen *APC* genera un modelo experimental en ratones que remeda a la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)². En los nuevos modelos en ratones de EII con mutaciones homocigotas y heterocigotas (knock-out, KO) se da la circunstancia que una alteración genética favorece una inadecuada respuesta inmunológica a diferentes estímulos ambientales. A pesar de las diferencias sustanciales entre la enfermedad humana y la patología animal, existen similitudes a tener en cuenta. Los diversos polimorfismos del gen *NOD2/CARD15* predisponen a padecer la Enfermedad de Crohn (EC) y afectan a la funcionalidad de proteínas relacionadas con el reconocimiento antigénico¹⁰. Al igual que sucede en los estudios sobre la EII en humanos, aspectos como la alteración de la flora bacteriana intestinal o la pérdida de hábitos dietéticos saludables pueden agravar la enfermedad inflamatoria intestinal en animales. Los modelos de ratones KO son una poderosa herramienta que nos permiten estudiar las repercusiones biológicas de una mutación concreta. Por ello, las líneas de ratones con mutaciones en genes relacionados con los mecanismos de reparación de errores de replicación del ADN (*Msh*, *Mlh*) son un excelente modelo para el estudio del Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipoide (CCHNP)¹¹⁻¹³. También existen modelos de ratones dobles mutantes como IL-10 (-/-)/iNOS (-/-) o *Apc* (+/-)/ *COX-2* (-/-) que nos permiten estudiar el papel de ciertas proteínas en el proceso inflamatorio o tumoral¹⁴.

Por otra parte, los modelos con ratones atímicos a los que se les inoculan células tumorales o inmunes, de diversa procedencia, constituyen un elegante modelo *in vivo* que recrea las condiciones de un sistema tan complejo como el humano. En estos modelos de ratones inmunodeprimidos se intenta esclarecer las in-

teracciones entre diferentes estirpes de linfocitos o caracterizar la capacidad invasiva de tumores *xeno* o *alotrasplantados*^{3,15,16}.

De forma similar a lo que sucede en humanos, en algunos modelos experimentales de EII aparecen fenómenos oncogénicos en las fases más tardías de la colitis. Existen modelos inducidos, como la administración de Sulfato de Dextrano Sódico (DSS), o combinados, DSS/carcinógeno, que representan una aproximación al estudio de la secuencia inflamación-cáncer en el intestino^{17,18}. Asimismo, muchos modelos de colitis natural o espontánea presentan una elevada incidencia de adenocarcinomas intestinales en las fases más avanzadas de la enfermedad (Tití de cabeza de algodón o los ratones KO de IL-10, Rag2, $G_{\alpha i2}$, o dobles mutantes como Rag2/TGF β 1, TCR β /p53, IL-2/ β 2M)¹⁹⁻²².

Básicamente los modelos animales para el estudio de la EII o del CCRh los podemos clasificar en dos categorías: modelos inducidos y modelos espontáneos. Sin embargo, bajo la denominación de modelos espontáneos se engloban modelos con rasgos bien diferenciados entre ellos. En particular, los modelos producidos por manipulación genética, los de trasplante tumoral o celular en ratones inmunodeficientes y los modelos naturales. Los modelos inducidos por la administración diversos agentes químicos adquirieron relevancia por ser relativamente baratos, fácilmente manipulables y razonablemente reproducibles. Estos modelos inducidos han contribuido indudablemente al conocimiento de la patogénesis de la enfermedad humana. Con la llegada de los animales manipulados genéticamente, a pesar de encarecer el modelo experimental, se ha producido un paulatino abandono de algunos modelos inducidos. El hecho de presentar rasgos genotípicos y fenotípicos parecidos a los mostrados por la patología humana es uno de los motivos del auge de modelos experimentales con ratones KO.

Los ratones KO no son la única posibilidad experimental para bloquear la expresión de un gen determinado. La administración de ARN de interferencia atenúa la transducción proteica en ratones. Este procedimiento experimental, a la vez, puede contribuir a la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas sobre modelos *in vivo* de EII y CCRh^{23,24}. Además, los modelos animales no pueden ceñirse exclusivamente a la experimentación en roedores. Contribuciones importantes al conocimiento de la patología inflamatoria y neoplásica humana han surgido a partir de trabajos realizados con invertebrados. Estudios desarrollados en *Drosophila melanogaster* nos han permitido conocer la implicación de los receptores como *toll-like* en la respuesta inmune innata o el reconocimiento de proto-oncogenes (β -catenina) en la vía de señalización Wnt o MutS²⁵⁻²⁸. Aunque estos modelos animales no encajan en la clasificación anterior, representan unos sistemas excelentes para el estudio de los mecanismos moleculares ligados a la patología humana.

A pesar del amplio abanico de posibilidades para el estudio de la EII o CCRh en los modelos *in vivo* actuales, la elección de este ha de contemplar varios aspectos experimentales claves. Un hecho relevante es la variabilidad intra e interespecie en la susceptibilidad y curso de la patología intestinal en los animales²⁹. Por otra parte, un agente inductor dado puede mostrar diferencias en la iniciación y progresión de la enfermedad animal en función de la dosis, la cadencia, la vía de aplicación e incluso entre diferentes lotes de producto. Las patologías intestinales se encuentran claramente influenciadas por el ambiente. Así pues, los criterios de estabulación de los animales han de considerar el control de las condiciones ambientales. Un ejemplo de ello lo constituye la ausencia de lesiones intestinales en ratones IL-10 (-/-) mantenidos en condiciones de completa esterilidad, a diferencia de los KO estabulados en condiciones libres de patógenos que presentan lesiones restringidas al colon distal y que pueden agravarse en animales mantenidos en condiciones ambientales convencionales o con infecciones por enteropatógenos^{20,21,30}.

Los modelos experimentales *in vivo* nunca pueden llegar a sustituir al ser humano como modelo paradigmático para el estudio de la EII y la CCRh, pero consideraciones éticas obvias hacen que, hoy por hoy, estos modelos animales tengan una gran vigencia.

Desde diferentes organismos se han regulado los estudios con animales de experimentación atendiendo a consideraciones éticas sobre bienestar animal. Es importante que estos sistemas experimentales se ajusten a dichas Normativas³¹. Además, la unificación de los procedimientos con el objetivo de mitigar el impacto que puedan tener sobre el animal, facilitan la equiparación de los resultados obtenidos entre laboratorios diferentes.

Modelos animales de EII y su aplicabilidad

Actualmente, se están definiendo diferentes componentes que contribuirían a la iniciación y perpetuación de la EII³². No obstante, en ningún caso los modelos animales de los que disponemos muestran un completo grado de coincidencia etiológica y patológica con la enfermedad humana. Por tanto, es fundamental conocer las cualidades y limitaciones de cualquier modelo *in vivo* de EII. De esta forma, la idoneidad del modelo elegido será determinada por sus características y por los objetivos del estudio.

Modelos inducidos de colitis experimental

Estos modelos están siendo utilizados desde la década de los 80 en el estudio de la fisiopatología de la EII³³. Entre las diferentes sustancias inductoras podemos distinguir agentes químicos, polisacáridos sulfatados e inmunocomplejos microbianos, así como elementos farmacéuticos (tabla I). Los estudios llevados a cabo mediante estos modelos experimentales han fo-

calizado su atención en mecanismos de inmunidad innata (células presentadoras de antígeno, neutrófilos, moléculas del complemento y citotoxicidad), inflamación no específica (eicosanoides, mieloperoxidasa, citocinas y radicales libres de oxígeno) y reparación (fibrosis y factores de crecimiento)²⁹. En general son modelos influenciados por la flora bacteriana intestinal y por diversos componentes dietéticos³⁴⁻⁴⁰. Suelen ser altamente reproducibles y las especies animales empleadas, principalmente rata y ratón, fácilmente manipulables. La colitis experimental puede inducirse mediante la administración de enemas intracolónicos de ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS)/Etanol y Oxazolona. Otras vías de administración son la oral para los polímeros y polisacáridos sulfatados y la subcutánea para la ciclosporina e indometacina. Las colitis inducidas de forma oral cursan con una fase aguda que puede durar entre una y varias semanas, mientras que las colitis inducidas por enemas la fase aguda se limita a unos 3 días post-inducción²⁹. En este instante se observa un aumento de ciertos marcadores inflamatorios que se correlacionan con la gravedad del proceso inflamatorio intestinal. Estos mediadores inflamatorios provienen del metabolismo del ácido araquidónico (eicosanoides, COX), del metabolismo oxidativo (metabolitos reactivos de oxígeno, iNOS, mieloperoxidasa, etc.) y de reacciones inmunológicas a nivel intestinal (citoquinas, factores de crecimiento). En general, el proceso inflamatorio intestinal evoluciona sin aparición de nuevos brotes llegando a resolverse de forma espontánea.

Tradicionalmente, la colitis inducida por inmunocomplejos, carragenina o péptidoglicano-polisacárido se ha empleado en el estudio de las alteraciones inmunológicas intestinales. En el primero se ha demostrado la capacidad lesiva de neutrófilos y macrófagos activados por el complemento en el intestino de ratas⁴¹. En la colitis inducida por carragenina se produce una lesión cecal y colónica que reviste características crónicas. Las bacterias anaeróbicas luminales y *Bacteroides vulgatus* se han implicado en la patogénesis de esta colitis experimental³⁹. Por otro lado, los péptidoglicanos-polisacáridos procedentes de la pared de bacterias *gram*-positivas y *gram* negativas inyectados en diferentes tramos del intestino de la rata provoca después de 9 o 11 días la aparición de una enterocolitis granulomatosa, discontinua y transmural^{42,43}. Este modelo muestra una elevada variabilidad del proceso inflamatorio intestinal en función de la cepa de rata empleada y la implicación de linfocitos T, macrófagos, IL-1, TNF, la molécula de adhesión MadCAM-1 y el óxido nítrico en la fisiopatología inflamatoria⁴²⁻⁴⁵.

Algunos de los modelos de colitis inducida se basan en características farmacológicas de los agentes empleados. La indometacina puede ser administrada a los animales de forma oral o subcutánea, el mecanismo patogénico se basa en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, lo que repercute negativamente en el mantenimiento de la función barrera mucosa intesti-

Tabla I
Características de los modelos animales inducidos de EII

Ac. acético	Inmunocomplejos	TNBS/Etanol	Oxazolona	PG-PS	Carragenina	DSS	Ciclosporina	Indometacina
enema	enema/i.v.	enema	enema	Intra-mural	oral	Oral (ciclos)	s.c.	s.c/oral
Rata, ratón conejo, cabaya	Conejo, rata	Rata, ratón, conejo	Rata, ratón	Rata	Cobaya, rata, ratón	Rata, ratón, hámster	ratón	Rata, ratón, perro
	Colon distal y recto (distribución continua)			Colon proximal y ciego (discontinua)	(continua)	Colon (continua)		Intestino delgado (discontinua)
Fase crónica: No		Fase aguda hasta 3 días post-inducción 8 semanas (ratas) 2-3 semanas (ratón)		1-3 semanas	3-6 semanas	7-10 días 2-3 semanas (12 semanas)	2 semanas 1-4 semanas	2-3 días 7-10 días (R. Fisher) 11 semanas (R. Lewis)
Mucosa transmural	Mucosa > submucosa	Transmural (granulomas)	Mucosa > submuc.	transmural		Mucosa y submucosa	transmural	transmural
Lesión por ácido orgánico.	Activación del complemento.	Reacción de hipersensibilidad	Reacción de hipersensibilidad	Activación de macrófagos y células T.	Erosión epitelial con disfunción de macrófagos.	Erosión epitelial con disfunción de macrófagos.	Activación de células T.	Inhibición de la síntesis de PGE2 y PGI2
Valores elevados de IL-1, LTB4, PGE2, TXB2, ON, histamina, PAF	Valores elevados de IL-1, IL-1R, LTB4, PGE2.	retardada por alérgeno. Valores elevados de IL-1, IL-6, IL-12, IFN, TNF PGE2, LTB, ON.	por contacto. Valores elevados de IL-4 y IL-5	Valores elevados de PGE2, ON, IL-1, IL-6, IGF1 y lkb	Valores elevados de PGE2 y TXB2	Valores elevados de PGE2, TXB2, LTB4, IL-2, IL-4, y IL-6	Valores elevados de IFN, IL-1, TNF.	
Influencia bacteriana: No	No	Sí (etapas de cronificación)	?	Sí	Sí	Sí	?	Si (etapas de cronificación)
Reproducibilidad: 100%	90%	90-100% (ratas) 60-80% (ratón)	?	80-95%	90%	100%	?	90-100%
Características	CU	EC	CU	EC	CU	CU	CU	EC

CU: colitis ulcerosa.

EC: Enfermedad de Crohn.

nal⁴⁶. Los animales genéticamente más susceptibles pueden prorrogar el proceso inflamatorio crónico hasta 11 semanas (ratas Lewis) con la aparición de úlceras que se distribuyen de forma discontinua a lo largo del intestino delgado. Otra colitis medicamentosa que, al igual que la anterior, puede ser inducida vía subcutánea o vía oral es la que se consigue con ciclosporina A. Concretamente, los ratones previamente irradiados reciben médula ósea libre de células T maduras y son tratados con ciclosporina A. La finalización del tratamiento inmunosupresor reactiva la susceptibilidad del injerto contra el huésped y esto se traduce en la aparición de un síndrome inflamatorio que afecta, entre otros órganos, al intestino⁴⁷. En estos modelos se ha observado la determinante influencia de la flora intestinal en el desarrollo de esta colitis experimental^{48,49}. Estos modelos han proporcionado un acercamiento en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de las células T⁴⁹.

Entre los modelos de colitis experimental más empleados en la actualidad destacan la colitis inducida por TNBS y la inducida por DSS. A diferencia de la colitis inducida por enemas diluidos de ácido acético⁵⁰, en la colitis inducida por TNBS o DSS se puede distinguir una fase aguda inicial que puede evolucionar hacia un proceso inflamatorio de característi-

cas crónicas con presencia de estenosis, adherencias, engrosamiento de la pared intestinal, diarrea sanguinolenta y una significativa pérdida de peso de los animales.

Colitis inducida por TNBS

La colitis inducida por instilación intrarrectal de un enema de TNBS con etanol diluido fue descrito por primera vez en ratas por *Morris y cols.*⁵¹. Este modelo se ha reproducido en otras especies animales como en ratones y conejos²⁹. En general, existe una variabilidad en el curso clínico de esta patología entre cepas de animales de la misma especie y entre diferentes especies. Un sólo enema de TNBS llega a provocar una colitis de hasta 8 semanas de duración en las líneas de ratas más susceptibles, mientras que los ratones se muestran más resistentes a la inducción de la lesión intestinal^{29,51}. El enema de TNBS/etanol provoca una lesión continua, restringida al colon distal, con importantes áreas de necrosis y de afectación transmural (fig. 1). Se ha sugerido un mecanismo patogénico basado en la capacidad del etanol en debilitar la barrera mucosa, lo que facilitaría el contacto entre antígenos lumbales colónicos y la *lamina propria*⁵¹. Consecuentemente, se iniciaría una fase inicial con la participa-

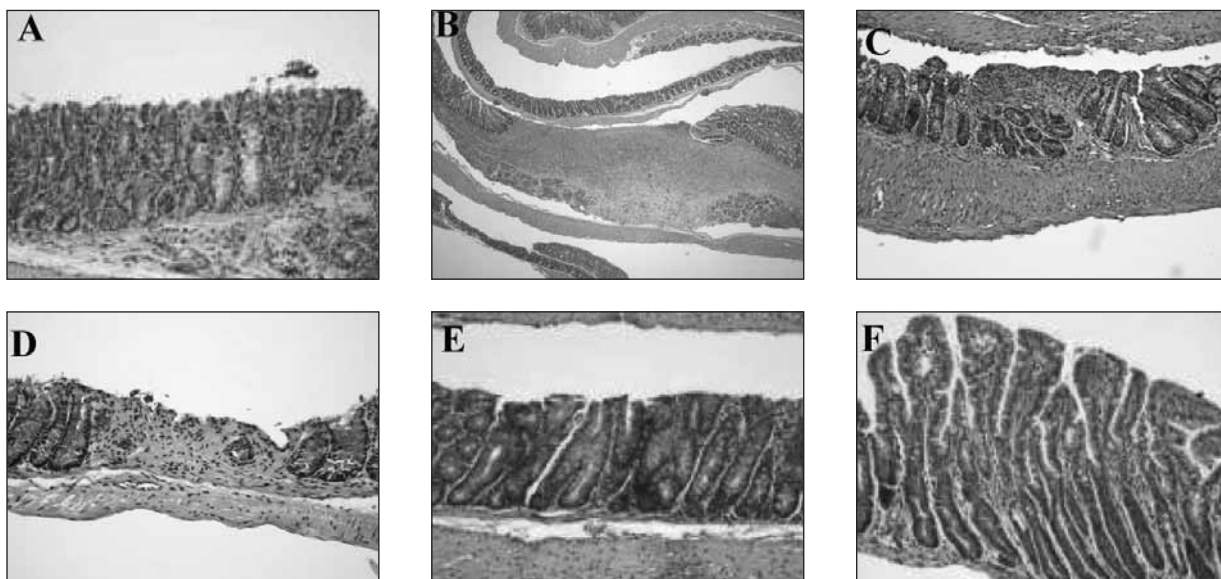


Fig. 1.—Lesiones colónicas observadas en ratones inducidos con 1 mg de TNBS/Etanol (50% v/v). A y C) Áreas de necrosis, criptitis, engrosamiento de la capa muscular e intenso infiltrado agudo. B-D) Úlceras delimitadas, de afectación transmural e intenso infiltrado mononuclear. E, F) Fenómenos de hiperplasia.

ción de macrófagos y neutrófilos activados por una gran variedad de estímulos que generan grandes cantidades de metabolitos altamente reactivos de oxígeno^{51,52}. Los efectos deletéreos pueden verse agudizados por la causticidad propia del TNBS que puede generar sustancias poderosamente citotóxicas como O_2^- y H_2O_2 ⁵³. Adicionalmente, el TNBS (hapteno) puede modificar la estructura de proteínas de la superficie celular por su capacidad de unirse covalentemente a residuos de lisina y tirosina. Esto provoca una inmunoreactivación por parte de macrófagos y linfocitos T semejante a una reacción de hipersensibilidad retardada por alérgeno^{53,54}.

Numerosos estudios han evaluado diversas terapias farmacológicas con este modelo experimental^{55,56}. Estudios nutricionales han mostrado la capacidad de los ácidos grasos n3 de atenuar el proceso inflamatorio^{57,58}, tal vez mediado a través de la modulación de la síntesis de LTB_4 ³⁸. Antioxidantes, bacterias probióticas y prebióticos, también se han mostrado eficaces para reducir la lesión inducida por TNBS/etanol⁵⁹⁻⁶¹. En definitiva, a pesar de las evidentes diferencias etiopatológicas entre el proceso inflamatorio intestinal inducido por TNBS y la EII, por su simplicidad y reproducibilidad este modelo animal es de los más citados en el estudio de los procesos inflamatorios intestinales.

Colitis inducida por DSS

A diferencia de la colitis experimental inducida por TNBS, más semejante a la EC por el carácter transmural de las lesiones intestinales^{29,51}, la administración de

concentraciones variables de DSS en el agua de beber provoca en ratones, ratas y hámsters lesiones colónicas que remedan a la Colitis Ulcerosa (CU). Las lesiones afectan a la mucosa y submucosa intestinal con presencia de ulceraciones, más evidentes en el colon izquierdo y que progresan distalmente. Cuando la administración oral de DSS se lleva a término de forma cíclica, los ratones llegan a desarrollar una colitis crónica que se puede prolongar varias semanas después del cese de la administración. Las lesiones crónicas suelen caracterizarse por la presencia de prominentes folículos linfoides y presencia de displasia epitelial. Consecuentemente, en las fases más avanzadas de este proceso inflamatorio intestinal, los animales tratados con DSS muestran una elevada incidencia de cáncer colónico¹⁷. El DSS es un polímero sulfatado con capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos. Además, el DSS enteral favorece el aumento de bacterias anaeróbicas gram-negativas, lo que junto con el potencial erosivo sobre la barrera intestinal y la inapropiada respuesta de los macrófagos propiciaría la aparición de las lesiones intestinales^{29,33}.

En este modelo se ha observado la decisiva influencia de la flora intestinal en el desarrollo de las lesiones intestinales. En general, los tratamientos con antibióticos, prebióticos y probióticos consiguen mitigar la capacidad lesiva del DSS³⁴. La administración dietética de sustancias antioxidantes como vitaminas o incluso ácidos grasos dietéticos n3 disminuyen la lesión colónica paralelamente con un descenso en la producción local de LTB_4 , óxido nítrico y de citocinas proinflamatorias³⁵⁻³⁷.

Modelos animales de colitis espontánea

A diferencia de los modelos animales anteriores, los modelos espontáneos representan una aproximación razonable al estudio de los factores que predisponen a padecer la EII. En estos modelos experimentales mutaciones en genes clave del sistema inmune conducen a procesos inflamatorios intestinales de diversa índole. En general, la sintomatología inflamatoria se intensifica progresivamente hasta la muerte del animal. El Tití de cabeza de algodón (*Sanguinus oedipus*) desarrolla de forma natural una colitis crónica, recurrente e influenciada por el estrés que sufren en cautividad. En su patogénesis se han implicado alteraciones del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y en genes relacionados con la producción de mucina¹⁹. De forma parecida, ratones C3H/HeJ cruzados de forma selectiva desarrollan un proceso inflamatorio espontáneo en el colon derecho, con presencia de ulceraciones perianales y coincidente con la colonización bacteriana del intestino⁶². Por otro lado, en las ratas transgénicas HLA-B27/β2m se ha puesto de manifiesto la participación de moléculas de clase I del MHC en un síndrome inflamatorio sistémico que provoca colitis y artritis principalmente⁶³.

Deleciones homocigotas en genes que codifican para receptores de células T (TCRα), TCRβ, TCRβδ y proteínas de clase II del MHC provocan una inflamación colónica crónica con prolapso anorrectal y sin ulceraciones ni diarrea sanguinolenta hacia los 3 ó 4 meses de vida⁶⁴. Se ha sugerido un mecanismo patogénico basado en el descenso en la tolerancia a antígenos dietéticos o microbianos debido a la incapacidad de las células CD4⁺ [TCRα (-/-) o TCRβ (-/-)] de suprimir la actividad de las células B productoras de inmunoglobulinas que, eventualmente, producirían un ataque de características autoinmunes contra el propio epitelio colónico⁶⁵. De forma parecida, los ratones KO de Gα₁₂ desarrollan una pancolitis entre las semanas 8 y 12 de vida⁶⁶. Las lesiones intestinales son más graves en el colon distal y en las etapas más avanzadas pueden aparecer perforaciones y adenocarcinomas intestinales. La familia de proteínas G es esencial en la transmisión citoplasmática de señales extracelulares capaces de regular la maduración de células inmunocompetentes y la producción de TNF⁶⁷. En el colon de ratones Gα₁₂ (-/-) se ha observado un aumento de células CD4⁺ y una elevada producción de inmunoglobulinas G y M⁶⁸.

Se han generado varios modelos de ratones con mutaciones en genes de citocinas para el estudio de sus funciones biológicas *in vivo*. Entre estos modelos de ratones KO destacan los deficientes para la IL-2 y para la IL-10 por desarrollar una enterocolitis espontánea altamente reproducible e influenciada por el ambiente^{30,69}. Asimismo, ratones portadores de mutaciones que afectan a moléculas de la vía de señalización de la IL-10 (STAT3 y CRF2-4) o a la producción de TGFβ₁ o TNFα también cursan con inflamación in-

testinal. En los primeros, existe un cierto grado de similitud fenotípica con la enterocolitis de los ratones IL-10 (-/-), mientras que las mutaciones en TGFβ₁ o TNFα provocan un proceso inflamatorio multiorgánico⁷⁰⁻⁷³.

Los ratones IL-2 (-/-) sufren un progresivo proceso inflamatorio intestinal con una elevada mortalidad entre los dos y los tres meses de vida. La colitis se desarrolla con diarrea crónica, intermitentemente sanguinolenta, y con prolapso rectal. Las lesiones se distribuyen de forma continua en el colon distal principalmente, afectando a la mucosa y submucosa. Histológicamente, presentan importantes áreas de ulceración, depleción de células mucilaginosas, hiperplasia y abscesos en las criptas intestinales⁶⁹. La etiología de la inflamación intestinal en ratones IL-2 (-/-) es similar a la de los ratones con mutaciones en TCR⁶⁵, aunque en los ratones IL-2 (-/-) la estimulación antigénica por parte de la flora intestinal no patógena es esencial para la aparición de colitis⁷⁴. Los animales deficientes para la IL-2 muestran similitudes patológicas con la CU. En ambas patologías, la mucosa colónica contiene un elevado número de células T (no TCRγδ⁺) y B activadas y un patrón similar de citocinas^{69,75}.

En ratones con una mutación bialélica en el gen de la IL-10 aparece una inflamación intestinal hacia las 12 semanas de vida. Esta patología es especialmente intensa si los animales están en contacto con enteropatógenos potenciales³⁰. En cambio, los ratones mantenidos en condiciones de máxima esterilidad no desarrollan colitis. Las cepas más sensibles de ratones IL-10 (-/-) pueden desarrollar una pancolitis acompañada de anemia y una significativa pérdida de peso corporal. Histológicamente destaca la presencia de lesiones transmuralas y la pérdida de la función barrera intestinal^{29,30}. En los ratones deficientes para la IL-2, la respuesta infamatoria es de tipo Th-2 (con niveles colónicos elevados de IL-4), mientras que los ratones KO de IL-10 son incapaces de atenuar la respuesta Th-1 (con niveles colónicos elevados de INF, TNF y IL-12)^{20,29,76}. Se ha sugerido que macrófagos y linfocitos CD4⁺ activados por diferentes componentes luminales son los principales causantes de la colitis en los ratones IL-10 (-/-). Las características inmunopatológicas de este modelo de colitis espontánea remedian la EC. La colitis experimental inducida por TNBS también tiene ciertas características comunes con la enterocolitis en ratones IL-10 (-/-). No obstante, este último no requiere de la iNOS y si de la presencia de IFN para la iniciación del proceso inflamatorio intestinal^{14,76}. Además, el 60% de los animales mantenidos en condiciones convencionales desarrollan tumores colónicos en las fases más avanzadas de la enfermedad⁷⁷.

Diferentes aproximaciones terapéuticas se están llevando a cabo en estos modelos de colitis experimental espontánea. El bloqueo de ciertas citocinas pro-inflamatorias (p. ej.: IL-12) se han mostrado eficaces en el tratamiento de la colitis en los ratones IL-10 (-/-)⁷⁸.

Contrariamente, los antiinflamatorios no esteroideos contribuyen a exacerbar la inflamación intestinal en este modelo⁷⁹. En estos modelos, altamente sensibles a las alteraciones de la flora bacteriana, el tratamiento con *Lactobacillus sp.* tiene un efecto preventivo en la aparición de la colitis.⁸⁰ Resultados recientes de nuestro laboratorio relacionan la disminución de los ácidos grasos n6 dietéticos con una mejor evolución de la colitis en ratones IL-10 (-/-)⁸¹.

Colitis inducida mediante transferencia de linfocitos

Los ratones inmunodeficientes SCID y Rag2(-/-) tienen una mutación que les provoca la deficiencia de células T y células B^{15,82}, mientras que la cepa de ratones transgénicos TγE23 carecen totalmente de células T y células NK⁸³. En estos sistemas experimentales aceptan la transferencia de ciertas estirpes celulares y permiten estudiar su papel fisiopatológico en la EII.

Los ratones TγE23 desarrollan colitis al ser trasplantados con médula ósea procedente de ratones normales⁸³. La patogénesis de esta colitis experimental se basa en la maduración aberrante de células T (células T TCRαβ⁺ y TCRγδ⁺) y células NK que provoca en los huéspedes un proceso inflamatorio de características Th-1⁸⁴. Por otro lado, la colitis inducida en ratones SCID al reconstituirlos con células T CD4⁺RB^{high} no se produce si se co-administran con células T CD4⁺RB^{low} y CD8⁺¹⁵. De la misma manera, las células productoras de IL-10 y TGFβ también pueden prevenir la colitis por transferencia de células T reactivas en estos ratones atímicos^{76,85}. Además, el tratamiento de los animales inmunodeprimidos con anti-TNF o anti-IFN consigue atenuar la colitis inducida por transferencia de células CD4⁺RB^{high}⁸⁶. Los linfocitos de la lamina propia CD4⁺TCRαβ⁺ se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad inflamatoria en ratones IL-10 (-/-) y en humanos por inducir un proceso inflamatorio intestinal de tipo Th-1 en ratones Rag2(-/-) y SCID^{87,88}.

En cualquier caso, una característica destacable de estos animales atímicos es la necesidad de la presencia de la flora intestinal para activar el proceso inflamatorio¹⁵.

Modelos animales de CCRh

Existe una larga trayectoria en el estudio de potenciales agentes protectores frente a la CCRh en modelos animales inducidos por carcinógenos, en ratones KO de diferentes oncogenes y en ratones inmunodeficientes *xeno* o *alotrasplantados* con células tumorales¹⁻⁶. La incidencia de tumores colónicos es el principal parámetro evaluado en estos sistemas experimentales. Si bien, otros marcadores intermedios han permitido determinar los mecanismos de progresión y promoción tumoral. Se ha sugerido que el equilibrio entre proliferación y apoptosis es crucial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal⁵. El aumento en la actividad de la Ornitina Decarboxilasa y de la PKC-β2, así como la expresión de diversos proto-oncogenes (*c-myc* y *ciclina D1*) se ha relacionado con un aumento de la proliferación del epitelio intestinal^{5,90,91}. Del mismo modo, el metabolismo del ácido araquidónico (COX-2, prostaglandina E₂ y sus receptores) y oxidativo (Nitritos/Nitratos, iNOS) se ha implicado en etapas de promoción y progresión tumoral en modelos animales de CCRh^{3,90,92}. Por otra parte, los focos de criptas aberrantes (FCA) son lesiones intestinales preneoplásicas que aparecen después de la administración de carcinógenos en las ratas. Los FCA contienen criptas con una abertura luminal alterada y la capa epitelial engrosada. Destacan sobre el resto de criptas normales por su mayor tamaño y por la existencia de una separación pericriptal⁹¹. En los FCA aparece una elevada actividad proliferativa, en algunas ocasiones fenómenos de displasia y mutaciones frecuentes en *K-ras* (tabla II)^{89,91}. Además, estas lesiones premalignas se consideran precursoras del desarrollo adenoma-car-

Tabla II
Alteraciones genéticas en diferentes modelos de cáncer

Especie	Carcinógeno	Lesión	APC	β-catenina	K-ras	DCC	p53
Hombre		Adenocarcinoma	40-80	15	40-60	40-70	50-80
		Adenoma	40-65	-	0-40	-	-
		FCA	< 5	-	10-95	-	-
Rata	AOM	Adenocarcinoma	8	75	30-60	-	0
		FCA	0	-	20-40	-	0
Ratón	PhIP	Adenocarcinoma	13	50	0	-	0
	AOM	Adenocarcinoma	-	100	0-10	-	-

AOM: azoximetano.

PhIP: 2 amino-1-metil-6-fenilimidazol (4,5b) piridina

FCA: Focos de Criptas Aberrantes.

cinoma intestinal en humanos⁹¹. Recientemente, se han descrito otras lesiones pre-cancerígenas como las criptas con acúmulos de β -catenina que también pueden considerarse biomarcadores específicos de la carcinogénesis colorectal⁹³.

Entre los modelos experimentales de cáncer colorectal no espontáneo destacan los inducidos por derivados de 1,2-dimetilhidrazina como el azoximetano (AOM). La administración subcutánea de AOM induce la formación de tumores predominantemente en el colon distal de ratas y ratones. El metabolismo de este carcinógeno genera sustancias citotóxicas para los colonocitos a las pocas horas de la inducción⁸⁹. Esta etapa de iniciación se caracteriza por cambios en la homeostasis del epitelio intestinal que conducen al aumento de la proliferación. Paralelamente, el AOM puede introducir mutaciones que confieren un elevado potencial de transformación neoplásica a las células intestinales que escapan de la apoptosis. Se ha observado un progresivo aumento en la formación de FCA, la aparición de mutaciones en *K-ras* y β -catenina, e inestabilidad de microsatélites en el colon de animales inducidos con AOM. Estas características fenotípicas de progresión oncogénica por administración de AOM son similares histopatológicamente a la progresión de la CCRh^{90,91,93}. No obstante, a diferencia de lo que sucede en humanos, los tumores inducidos por AOM muestran una baja frecuencia en mutaciones de *APC* (< 10%) e inexistente para *p53* y *DCC* (tabla II)⁹⁰. Otros carcinógenos procedentes de la cocción de carnes y pescados, menos empleados en el estudio de la carcinogénesis colorrectal, son las nitrosaminas y aminos heterocíclicas como 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-*b*]piridina (PhIP). El PhIP induce un proceso carcinogénico con aparición de lesiones preneoplásicas (FCA), sin mutaciones en *K-ras* ni *p53*, pero con una frecuencia de mutaciones en *APC* cercana al 15% e inestabilidad de microsatélites (tabla II)⁹⁴. Una de las particularidades de los modelos inducidos de CCRh en los estudios de quimioprevención es que los tratamientos pueden iniciarse antes de la inducción con el carcinógeno, en la etapa de iniciación, a través de la fase de promoción-progresión tumoral o durante todos los períodos.

En la década de los 90 se generó un ratón KO (Min) que desarrolla de forma espontánea un rápido y múltiple proceso neoplásico intestinal similar a la PAF y a la mayoría de cáncer colorrectal esporádico humano⁹⁵. El ratón Min es portador de una mutación dominante que consiste en una delección inactivadora del gen *Apc* (codón 850), homólogo del gen *APC* humano. La alteración del gen *Apc* impide la degradación de la β -catenina citoplasmática a través de la vía señalizadora Wnt²⁷. La estabilización de la β -catenina en el citoplasma conlleva la activación de factor de transcripción nuclear β -catenina/Tcf que puede activar diversos genes diana relacionados con el control del ciclo celular. Actualmente existen ratones viables *Apc* (+/-), los *Apc* (-/-) no lo son, con alteraciones en los codones

580, 716, 1309 y 1.638 del gen *Apc* y con mutaciones adicionales en oncogenes o protooncogenes (*Mlh1*, *Msh2*, *iNOS* y *COX-2*)^{2,3,13}. De forma similar a los humanos, las delecciones en diferentes codones de *Apc* implican fenotipos heterogéneos en el proceso neoplásico intestinal. Los ratones *Apc*(+/-)^{A850} desarrollan menos pólipos adenomatosos intestinales que el doble mutante *Apc*(+/-)^{A850}*Msh2* (-/-) y que *Apc* (+/-)⁻⁷¹⁶ [40 \pm 20 vs 165 \pm 145 vs 250 \pm 95, respectivamente], mientras que los dobles mutantes *Apc* (+/-)/*COX-2* (-/-) o *iNOS* (-/-) muestran menos pólipos intestinales que la línea *Apc* (+/-)^{A850}. No obstante, existen diferencias sustanciales entre el modelo de ratones Min y la CCRh. En humanos, los adenomas suelen encontrarse tanto en el colon como en el duodeno, mientras en los ratones Min se disponen principalmente a lo largo del intestino delgado⁹⁵. Además, a diferencia de lo que sucede en la CCRh y en los modelos inducidos, los microadenomas presentes a las pocas semanas de vida en los ratones *Apc* (+/-) limitan su crecimiento, lo que comporta una baja incidencia tumoral en edades más avanzadas y sugiere que la mutación en *Apc* es condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de tumoral⁹³. Tampoco han sido detectadas mutaciones en *K-ras* y *p53* en este modelo de neoplasia intestinal espontánea, contrariamente a lo que se observa en los tumores colónicos humanos^{2,91}. Aunque los mecanismos implicados la aparición de las lesiones intestinales no se conocen con exactitud, recientemente se ha observado la presencia de mutaciones adicionales bialélicas del gen *Apc* en los adenomas intestinales de los ratones *Apc* (+/-)⁹³.

De forma parecida a la CCHNP, las células de los ratones deficientes para *Msh2* y *Mlh1* muestran una progresiva pérdida del sistema de reparación de errores de replicación del ADN¹². Existen nueve modelos de ratones deficientes en proteínas MutS [*Msh2* (-/-), *Msh3* (-/-), *Msh4* (-/-), *Msh5* (-/-), *Msh6* (-/-)] y MutL [*Mlh1* (-/-), *Pms1* (-/-), *Pms2* (-/-) y *Mlh3* (-/-)] homólogas en mamíferos del sistema de reparación de errores de replicación de ADN de *Escherichia coli*¹³. Estos nueve modelos de ratones KO reproducen mutaciones coincidentes con las descritas en CCHNP. En general los ratones KO homocigotos sufren linfomas muy agresivos acompañados de la aparición de cáncer en el tracto gastrointestinal y piel, entre otros¹³. Contrariamente, los mutantes heterocigotos muestran una patología neoplásica menos agresiva. Los ratones *Msh2* (-/-) y *Mlh1* (-/-) son los que muestran un proceso tumoral más grave que se inicia aproximadamente a los 6 meses de vida. Los *Msh6* (-/-) tienen un fenotipo tumoral parecido a los anteriores modelos, pero las formaciones neoplásicas aparecen entre los 9 y 12 meses de vida de los animales. Mientras que *Mlh3* (-/-) y *Pms2* (-/-) tienen una baja predisposición a padecer cáncer en el tracto digestivo. En el resto de modelos KO del sistema de reparación de errores de replicación del ADN no se ha observado una clara susceptibilidad a la carcinogénesis¹¹. Los fenotipos tumorales

más penetrantes en estos modelos animales de CCHNP coinciden con una mayor inestabilidad de microsátélites. Estos modelos experimentales, por la destacable similitud con la CCHNP, permiten conocer la contribución de cada uno de los miembros del sistema de reparación de errores de replicación de ADN al proceso tumoral.

Los ratones inmunodeficientes (SCID) pueden ser inyectados o *xenotrasplantados* subcutáneamente con líneas inmortalizadas de células cancerígenas (HCT-116 y HCA-7), tumores sólidos o células tumorales aisladas humanas³. En estos sistemas experimentales se ensayan potenciales terapias anticancerígenas en fase preclínica donde se evalúa el volumen de los tumores y el tiempo de vida de los animales tratados con nuevos compuestos farmacológicos respecto a los no tratados (fig. 2)⁹⁶. Sin embargo, la localización subcutánea de estos injertos no se corresponde con la localización intestinal inicial. En consecuencia, el cambio de ubicación puede alterar el comportamiento de las células cancerígenas y tumores intestinales injertados frente a las diferentes terapias estudiadas. En este sentido, el trasplante ortotópico de tumores humanos histológicamente intactos, incluyendo tumores extraídos directamente del paciente, supone un modelo más adecuado para el estudio de nuevos fármacos inhibidores del crecimiento tumoral en el intestino de estos ratones atímicos¹⁶.

Prácticamente en todos los modelos animales de CCRh se ha demostrado el carácter protector de los antiinflamatorios no esteroideos (Aspirina, Ibuprofeno, Piroxicam, Sulindac, etc.) y los inhibidores de la COX-2 (Celecoxib)^{1-3,89}. Asimismo, en estos modelos *in vivo* de cáncer intestinal se ha puesto de manifiesto los efectos perjudiciales de ciertos hábitos no saludables del estilo de vida occidental. En este sentido, el elevado consumo de grasa, principalmente de origen animal y ácidos grasos n6, y el descenso en la ingesta de los ácidos grasos n3, Calcio, vitamina D, ácido fó-

lico y celulosa se han asociado a un aumento de los procesos neoplásicos intestinales tanto en los modelos experimentales como en los estudios epidemiológicos sobre la CCRh^{1,4-6,92}.

Consideraciones finales

En la actualidad, los modelos experimentales *in vivo* inducidos de EII y CCRh se han visto complementados con la aparición de los modelos genéticos. Esto ha supuesto una indudable mejora en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares relacionados con estas patologías intestinales humanas. Además, el uso de modelos combinados o con dobles mutantes reproducen situaciones experimentales fenotípicamente cercanas al modelo humano. Hoy por hoy, estos modelos *in vivo* suponen una aproximación razonable al estudio de nuevas dianas terapéuticas y al conocimiento de hábitos no saludables de nuestro estilo de vida. A pesar de ello, los sistemas experimentales *in vivo* actuales no consiguen reproducir completamente la complejidad de la EII y la CCRh. En el futuro aparecerán nuevos modelos genéticos viables de ratones KO y animales con modificaciones en la funcionalidad de proteínas concretas (*knock-in*) que nos permitirán mejorar los actuales. Estos modelos, junto con la tecnología de microarrays para expresión génica y la proteómica, constituirán poderosas herramientas para profundizar en el conocimiento fisiopatológico de la EII y la CCRh.

Agradecimientos

A las licenciadas E. Pedrosa, V. Lorén por aportar-me datos recientes de sus últimas investigaciones y a la Diplomada P. Milke por ayudarme en los aspectos formales del texto.

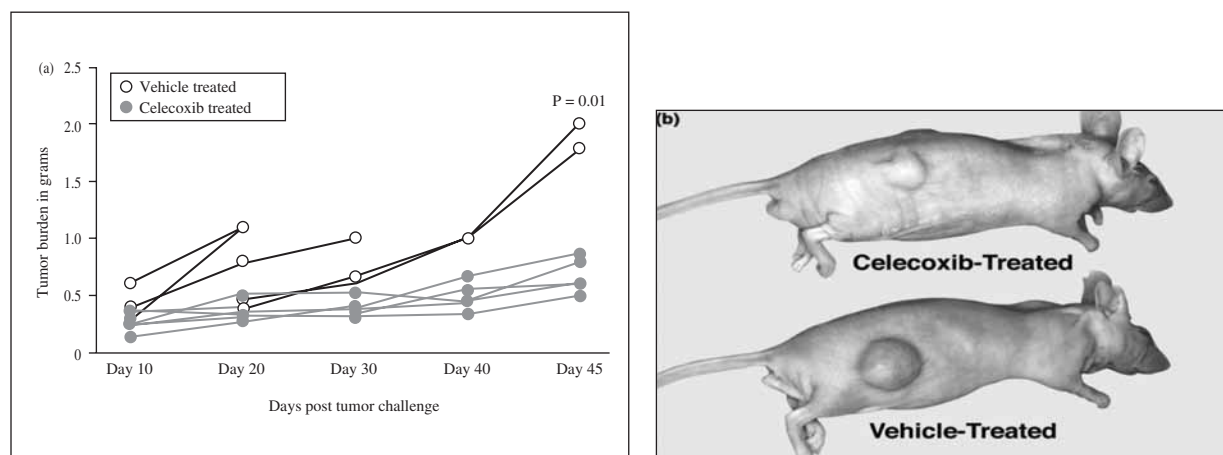


Fig. 2.—Respuesta al tratamiento con un inhibidor de la COX-2 de tumores xenotrasplantados a ratones SCID.

Referencias

- Corpet DE, Pierre F. Point: From Animal Models to Prevention of Colon Cancer. Systematic Review of Chemoprevention in Min Mice and Choice of the Model System. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention* 2003; 12: 391-400.
- Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats mice and men. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1911-22.
- Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharmaceutical Design* 2002; 8: 1021-34.
- Mutanen M, Pajari A-M, Oikarinen SI. Beff induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in ApcMin mice: relation to b-catenin and PKC isoenzymes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1167-73.
- Klurfeld DM, Bull AW. Fatty acids and colon cancer in experimental models. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 1530S-8S.
- Calder PC, Davis J, Yaqoob b P, Pala H, Thies F, Newsholme EA. Dietary fish oil suppress human colon tumor growth in athymic mice. *Clin Sci* 1998; 94: 303-11.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT y cols. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: a animal model of HLA-B27-associated humans disorders. *J Exp Med* 1994; 180: 2359-64.
- Wirtz S, Finotto S, Kanzler S y cols. 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.
- Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y y cols. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med* 1998; 187: 389-402.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H y cols. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- Chao EC, Lipkin SM. Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 840-52.
- Scherer SJ, Avdievich E, Edelmann. Functional consequences of DNA mismatch repair missense mutations in murine models and their impact on cancer predisposition. *Mol Biol Colorectal Cancer* 2005; 33: 689-93.
- Edelmann L, Edelmann W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet* 2004; 129C: 91-9.
- McCafferty D-M, Sihota E, Muscara M y cols. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am J Physiol* 2000; 279: G90-9.
- Aranda R, Sydora BC, McAllister PL y cols. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients. *J Immunol* 1997; 158: 3464-73.
- Hoffman RM. Orthopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 1999; 17: 343-59.
- Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1078-83.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2003; 94: 965-73.
- Tobi M, Chintalapani S, Kithier K, Clapp N. Gastrointestinal tract antigenic profile of cotton-top tamarin, *Saguinus oedipus*, is similar to that of humans with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45 :2290-97.
- Berg DJ, Davidson N, Kühn R y cols. Enterocolitis and Colon Cancer in Inetrleukin-10-Deficient Mice Are Associated with Aberrant Cytokine Production and CD4+ TH-1-like Responses. *J Clin Invest* 1996; 98: 1010-20.
- Shattuck-Brandt R, Varilek GW, Radica A y cols. Cyclooxygenase 2 Expression Is Increased in the Stroma of Colon Carcinomas From IL-10-/- Mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 337-45.
- Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer. IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: role of inflammation. *Am J Physiol* 2004. 287: G7-17.
- Kobayashi K, Arimura Y, Goto A y cols. Therapeutic implications of the specific inhibition of causative matrix metalloproteinases in experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *J Pathol* 2006; Abs. (on line)
- Ma H, Nguyen C, Lee KS, Kahn M. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene* 2005; 24: 3619-31.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- Hamada F, Bienz M. A Drosophila APC tumor suppressor homologue functions in cellular adhesion. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 208-213.
- Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 477-87.
- Flores C, Engels W. Microsatellite instability in Drosophila spellchecker1 (MutS homolog) mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2964-9.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-1367.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-74.
- Boletín Oficial del Estado del 21 De Octubre de 2005. Real Decreto 1201/2005.
- Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 475-507.
- Kim H-S, Berstad A. Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 529-37.
- Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y y cols. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int J Mol Med* 2002; 9: 65-70.
- Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 395-406.
- Liu C, Russell RM, Smith DE y cols. The effect of dietary glutathione and coenzyme Q10 on the prevention and treatment of inflammatory bowel disease in mice. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74: 74-85.
- Shimizu T, Igarashi J, Ohtuka Y, Oguchi S, Kaneko K, Yamashiro Y. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E on colonic mucosal leukotriene generation, lipid peroxidation, and microcirculation in rats with experimental colitis. *Digestion* 2001; 63: 49-54.
- Gassull MA, Mañé J, Pedrosa E, Cabré E. Macronutrients and bioactive molecules: is there a specific role in the management of inflammatory bowel disease? *JPEN* 2005; 29: S179-82.
- Onderdonk AB, Bronson R, Cisneros R. Comparison of *Bacteroides vulgatus* strains in the enhancement of experimental ulcerative colitis. *Infect Immun* 1987; 55: 835-6.
- Breeling JL, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. *Bacteroides vulgatus* outer membrane antigens associated with careenan-induced colitis in guinea pigs. *Infect Immun* 1988; 56: 1754-9.
- Meenan J, Hommes DW, Mevissen M y cols. Attenuation of the inflammatory response in an animal colitis model by neutrophil inhibitory factor, a novel beta 2-integrin antagonist. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 786-91.
- Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE. Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in

- a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 1114-21.
43. 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.
 44. Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 915-20.
 45. Hokari R, Kato S, Matsuzaki K y cols. Involvement of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in the pathogenesis of granulomatous colitis in rats. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 259-65.
 46. Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA y cols. A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 123: 1151-62.
 47. Bucy RP, Xu XY, Li J, Huang GQ. Cyclosporin A-induced autoimmune disease in mice. *J Immunol* 1993; 151: 1039-1050.
 48. Kawaguchi-Miyashita M, Nanno M, Shimada S y cols. A step-wise expansion of intestinal intraepithelial T lymphocytes in association with microbial colonization is defined by sensitivity to cyclosporin A. *Immunol* 1997; 91: 628-34.
 49. Robert A, Asano T. Resistance of germ free rats to indomethacin-induced intestinal lesions. *Prostaglandins* 1977; 14: 333-341.
 50. Cheng L, Araki K, Furuya Y y cols. Morphological study of the regeneration mechanism of acetic acid-injured colon crypts in the rat. *Med Electron Microsc* 2000; 33: 165-71.
 51. 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.
 52. Palmen MJ, Dijkstra CD, van der Ende MB, Pena AS, van Rees EP. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 351-6.
 53. Grisham MB, Ware K, Gilleland HE Jr, Gilleland LB, Abell CL, Yamada T. Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 1260-6.
 54. Cogswell JP, Scott DW. Role of self carriers in the immune response and tolerance. XII. Effect of epitope density and antigen-presenting cell phenotype on the presentation of hapten-modified self for the induction of immunity or tolerance in vitro. *Cell Immunol* 1988; 114: 71-82.
 55. Bertran X, Mane J, Fernandez-Baneres F y cols. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996; 38: 899-904.
 56. Triantafyllidis JK, Papalois AE, Parisi A y cols. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6843-7.
 57. Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I y cols. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 2003; 12: 721-5.
 58. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med* 2003; 12: 721-5.
 59. Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M y cols. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 2006; 17: 497-502.
 60. Lorén V, Mañé J, Pedrosa E y cols. La administración de lactobacillus fermentum (LF) después de la inducción de la colitis por en ratones balb/c mejora la evolución de la lesión colónica. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 188 (Abstract).
 61. Cherbut C, Michel C, Lecannu G. The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J Nutr* 2003; 133: 21-7.
 62. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH. Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994; 107: 1726-35.
 63. Hacquard-Bouder C, Ittah M, Breban M. Animal models of HLA-B27-associated diseases: new outcomes. *Joint Bone Spine* 2006; 73: 132-8.
 64. Takahashi I, Lijima H, Kishi D, Kiyono H. Oligoclonal Th2-biased betabeta T cells induce murine inflammatory bowel disease. *Immunol Res* 1999; 20: 237-42.
 65. Strober W, Ehrhardt RO. Chronic Intestinal Inflammation: An Unexpected Outcome in Citokine or T Cell Receptor Mutant Mice. *Cell* 1993; 75: 203-205.
 66. Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS y cols. Ulcerative Colitis and adenocarcinoma of the colon in $G_{\alpha_{12}}$ -deficient mice. *Nature Genet* 1995; 10: 141-8.
 67. Berg LJ, Finkelstein LD, Lucas JA, Schwartzberg PL. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 549-600.
 68. Hornquist CE, Lu X, Rogers-Fani PM y cols. G(alpha)i2-deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory CD4+ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *J Immunol* 1997; 158: 1068-77.
 69. 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.
 70. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H y cols. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 1297-308.
 71. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J y cols. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 1998; 187: 571-8.
 72. Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 97-106.
 73. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184: 1397-411.
 74. Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK y cols. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G1461-72.
 75. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995; 30: 56-60.
 76. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10 (-/-) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol* 2000; 278: G829-33.
 77. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10 (-/-) mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 337-45.
 78. Kullberg MC, Rothfuchs AG, Jankovic D y cols. Helicobacter hepaticus-induced colitis in interleukin-10-deficient mice: cytokine requirements for the induction and maintenance of intestinal inflammation. *Infect Immun* 2001; 69: 4232-41.
 79. Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV y cols. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 1527-42.
 80. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin-10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-14.
 81. Pedrosa E, Mañé J, Lorén V y cols. La incorporación de triglicéridos de cadena media (MCT) al componente lipídico de la dieta mejora la evolución de la colitis y aumenta la apoptosis de las células CD3+ colónicas en ratones IL-10 (-/-). *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 189 (Abstract).
 82. Trobonjaca Z, Leithauser F, Moller P y cols. MHC-II-independent CD4+ T cells induce colitis in immunodeficient RAG-/- hosts. *J Immunol* 2001; 166: 3804-12.
 83. Wang B, Simpson SJ, Hollander GA, Terhorst C. Development and function of T lymphocytes and natural killer cells after bone marrow transplantation of severely immunodeficient mice. *Immunol Rev* 1997; 157: 53-60.
 84. Simpson SJ, Hollander GA, Mizoguchi E y cols. Expression of pro-inflammatory cytokines by TCR alpha beta+ and TCR

- gamma delta+ T cells in an experimental model of colitis. *Eur J Immunol* 1997; 27: 17-25.
85. Das G, Augustine MM, Das J, Bottomly K, Ray P, Ray A. An important regulatory role for CD4 + CD8 $\alpha\alpha$ T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *PNAS* 2003; 100: 5324-9.
 86. 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: G1317-21.
 87. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM y cols. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 184: 241-51.
 88. Bregenholt S, Brimnes J, Reimann J, Claesson MH. Accumulation of immunoglobulin-containing cells in the gut mucosa and presence of faecal immunoglobulin in severe combined immunodeficient (scid) mice with T cell-induced inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 19-25.
 89. Reddy BS. Studies with Azoxymethane-rat preclinical model for assessing colon tumor development and chemoprevention. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44: 26-35.
 90. Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci* 2004; 95: 475-480.
 91. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): Iniciaion of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 83-96.
 92. Bartoli R, Fernández-Banares F, Navarro E y cols. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Gut* 2000; 46: 191-9.
 93. Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1015-9.
 94. Nakagama H, Nakanishi M, Ochiai M. Modeling human cancer in rodents using o food-borne carcinogen, PhIP. *Cancer Sci* 2005; 96: 627-36.
 95. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990; 247: 322-24.
 96. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4227-39.