



***Estudio de nuevas dianas farmacológicas y terapias
alternativas para el tratamiento de patologías digestivas***

Mariano Ramón Giménez Muñoz

Tesis doctoral

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias, Universidad San Jorge

Villanueva de Gállego, 2020



***Estudio de nuevas dianas farmacológicas y terapias
alternativas para el tratamiento de patologías digestivas***

Mariano Ramón Giménez Muñoz

Tesis doctoral

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias, Universidad San Jorge

Villanueva de Gállego, 2020

Directora:

Dra. Marta Sofía Valero Gracia

Directora:

Dra. Marta Castro López

Director:

Dr. Ralf Köhler



Dra. Marta Sofía Valero, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad de Zaragoza.

Dra. Marta Castro López, Profesora Contratada Doctor de la Universidad de Zaragoza.

Dr. Ralf Köhler, Investigador de La Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

CETRIFICAN:

Que el trabajo de investigación presentado en la tesis titulada: ***“Estudio de nuevas dianas farmacológicas y terapias alternativas para el tratamiento de patologías digestivas”***, en la Universidad San Jorge, ha sido realizado por D. Mariano Ramón Giménez Muñoz y autorizan su presentación para optar al grado de doctor.

Para que así conste, firman el presente certificado en Villanueva de Gállego (Zaragoza), a..... de de 2020.

VALERO
GRACIA
MARTA
SOFIA - DNI
73261147Y

Firmado digitalmente por VALERO GRACIA MARTA SOFIA - DNI 73261147Y
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, ou=UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, serialNumber=DCE5-73261147Y, o=VALERO GRACIA, givenName=MARTA SOFIA, cn=VALERO GRACIA MARTA SOFIA - DNI 73261147Y
Fecha: 2020.10.06 13:52:23 +02'00'

CASTRO
LOPEZ
MARTA -
DNI
25183906X

Firmado digitalmente por CASTRO LOPEZ MARTA - DNI 25183906X
Fecha: 2020.10.06 20:00:48 +02'00'

KÖHLER --- RALF -
Y2076193C

Firmado digitalmente por KÖHLER --- RALF - Y2076193C
Fecha: 2020.10.08 12:01:15 +02'00'

Dra. Marta Sofía Valero Gracia

Dra. Marta Castro López

Dr. Ralf Köhler

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral, más que un título, es una experiencia de vida. Durante su desarrollo existen un sinnúmero de pequeños instantes, llenos de libros, artículos, experimentos, ordenadores, pantallas, protocolos, laboratorios, papeles, cafés, alegrías, decepciones, aciertos, fallos, más artículos y, sobre todo, tiempo, mucho tiempo invertido. Una gran parte de él transcurre en soledad, lo que, además de permitir conocerte a ti mismo y poner a prueba tus capacidades, te enseña a valorar la importancia de las personas que aparecen entre esos pequeños instantes y que son verdaderos artífices de tu proyecto, vuestro proyecto. Como me dijo una buena amiga tras un largo día: “la soledad está sobrevalorada”.

Es por ello por lo que me gustaría dedicar algunos renglones de esta nuestra obra a agradecer vuestra colaboración, sin la cual esto no hubiera sido posible.

En primer lugar, agradecer a la Universidad San Jorge y todo su personal la oportunidad de realizar el doctorado en su Facultad de las Ciencias de la Salud. La entrega y el buen hacer de las personas que trabajáis en ella es vuestra mejor bandera.

A nivel personal, me gustaría agradecer esta tesis doctoral a mi directora, Marta Sofía Valero Gracia. Sólo nosotros sabemos lo que nos ha costado este proyecto, lo que hemos invertido en él y lo que nos merecemos que termine con un final feliz. Nunca podré agradecerte todo el esfuerzo que has depositado en esta tesis; ni describir mi admiración por tu capacidad y calidad de trabajo, tu eficacia y tu afán investigador. Tu habilidad para rentabilizar cualquier situación sobrepasa todo límite. Espero que sigas en la docencia muchos años más para transmitir tu pasión a estudiantes como yo. Solo tengo palabras de agradecimiento, mi más sincero “gracias”.

A Marta Castro López, por ser el ejemplo personificado de una investigadora. Tu máxima eficacia y rigor científico es sólo comparable a tu humanidad. Gracias por esa sinceridad absoluta que me ayudó a despejarme cuando más necesitaba una voz clara y firme. Creo que me hiciste evolucionar como investigador y persona mucho más de lo que imaginas. Espero que conserves siempre el espíritu joven que te da esa energía característica tuya para que puedas con todo y te sobre para repartir.

A Ralf Köhler. Aunque no hemos pasado tanto tiempo juntos como me hubiera gustado, cada minuto cerca tuyo era un año de investigación. Mi máxima admiración por tu capacidad de síntesis y tus conocimientos ilimitados. A tu lado el mayor de los problemas tenía la más sencilla de las soluciones. Ha sido un honor poder compartir contigo mis andaduras en el campo de la investigación. De nuevo, gracias.

También me gustaría hacer una mención especial a aquellos que me habéis acompañado en las tareas de campo en estas andaduras por la investigación:

El Departamento de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, especialmente a Miguel Ángel y a María Pilar, con los que he compartido tantos momentos en el laboratorio, pero también fuera de él. No sé qué componentes genéticos compartís, pero sois una auténtica lección andante de humildad, trabajo y humanidad. Ha sido un placer.

Las técnicas de laboratorio, tanto del animalario del CIBA, como de la USJ y de la Facultad de Veterinaria. Sois uno de los pilares que mueven la investigación y, sin duda, el más simpático y amable, un oasis en el frío campo de la ciencia. Siento mis reiterados despistes y os agradeceré eternamente lo que me habéis cuidado. Gracias Silvia, por tan buenos ratos de conversación y trabajo en el animalario, y mis técnicos de la USJ, por aguantar mis peculiaridades la friolera de 10 años... Al menos hubo buena música.

A nuestro querido despacho de jóvenes promesas investigadoras, Cris, Guille, Fran, Inés, Julia, Estela, Jorge, Juan, Diego y nuestras italianas favoritas, por esos buenos ratos de desahogo, los juepinchos, los viajes... gracias.

Aunque algunos no me habéis podido acompañar directamente en la investigación, vuestro apoyo moral ha sido igual de importante. Formáis parte de este camino:

Mis compañeras de estudio "Camarena", Mariola y Lourdes. Estudiar con vosotras fue lo mejor de la carrera, pero sabéis que mi cariño va mucho más allá.

Todos los carmelitas con los que he compartido estos años, especialmente el Equipo A, la Orden y el Rugby Carmelo. Sois únicos e irrepetibles. Es un honor haber formado filas con vosotros. Tomás, mi eterna gratitud por todo lo que has hecho por mí estos años, sabes que te quiero.

Mis compañeros de piso estos años, aparte de los carmelitas, Belén, Ernestín y Luismi, muchas gracias por compartir conmigo techo, risas y locuras.

Mis compañeros del Ibero y del Teruel. Gracias por acompañarme en este deporte, que además es forma de vida. Habéis sido mi liberación. Soy vuestro padre.

Mis amigos de Teruel, por recordarme de dónde vengo y cómo he llegado a donde estoy. Nos quedan muchas celebraciones.

Mis compañeras de oficina de farmacia durante estos largos años. Gracias por recordarme lo bonito de esa rama de la profesión y enseñarme cada día con paciencia. En especial, gracias Sonia, por cuidar de la cinta de mi bata y ser mucho más que una compañera.

A esos espontáneos que aparecisteis en el último momento para aportar vuestro granito de arena en esta tesis, Pablo, Elena, Patricia y Jesús.

Finalmente, me gustaría agradecerlos de manera especial a mi familia.

A todos mis tíos y primos, por tener siempre palabras de apoyo y ser un punto donde apoyarme. Gracias a mi tía "Betí", otra Dra. Giménez, por ser un ejemplo que seguir. Gracias padrinos; "Ramo", por ser un hogar en Zaragoza, tu complicidad y, sobre todo, tu apoyo incondicional; Carmen, por cuidarme y preocuparte siempre.

Mi querida Marisol, pegamento de esta familia y la bondad personificada. Gracias por creer en mí, incluso más que yo mismo.

Gracias a mis padres. Papá, por ser un espejo en el que mirarme. Este final es un comienzo para nosotros. Mamá, la doctora de mi vida. Mi admiración, mi orgullo y mi ejemplo. Me ayudas a sacar lo mejor de mí. Gracias por todo, os quiero.

Mi querida hermanita, Maggie. Todo lo que te diga es poco. Sólo espero poder pasar contigo el tiempo suficiente para poder agradecerte todo lo que haces por mí. Mi cómplice, mi amor.

Por último, a mis abuelos. Sé que me miráis desde allí arriba con el mismo orgullo y cariño con el que yo os siento aquí abajo. Gracias por haber sido una enseñanza de vida. Os echo de menos.

En realidad, si lo piensas, todo tiene sentido

ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen	3
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Anatomía y fisiología del intestino	9
1.2. Músculo liso intestinal	20
1.3. Dianas farmacológicas: canales iónicos y enzimas	26
1.4. Patologías intestinales	38
1.5. Tratamientos de patología digestivas	48
1.6. <i>Jasonia glutinosa</i> (L.) DC.	55
1.7. Referencias	59
Capítulo 2. Justificación y objetivos	81
Capítulo 3. Material y métodos	
3.1. Consideraciones éticas relativas a los estudios con animales	85
3.2. Estudio 1: Papel del canal KCa3.1 en el aparato digestivo	86
3.3. Estudio 2: Efecto del té de roca sobre la musculatura lisa intestinal	93
3.4. Estudio 3: Efecto protector del té de roca en un modelo de colitis	97
3.5. Referencias	107
Capítulo 4. Resultados	
4.1. Estudio 1: Papel del canal KCa3.1 en el aparato digestivo	111
4.2. Estudio 2: Efecto del té de roca sobre la musculatura lisa intestinal	119
4.3. Estudio 3: Efecto protector del té de roca en un modelo de colitis	123
4.4. Referencias	134
Capítulo 5. Discusión	
5.1. Estudio 1: Papel del canal KCa3.1 en el aparato digestivo	139
5.2. Estudio 2: Efecto del té de roca sobre la musculatura lisa intestinal	150
5.3. Estudio 3: Efecto protector del té de roca en un modelo de colitis	157
5.4. Referencias	171
Capítulo 6. Conclusiones	193
Capítulo 7. Anexos	
7.1. Publicaciones aportadas	197

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular.
ACh	Acetilcolina.
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo.
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	Trifosfato de adenosina o adenosín -5- trifosfato.
BCA	Ácido bicinconínico.
BK_{Ca}	Canal de potasio activado por calcio de alta conductancia.
CaM	Calmodulina.
CAM	Terapias complementarias y alternativas.
CFTR	Canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística.
GMPc	Guanosín-3',5'-monofosfato cíclico.
CI₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la respuesta máxima.
COX	Ciclooxigenasa.
CU	Colitis ulcerosa.
DAG	Diacilglicerol.
DAI	Índice de actividad de la enfermedad.
DHP	Dihidropiridina.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DOX	Doxiciclina.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
DSS	Dextrano sulfato de sodio.
EC	Enfermedad de Crohn.
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.
GDP	Guanosín difosfato.
GTP	Guanosín trifosfato.
HCO₃⁻	Ion bicarbonato.
HRP	Peroxidasa de rábano picante.
IC	Intervalo de confianza.
ICC	Célula intersticial de Cajal.
IK_{Ca}	Canal de potasio activado por calcio de intermedia conductancia.
IL	Interleucina.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible.
IP₃	Inositol trifosfato.
IP₃R	Receptor del inositol trifosfato.
KCa	Canal de potasio activado por calcio.
KO	Knockout.
K_v	Canal de potasio activado por voltaje.
LPS	Lipopolisacáridos.

MCLK	Quinasa de la cadena ligera de la miosina.
MLC	Cadena ligera de miosina.
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal.
NOS	Óxido nítrico sintasa.
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2.
NSCC	Canal catiónico no selectivo.
PBS	Tampón fosfato salino.
PDE	Fosfodiesterasa.
PGE2	Prostaglandina E2.
PKA	Proteína quinasa dependiente del AMPc.
PLN	Fosfolambán.
TR-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
RyRs	Receptores de la ryanodina.
SII	Síndrome del intestino irritable.
SK_{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de pequeña conductancia.
SNC	Sistema nervioso central.
SNE	Sistema nervioso entérico.
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
STOC	Corrientes externas transitorias espontáneas.
TBS	Solución salina tamponada con Tris.
TBST	Solución salina tamponada con Tris suplementada con Tween-20.
TJ	Tight junction - proteína de unión estrecha.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
TLR	Receptor tipo Toll.
TR	Té de roca.
TRP	Canal iónico receptor de potencial transitorio.
VGCC / Ca_v	Canal de calcio activado por voltaje.
WB	Western blot.
ZO-1	Zonula occludens-1.

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Usos terapéuticos de <i>Jasonia glutinosa</i> .	57
Tabla 4.1	Cambios en el consumo de agua y comida de los ratones KCa3.1+.	111
Tabla 4.2	Cambios en los órganos del sistema gastrointestinal.	112
Tabla 4.3	Resultado del bloqueo <i>in vivo</i> del canal KCa3.1 con el tratamiento con Senicapoc.	117
Tabla 4.4	Efecto de la supresión a corto plazo del canal KCa3.1 en ratones KCa3.1-.	118
Tabla 4.5	Efecto de la adición de concentraciones crecientes de extracto de té de roca y verapamilo sobre la amplitud y frecuencia de las contracciones espontáneas de la motilidad basal del duodeno de rata.	120
Tabla 4.6	Efecto relajante de las diferentes concentraciones de extracto de té de roca y verapamilo sobre segmentos aislados de duodeno de rata previamente contraídos por KCl.	120

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema del sistema gastrointestinal humano.	9
Figura 1.2	Sección de Intestino delgado de rata teñido con hematoxilina-eosina.	10
Figura 1.3	Morfología de las uniones estrechas.	12
Figura 1.4	Diagrama esquemático representando las dos funciones principales de las TJ.	12
Figura 1.5	Intestino grueso de rata. Tinción con PAS-hematoxilina.	16
Figura 1.6	Movimientos peristálticos de segmentación.	18
Figura 1.7	Regulación de la contracción del músculo liso intestinal.	23
Figura 1.8	Canales iónicos en el músculo liso.	27
Figura 1.9	Imagen representativa de la activación mecanosensible de los canales Ca ²⁺ tipo L.	29
Figura 1.10	Esquema de la secreción electrogénica de Cl en criptas de colon distal murino	33
Figura 1.11	Ejemplo de daño con ruptura en la barrera intestinal.	36
Figura 1.12	Esquema de la fisiopatología de la colitis ulcerosa.	44
Figura 1.13	Lesiones típicas de la colitis ulcerosa.	46
Figura 1.14	<i>Jasonia glutinosa</i> silvestre en los montes de Conclud, Teruel.	56
Figura 3.1	Segmento de intestino en el baño de órganos durante el experimento.	90
Figura 3.2	Foto del equipo para baño de órganos.	91
Figura 3.3	Diseño experimental de la inducción de la colitis.	98
Figura 3.4	Fotografía del test Guayaco.	99
Figura 4.1	Análisis del contenido intestinal.	112
Figura 4.2	Análisis del contenido electrolítico del contenido intestinal.	113
Figura 4.3	Estudio de los cortes histológicos del duodeno en los animales KCa3.1+.	113
Figura 4.4	Análisis del grosor de las capas musculares lisas del duodeno.	114
Figura 4.5	Impacto de la inducción del transgén KCa3.1 en la contractibilidad duodenal de ratones KCa3.1+.	115
Figura 4.6	Efecto de la inducción del transgén KCa3.1 en la contractibilidad colónica de ratones KCa3.1+.	116
Figura 4.7	Registro de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal de duodeno de rata frente a agua milliQ, té de roca y verapamilo.	119
Figura 4.8	Contracción producida a diferentes concentraciones de CaCl ₂ en presencia del vehículo, del extracto de TR y del verapamilo en duodeno de rata.	121
Figura 4.9	Efecto de las contracciones inducidas por Bay-K8644 frente a diferentes reactivos.	122
Figura 4.10	Score DAI registrado durante los días de tratamiento con DSS 2,5% por los distintos grupos.	125
Figura 4.11	Comparativa de la longitud del colon entre los diferentes grupos.	126
Figura 4.12	Comparativa del grosor de las paredes del colon entre grupos.	127
Figura 4.13	Score de daño macroscópico del daño tisular en el colon en los distintos grupos de tratamiento.	128
Figura 4.14	Registros representativos de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal de íleon de ratón de los diferentes grupos.	129
Figura 4.15	Efecto del extracto de TR en la motilidad intestinal.	130
Figura 4.16	Resultados de la actividad antiinflamatoria del extracto de TR sobre el efecto del DSS en el colon murino.	131
Figura 4.17	Actividad antiinflamatoria del extracto de TR sobre el efecto del DSS en el colon murino.	132
Figura 4.18	Efecto del DSS y el tratamiento con extracto de TR sobre la expresión de la ZO-1.	133

RESUMEN

RESUMEN

Las patologías gastrointestinales representan uno de los mayores índices de prevalencia y gasto sanitario de la medicina actual. Además, su incidencia ha aumentado significativamente en los últimos años debido a factores como la mala alimentación, el sedentarismo o el estrés. El desconocimiento acerca de su etiología y fisiopatología hace que una gran parte de los tratamientos sean meramente sintomáticos, presentando falta de eficacia y efectos adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Esta situación hace necesario el desarrollo de nuevas dianas farmacológicas o terapias alternativas que ayuden a mejorar los tratamientos actuales.

En primer lugar, esta tesis doctoral se ha centrado en investigar el papel del canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia 3.1 en la fisiología intestinal. Para ello, se han desarrollado dos modelos de ratones genéticamente modificados para la modulación de su expresión, evaluando los efectos de su sobreexpresión o inactivación frente a grupos control. La sobreexpresión del canal produjo cambios morfológicos en el intestino debidos a una acumulación de su contenido. Además, los experimentos de miografía revelaron una alteración en las contracciones espontáneas de duodeno y colon, aunque no se observó una implicación directa del canal. Por otro lado, el bloqueo farmacológico del canal fue capaz de revertir estos cambios, mientras que su inactivación *in vivo* no provocó alteraciones gastrointestinales significativas.

En segundo lugar, esta tesis doctoral ha investigado el efecto farmacológico de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. sobre el sistema gastrointestinal. Esta planta, conocida como té de roca, es muy utilizada en la cultura tradicional española para el tratamiento de desórdenes digestivos, como la diarrea o la dispepsia.

En un primer estudio se constató su efecto espasmolítico *ex vivo* en un ensayo de miografía en duodeno de rata. El extracto de té de roca redujo las contracciones espontáneas del músculo liso longitudinal, bloqueó la contracción causada por la entrada de calcio extracelular y se demostró su mecanismo de acción a través del bloqueo de los canales de calcio activados por calcio tipo L.

En un segundo estudio, se evaluó su posible efecto protector del té de roca en procesos inflamatorios intestinales. Para ello, se llevó a cabo un modelo murino de colitis ulcerosa inducida por DSS y se valoró la eficacia terapéutica de su administración vía oral. Se monitorizó la aparición y gravedad de los síntomas asociados a la colitis ulcerosa y se analizaron los cambios morfológicos producidos en el colon. Se estudió la alteración funcional y la contractilidad de la musculatura lisa del íleon mediante ensayos de miografía. Se cuantificó su efecto antiinflamatorio a través de la modulación de la expresión de sustancias proinflamatorias y se estudió su efecto protector sobre la integridad de la barrera intestinal. Los resultados reflejaron que el extracto de té de roca produjo una mejoría en la sintomatología asociada a la colitis, redujo el daño macroscópico y microscópico, demostró un potente efecto antiinflamatorio, normalizó la funcionalidad de la musculatura lisa y mantuvo la estructura de las proteínas de unión estrecha. Este efecto farmacológico posiblemente sea debido a una combinación de los efectos de su composición fitoquímica, rica en compuestos bioactivos.

Estos resultados muestran por primera vez el papel del canal de potasio activado por calcio 3.1 sobre el sistema digestivo, así como su posible uso como diana farmacológica innovadora y el uso de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. como terapia alternativa o coadyuvante en el tratamiento de patologías digestivas.

ABSTRACT

Gastrointestinal pathologies represent one of the highest prevalence and health expenditure rates in current medicine. In addition, its incidence has increased significantly in recent years due to factors such as poor diet, sedentary lifestyle or stress. The lack of knowledge about their etiology and pathophysiology means that a large part of the treatments are merely symptomatic, presenting little efficacy and adverse effects that decrease the quality of life of the patients. This situation makes it necessary to develop new drug targets or alternative therapies to improve current treatments.

This doctoral thesis has primarily focused on investigating the role of the intermediate-conductance calcium-regulated potassium channel 3.1 in intestinal physiology. To achieve this, two genetically modified mouse models have been developed to modulate their expression, evaluating the effects of their overexpression or inactivation against control groups. The overexpression of the channel produced morphological changes in the gastrointestinal system due to an accumulation of the chyme. Furthermore, myography experiments revealed an alteration in the spontaneous contractions of the duodenum and colon, although no direct involvement with the canal was observed. On the other hand, the pharmacological blocking of the channel or its inactivation *in vivo* were able to reverse these changes.

Second, this doctoral thesis has investigated the pharmacological effect of *Jasonia glutinosa* (L.) DC. on the gastrointestinal system. This plant, known as “rock tea”, is widely used in traditional Spanish culture for the treatment of digestive disorders, such as diarrhea or dyspepsia.

In the first study, its possible spasmolytic effect was verified *ex vivo* in a rat duodenum myography test. The rock tea extract reduced the spontaneous contractions of longitudinal smooth muscle, blocked the contraction caused by the influx of extracellular calcium, and its mechanism of action through the blockade of L-type calcium channels was demonstrated.

In a second study, a possible protective effect of rock tea on intestinal inflammatory processes was evaluated. For this, a murine model of ulcerative colitis induced by DSS was carried out and the therapeutic efficacy of its oral administration was assessed. The appearance and severity of the symptoms associated with ulcerative colitis were monitored and the morphological changes produced in the colon were analyzed. The functional alteration and contractility of the ileum smooth muscles were studied by myography tests. Rock tea extract anti-inflammatory effect was quantified through the modulation of the expression of pro-inflammatory substances and its protective effect on the integrity of the intestinal barrier was studied. The results reflected that the rock tea extract produced an improvement in all the symptoms associated with colitis, reduced macroscopic and microscopic damage, demonstrated a powerful anti-inflammatory effect, normalized the functionality of smooth muscles and maintained the structure of tight junctions. This pharmacological effect is possibly due to a combination of the effects of its phytochemical composition, rich in bioactive compounds.

These results show for the first time the role of the calcium-activated potassium channel 3.1 on the digestive system, as well as its possible use as an innovative pharmacological target and the use of *Jasonia glutinosa* (L.) DC. as an alternative or adjunctive therapy in the treatment of digestive pathologies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL INTESTINO

El aparato digestivo es un conjunto de órganos, con glándulas asociadas, que se encarga de recibir, descomponer y absorber los alimentos (**figura 1.1**). Este sistema se encarga de realizar las funciones de ingestión, digestión, secreción, absorción y excreción¹.

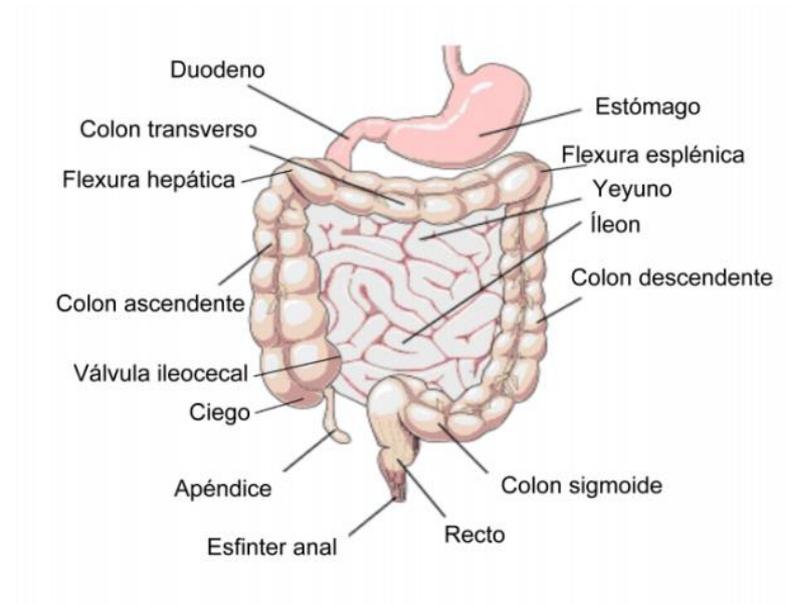


Figura 1.1: Esquema del sistema gastrointestinal humano¹.

Desde el punto de vista anatómico, el intestino está dividido principalmente en el intestino delgado y el intestino grueso. Entre ellos, hay semejanzas y diferencias anatómicas e histológicas.

El **intestino delgado** está formado, al igual que el resto del tubo digestivo, por varias capas: mucosa, submucosa, muscular o *muscularis externa* y serosa^{2,3}:

- Capa mucosa.

Está formada por las tres capas típicas que aparecen en el resto del sistema digestivo: epitelio, lámina propia y la capa muscular de la mucosa o *muscularis mucosae*.

En algunas especies, como en los humanos, existen unos repliegues alargados dispuestos circular o espiralmente que aumentan la superficie de absorción, denominados pliegues circulares o pliegues de Kerckring. Se encuentran en la mucosa y submucosa del intestino delgado y son más abundantes en la parte anterior del intestino delgado, siendo casi inexistentes en el íleon.

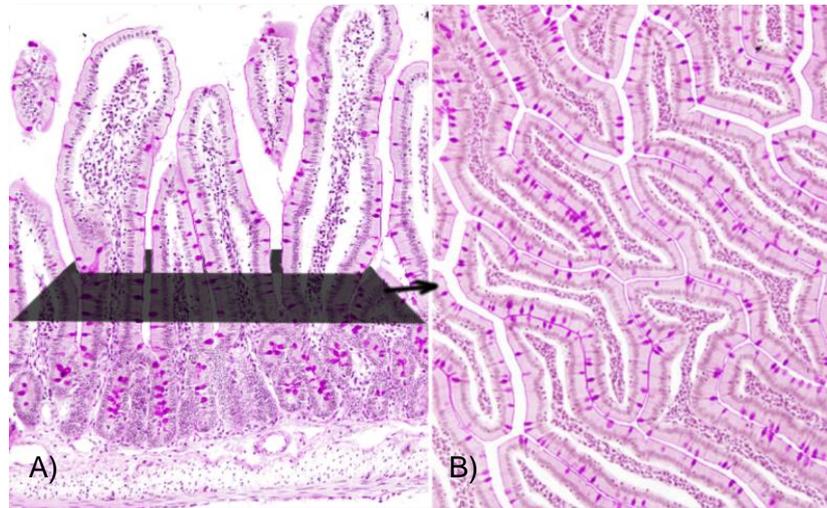


Figura 1.2. Sección de Intestino delgado de rata teñido con hematoxilina-eosina. (A) Corte en el sentido transversal del intestino, donde se aprecian las vellosidades. (B) Plano paralelo a la pared intestinal².

En la superficie del intestino encontramos unas expansiones de la mucosa más pequeñas, entre 0,5 y 2 mm de longitud, en forma de dedos de guante, denominadas vellosidades intestinales (**figura 1.2**). Debido a ellas, se aumenta enormemente la superficie epitelial y, por tanto, el número de células epiteliales disponibles para la absorción. Cada vellosidad está formada por un epitelio cilíndrico simple recubriendo su superficie, mientras que en su interior encontramos tejido conectivo laxo que forma parte de la lámina propia de la mucosa. En esta aparecen numerosas células del sistema inmune, algunas musculares lisas y fibroblastos. Una red de capilares sanguíneos fenestrados, es decir, porosos, se distribuye en cada vellosidad, permitiendo canalizar las sustancias transportadas por las células epiteliales. Además, también encontramos irrigación linfática.

En la base de las vellosidades se sitúan las aberturas de secreción de las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn. Estas glándulas secretoras son invaginaciones del

epitelio intestinal con forma tubular, las cuales ocupan desde la luz del tubo digestivo hasta la capa muscular de la mucosa. Poseen un epitelio simple en el que se sitúan células caliciformes, cilíndricas absortivas, células de Paneth y enterocromafines.

Aparte de los vasos linfáticos nombrados, existen unos nódulos de células defensivas recubiertos del tejido conectivo que forman la lámina propia, llamados placas de Peyer, los cuales se encuentran principalmente en los tramos más distales del íleon.

La absorción de los alimentos depende de las células que forman el epitelio intestinal. En él nos encontramos al menos cinco tipos celulares: enterocitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendocrinas y células M. Las más abundantes son los *enterocitos*, principales responsables de la digestión y de la absorción¹. En la superficie libre orientada al lumen, presentan unas enzimas denominadas “enzimas en borde en cepillo”, que se encargan de hidrolizar los hidratos de carbono en monosacáridos⁴, como las disacaridasas, glucoamilasas o isomaltasas; o degradar proteínas en di/tripéptidos y aminoácidos libres, como las aminooligopeptidasa, aminopeptidasas o dipeptidilaminopeptidasa, permitiendo la absorción de estas moléculas. Esta función de absorción de los enterocitos se ve facilitada por la presencia de las microvellosidades, que aumentan la superficie útil de la membrana citoplasmática y por transportadores específicos para estos nutrientes, tales como el transportador de glucosa y galactosa SGLT-1, el transportador de fructosa GLUT-5, o transportadores de pequeños péptidos y aminoácidos libres.

Los enterocitos se encuentran unidos entre sí a través de las llamadas uniones estrechas o *tight junctions*⁵ (TJ) (**figura 1.3**), que impiden el paso de los productos de la digestión no procesados o de sustancias extrañas al interior de la mucosa. Su presencia obliga a la mayor parte de moléculas a ser transportadas de forma transcelular, mecanismo de transporte muy selectivo, lo que las convierte en una de las claves para el mantenimiento de la barrera intestinal. Su destrucción total o parcial puede producir filtración de moléculas o microorganismos patógenos desencadenantes de patologías infecciosas e inflamatorias⁵.

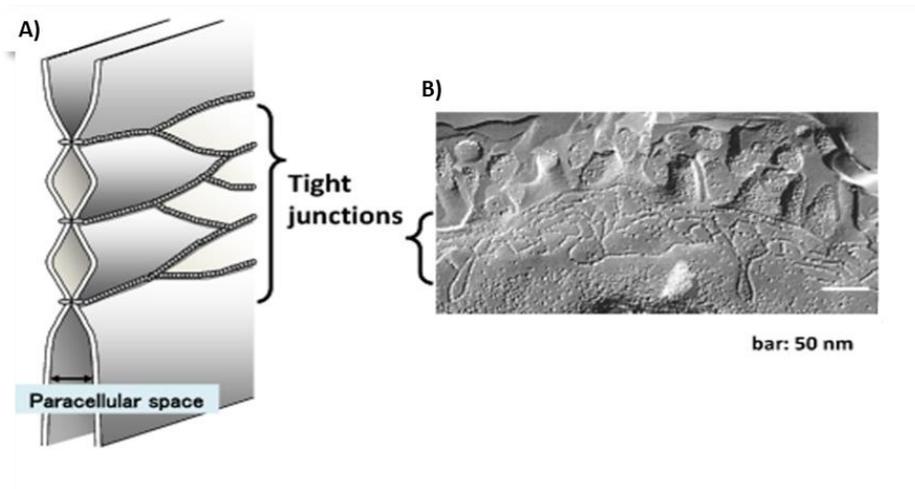


Figura 1.3: Morfología de las uniones estrechas. (A) Diagrama esquemático del espacio paracelular entre dos células epiteliales unidas por TJ. (B) Fotografía de microscopía electrónica por criofractura de la zonula occludens. Imagen de Sawada⁶.

Las TJ principalmente tienen dos funciones: (1) Función barrera u oclusiva, evitando el intercambio de sustancias a través de los epitelios, como por ejemplo ocurre en los epitelios del sistema digestivo, el endotelio vascular, la vejiga o la barrera hematoencefálica y (2) función barrera dentro de la misma bicapa lipídica (*fence function* en inglés), formando una cerca o valla que separa el dominio apical del lado basolateral de las células epiteliales. Dado que estos dominios desempeñan funciones diferentes, la composición proteica y lipídica de los mismos también lo son, dándole una polaridad a la membrana plasmática de estas células (figura 1.4).

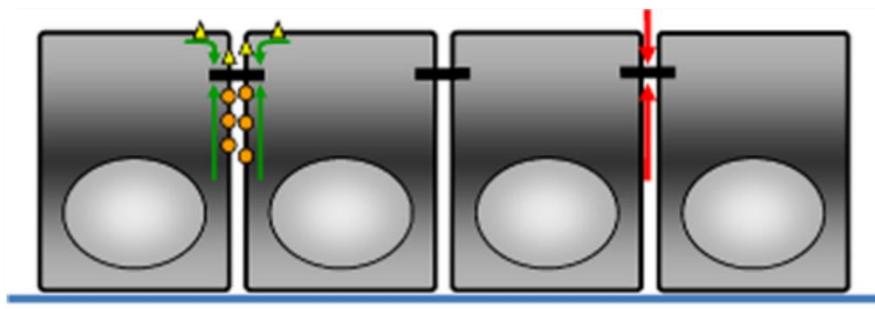


Figura 1.4: Diagrama esquemático representando las dos funciones principales de las TJ: a la izquierda la función "cerca" (representada en verde). A la derecha la función barrera (representada en rojo). Modificado de Sawada⁶.

Las *células caliciformes*, aunque en menor número, también están presentes en todo el intestino. Su función principal es secretar mucina, que se disuelve con el agua formando el moco que recubre la superficie epitelial libre, protegiéndola de agresiones externas. Las *células de Paneth*, localizadas en la base de las criptas de Lieberkühn, muestran prominentes gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas antibacterianas, como la lisozima, la fosfolipasa secretora A-2 y α -defensinas, las cuales son liberadas en la luz intestinal en función de una serie de estímulos⁷ y están relacionadas con el control de la microbiota intestinal⁸. Las *células enterocromafines* tienen una función secretora, encargándose de liberar al intestino sustancias como secretina, colecistocinina, péptido inhibitor gástrico, motilina, etc¹. Todas ellas tienen acción sobre la motilidad y secreción del estómago, la actividad pancreática y hepática o la regulación de la peristalsis del intestino. Finalmente, las *células M* son enterocitos especializados en la captación de antígenos lumbinales y posterior presentación de estos a las células inmunes presentes en la lámina media de la mucosa. No poseen microvellosidades en su superficie, como otros enterocitos, sino pliegues característicos que les ayudan a realizar su función.

- Capa submucosa.

Principalmente constituida por tejido conectivo denso, contiene adipocitos y vasos sanguíneos y linfáticos. En el duodeno, la submucosa presenta unas glándulas específicas denominadas glándulas de Brunner, especializadas en producir una secreción fuertemente alcalina. Su principal función consiste en neutralizar la acidez del quimo (la masa homogénea en que se transforman los alimentos dentro del estómago por efecto de la digestión) al entrar en el duodeno². Entre la capa submucosa y la muscular encontramos una de las agrupaciones neuronales intrínsecas del aparato digestivo, denominado plexo submucoso o de Meissner. Este plexo principalmente tiene una función secretora y de control del flujo sanguíneo local³.

- Capa muscular.

Formada por dos capas de músculo liso, una interna y otra externa con células orientadas de manera circular y longitudinal respectivamente. La capa circular provoca movimientos cortos en el contenido intestinal, mezclándolo con las secreciones

digestivas, a la vez que renueva la parte en contacto con las células epiteliales. La capa longitudinal por el contrario produce contracciones en forma de onda que facilitan el avance del contenido a través del intestino². Posteriormente se profundizará más sobre la función motora y el músculo liso intestinal.

Entre las dos capas musculares encontramos el plexo mientérico o de Auerbach, muy similar al plexo submucoso aunque con ciertas particularidades, como mayor número de ganglios, mayor compactación y función motora³.

- Capa serosa.

Mesotelio formado por tejido conectivo. Contiene vasos y nervios que lo atraviesan, conectando las capas más externas con el mesenterio¹.

El intestino delgado es el principal órgano digestivo, no sólo por tener un papel fundamental en la digestión, sino porque se encarga de la mayor parte de la absorción. Es la parte más extensa del sistema digestivo, midiendo en la especie humana de 6 a 8 metros de largo, unos 80 cm en ratas⁹ y unos 33 cm en ratones¹⁰. Se puede dividir en 3 zonas: una proximal o duodeno, separado del estómago por el píloro, seguido del yeyuno y una parte final llamada íleon. El íleon se comunica con el intestino grueso mediante la válvula ileocecal.

El duodeno, en humanos, tiene unos 25 cm de longitud, extendiéndose desde el píloro hasta la flexura duodenoyeyunal. Tiene forma curvada y se enrosca en torno al páncreas. Aquí el quimo se mezcla con los jugos intestinales, la bilis y el jugo pancreático, rico en amilasa, lipasa, tripsina y otras enzimas digestivas, transformándolo en el quilo, el cual, gracias a la capacidad contráctil de las paredes intestinales, es mezclado y propulsado para su procesado y absorción.

Aunque algunos nutrientes, como el hierro y el calcio (Ca^{2+}), se incorporan de manera más eficiente en el duodeno, es en el yeyuno donde la gran parte de ellos, al igual que ocurre con los aminoácidos y la mayoría de las vitaminas y minerales. Estos son transportados mediante canales o transportadores a través de las membranas celulares del yeyuno e incorporados a la vena porta, la cual los transporta al hígado¹.

El íleon es el responsable de completar la digestión de los nutrientes y de reabsorber las sales biliares que han ayudado a solubilizar las grasas. Aunque la mayoría de los nutrientes se absorben en duodeno y yeyuno, el íleon es el lugar donde se absorbe selectivamente la vitamina B12.

Después del íleon, posterior a la válvula ileocecal, se sitúa el **intestino grueso**. En la especie humana es una estructura tubular de aproximadamente metro y medio de largo. Posee una forma alargada con protuberancias debidas a la existencia de unas bandas longitudinales y contracciones circulares que dan lugar a unos bultos llamados haustras. Su división en humanos se hace en función de la morfología, encontrando en primer lugar el ciego, donde se sitúa el apéndice; seguido por el colon ascendente tras un leve estrechamiento, que se extiende desde el ciego hasta el ángulo o flexura hepática; posteriormente toma una orientación horizontal, donde pasa a llamarse colon transverso; cerca del bazo encontramos el ángulo esplénico, donde el colon desciende llamándose colon descendente; a nivel de la pelvis, se denomina colon sigmoideo o sigma, en forma de S y finalmente llegamos al recto, el cual termina en el conducto anal termina el tubo digestivo y tiene lugar la excreción.

En los roedores encontramos algunas diferencias en esta parte de la anatomía intestinal. Una de las principales diferencias se observa en el ciego. En los ratones este órgano presenta una forma arriñonada y un tamaño proporcionalmente superior al humano, además de estar diferenciado anatómicamente de la parte proximal del colon. Esto permite albergar una mayor cantidad de contenido intestinal para la reabsorción del exceso de agua e iones, ya que, por otra parte, el intestino grueso de los ratones es proporcionalmente más pequeño que el humano. Este no presenta las secciones ascendente, transversal y descendente, sino que se suele separar entre colon proximal, medio y distal, con una flexura visible entre el colon proximal y el medio. Otras diferencias notables son la ausencia de haustras y el menor espesor de la pared intestinal^{11,12}.

El intestino grueso no posee vellosidades ni pliegues circulares. Sin embargo, anatómicamente también está dividido en las mismas capas que el resto del tubo digestivo (**figura 1.5**), aunque con algunas particularidades²:

- Capa mucosa:

Principalmente formada por epitelio simple cilíndrico, también posee unas glándulas mucosas llamadas criptas de Lieberkühn que aparecen como unas invaginaciones de la superficie epitelial. En el colon encontramos también células mucosas, aunque en una proporción respecto a las células absorbentes (los colonocitos) mucho mayor que en el intestino delgado. Esta cambia de un 4:1 en la parte más cercana al intestino delgado, a un 1:1 en las zonas más cercanas al ano.

- Capa submucosa:

Formada por un tejido conectivo muy denso, vasos sanguíneos y tejido adiposo.

- Capa muscular:

A igual que el intestino delgado, el grueso también posee dos capas de musculatura lisa, una longitudinal más delgada y otra circular.

- Capa serosa:

Se trata de una fina capa de tejido conectivo que recubre el colon y lo conecta en determinados puntos con el peritoneo.

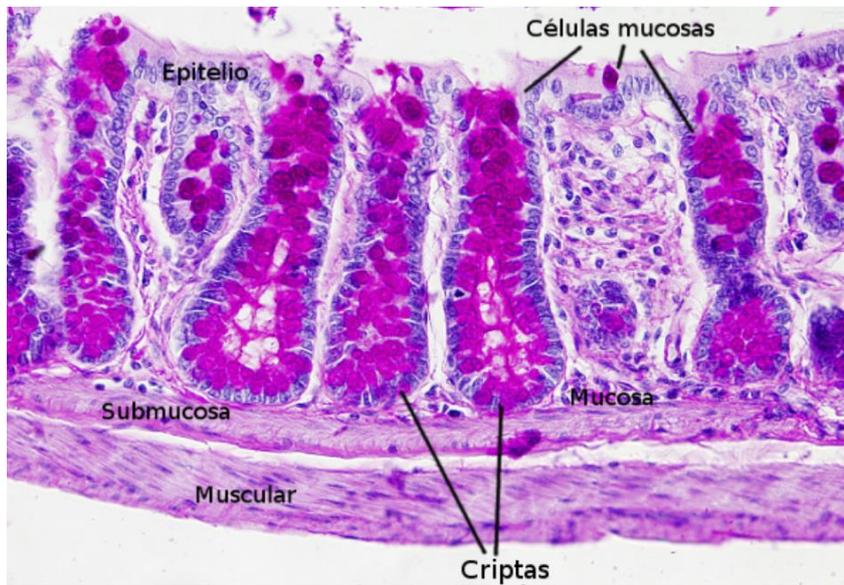


Figura 1.5: Intestino grueso de rata. Tinción con PAS-hematoxilina. Las células caliciformes aparecen de color rosado intenso².

La función del colon es almacenar y procesar su contenido hasta convertirlo en heces, facilitando la absorción de agua, iones, sales biliares y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). Estos últimos se producen gracias a la microbiota colónica, que fermenta los restos de nutrientes no absorbidos en el intestino delgado, y son indispensables para la integridad y la nutrición de las células del colon^{8,13,14}.

Para llevar a cabo un avance del bolo digestivo por el aparato digestivo y favorecer los procesos de digestión, secreción y absorción se requiere que el aparato intestinal presente una buena **motilidad gastrointestinal**. La motilidad gastrointestinal se define como la acción fisiológica del aparato digestivo encargada de desplazar el contenido de la boca hacia el ano, siendo responsable de esta actividad la musculatura lisa del aparato gastrointestinal, de la cual hablaremos posteriormente.

La regulación de la motilidad gastrointestinal depende de la interacción de un conjunto de elementos neuronales denominados sistema nervioso entérico (SNE), compuesto por los nombrados plexos de Meissner y Auerbach. Para realizar su función existe una red organizada de neuronas aferentes, intrínsecas primarias, motoras, intestinófugas e interneuronas que, junto con las células intersticiales de Cajal (ICC), regulan los estímulos nerviosos que originan la motilidad gastrointestinal. Aunque el SNE tiene capacidad de generar por sí mismo información, integrarla y producir una respuesta, está estrechamente relacionado con el sistema nervioso central (SNC). Las neuronas aferentes envían tres tipos de información al SNC, informando acerca de la composición química del contenido intestinal, el estado mecánico de su pared y la condición de los tejidos (pH, inflamación, frío o calor). Por su parte, las neuronas eferentes se encargan de llevar información del SNC al SNE. El sistema inmune también juega un papel clave en la regulación del sistema gastrointestinal, pudiendo modular la motilidad, el transporte iónico y la permeabilidad de la mucosa. Esto tendrá lugar al reconocer ciertas sustancias exógenas potencialmente patógenas, limitando así su acceso a la pared intestinal. La relación entre el sistema inmune y el sistema gastrointestinal produce que en determinadas enfermedades autoinmunes o inflamatorias se generen alteraciones funcionales del intestino, como la diarrea infecciosa o el estreñimiento¹⁵.

Dada la diferencia funcional del colon con el intestino delgado, los movimientos contráctiles o motilidad intestinal también presentan disparidad.

En el intestino delgado existen dos tipos de motilidad:

- Las contracciones de segmentación (**figura 1.6**). Son unos movimientos breves y constantes en anillos de la musculatura lisa, los cuales mezclan el quimo con los jugos intestinales y empujan los nutrientes contra la mucosa para ser absorbidos. Estos tienen lugar con mayor frecuencia en el duodeno (12 veces por minuto) y van disminuyendo conforme se acercan al colon¹⁶.

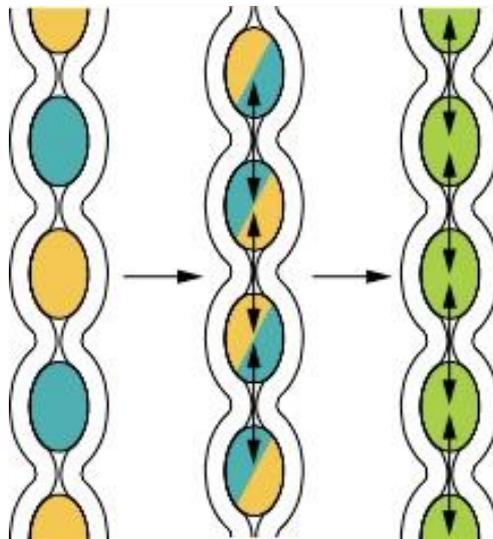


Figura 1.6. Movimientos de Segmentación. Se encargan de mezclar el quimo con las secreciones digestivas, facilitando su digestión y absorción¹⁶

- Los movimientos peristálticos, de propulsión o simplemente peristalsis¹⁷. Estos movimientos involucran grandes tramos de tubo digestivo, generando una contracción de un anillo de musculatura lisa, la cual va avanzando, relajando la musculatura que deja atrás, lo que provoca un empuje del contenido digestivo a través del tubo gástrico. Estos reflejos pueden tardar varios minutos en producirse por completo.

En el colon tiene lugar una motilidad más lenta, la cual compacta el contenido para la formación de las heces y extracción de sales y agua. Así encontramos tres tipos de movimientos^{17,18}:

- Movimientos de segmentación: Ondas de mezcla para homogeneizar los residuos procedentes del intestino delgado.
- Movimientos antiperistálticos: Producen que la materia fecal vuelva al ciego para completar la reabsorción de agua y electrolitos.
- Movimientos en masa: Los más potentes de todos, que contraen secciones enteras de intestino grueso enviando la materia fecal desde el colon proximal hasta el colon distal.

1.2. MÚSCULO LISO INTESTINAL

El músculo liso está presente en aquellas estructuras corporales que no requieren de un movimiento voluntario, tales como el aparato digestivo, vías respiratorias, vesícula biliar, vasos sanguíneos y linfáticos, globo ocular, etc. Así como las fibras musculares del músculo esquelético se activan exclusivamente por el sistema nervioso central, la contracción del músculo liso puede ser estimulada por señales muy variables, como estimulación hormonal, señales nerviosas, distensión del músculo u otros mecanismos. Esto es debido a que la membrana celular del músculo liso contiene muchos tipos de proteínas receptoras, tanto activadoras como inhibidoras, de la contracción muscular¹⁹.

Las células del músculo liso son uninucleadas, fusiformes, alargadas y uniformes, presentando en ocasiones sus extremos ramificados. Tienen una longitud entre 50 y 400 μm , un diámetro entre 8 y 10 μm y un volumen de unos 3.500 μm^3 . En estado relajado, el núcleo ocupa la posición central, presentando en sus polos zonas del citoplasma que albergan la mayor parte de los orgánulos organizados por citoesqueleto. El resto del citoplasma contiene un aparato contráctil que, a diferencia de en la musculatura esquelética o cardíaca, no está organizado en estructuras regulares o estrías visibles en microscopía electrónica^{20,21}.

Una de las primeras clasificaciones en este tipo de musculatura la describió en 1948 Bozler²², distinguiendo entre músculo liso unitario o visceral y multiunitario. En el primero de ellos, encontramos células musculares dispuestas en láminas, intercalando los extremos de las células entre las zonas medias de otras. En este caso, entre las células se producen unas uniones en hendidura por tejido conectivo laxo, que permiten al músculo liso actuar como un sincitio. Esto favorece el hecho de que, con la inervación de unas pocas células, el potencial de acción que se da en ellas transmita la respuesta en sincronía a través de toda la unión. En este tipo de musculatura lisa, la actividad eléctrica y mecánica suele ser espontánea, siendo modulada, pero no desencadenada, por estímulos neurales o humorales. Este tipo de tejido lo encontramos principalmente en vísceras huecas, como el tubo digestivo, uréter, vasos sanguíneos... Aquí la función del músculo liso es doble, por una parte, trata de mantener el diámetro frente a distensiones dañinas mediante su

contracción tónica y, por otra, ayuda a realizar las funciones propias del órgano, a través de movimientos de motilidad intestinal o la regulación del flujo sanguíneo en el sistema vascular.

Por otra parte, en el tejido muscular multiunitario cada célula es una unidad independiente con su propia innervación y, normalmente, aislada de otras por tejido conectivo. Este hecho produce unas contracciones más localizadas y graduales, que pocas veces generan un potencial de acción o contracciones espontáneas. Este tipo de musculatura lisa lo encontramos en el músculo del iris o los músculos piloerectores, entre otros.

También podríamos incluir un subtipo de célula muscular lisa llamado célula mioepitelial. Esta se encuentra localizada entre la membrana basal y los epitelios y facilita, gracias a su capacidad contráctil, la expulsión de secreciones de las glándulas secretoras. Esta musculatura tiene una gran semejanza con el músculo liso, sin embargo, no se suele incluir en este tipo celular, ya que su origen es mayoritariamente del ectodermo, al contrario que el resto de musculatura lisa que proviene del mesodermo.

Regulación del músculo liso

Las células musculares lisas están reguladas por multitud de sistemas, como las ICC, neuronas motoras, hormonas, sustancias paracrinas y mediadores de inflamación. Estos sistemas reguladores, especialmente en el periodo postprandial, actúan conjuntamente para movilizar toda la musculatura del aparato digestivo. Esto provoca que las señales motoras sean unas respuestas altamente coordinadas, debido a lo cual, parte de las patologías gastrointestinales son consecuencia de una alteración en su regulación²³.

Las células musculares lisas del sistema gastrointestinal muestran un comportamiento autónomo, tienen una serie de sistemas reguladores intrínsecos que pueden amplificar o disminuir la señalización de los sistemas reguladores principales, como el sistema nervioso entérico o las hormonas. La regulación intrínseca (ni hormonal ni neuronal) del intestino ha sido descrita previamente en la bibliografía como “miogénica”, pero ahora se reconoce que el término también incluye, además de los

mecanismos del músculo liso, el comportamiento de las ICC. Estas actúan de una manera similar a las células marcapasos del corazón. Al estar acopladas eléctricamente a las células musculares lisas, generan en estas pequeños cambios en su potencial de membrana, lo que se conoce como ritmo eléctrico básico u ondas lentas. Cuando el potencial de reposo, alrededor de -50 mV, supera un umbral eléctrico (-40 mV), se produce un potencial de acción o en espiga, el cual se trasmite a través de las *gap junction* al resto de células. La fuerza y duración de la contracción del músculo está relacionada con el número de potenciales de acción generados, su frecuencia y su amplitud.

Además, las células musculares lisas pueden modificar su potencial de reposo por factores nerviosos, mecánicos y hormonales^{24,25}. Años atrás se debatía la importancia del mecanismo miogénico frente al neurogénico en la regulación de la motilidad intestinal. Hoy en día se considera fundamental el papel del sistema nervioso entérico en la generación de los movimientos motores, especialmente en intestino delgado y grueso, además de en la regulación de la amplitud de las contracciones, aunque también se reconoce que las respuestas del músculo a los estímulos neuronales dependen en última instancia de la excitabilidad del sincitio musculo liso – ICC. Pese a que estos sistemas se han estudiado en profundidad en las últimas décadas, muchas de las cuestiones que genera siguen sin resolverse, principalmente debido a que la mayoría de los ensayos realizados son en animales que presentan diferencias determinantes con respecto a los humanos a este nivel celular²³.

Contracción del musculo liso

Debido a que las células musculares lisas no contienen troponina, la formación de puentes cruzados no está regulada por el complejo troponina-tropomiosina como en el músculo estriado, sino por una proteína reguladora llamada calmodulina (CaM). Cuando una célula muscular lisa recibe un estímulo químico o físico, neurotransmisores, hormonas, etc., la respuesta de la célula es el incremento de la actividad de la fosfolipasa C mediante el acoplamiento a través de una proteína G. La fosfolipasa C produce dos segundos mensajeros de la membrana plasmática, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃). El DAG junto con el Ca²⁺ activa la proteína quinasa C, la cual fosforila

proteínas específicas, mientras que el IP_3 se une específicamente a receptores en el retículo sarcoplásmico, provocando la liberación de Ca^{2+} en el citosol. Este Ca^{2+} libre se une a la proteína CaM formando el complejo Ca^{2+} -CaM. Este complejo activa la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MCLK). La MCLK transfiere un fósforo inorgánico desde el trifosfato de adenosina (ATP) a la cadena ligera reguladora, acción que promueve la interacción entre la actina y la miosina, formándose puentes cruzados a lo largo de los filamentos de actina y produciéndose así la contracción del músculo^{26,27} (figura 1.7).

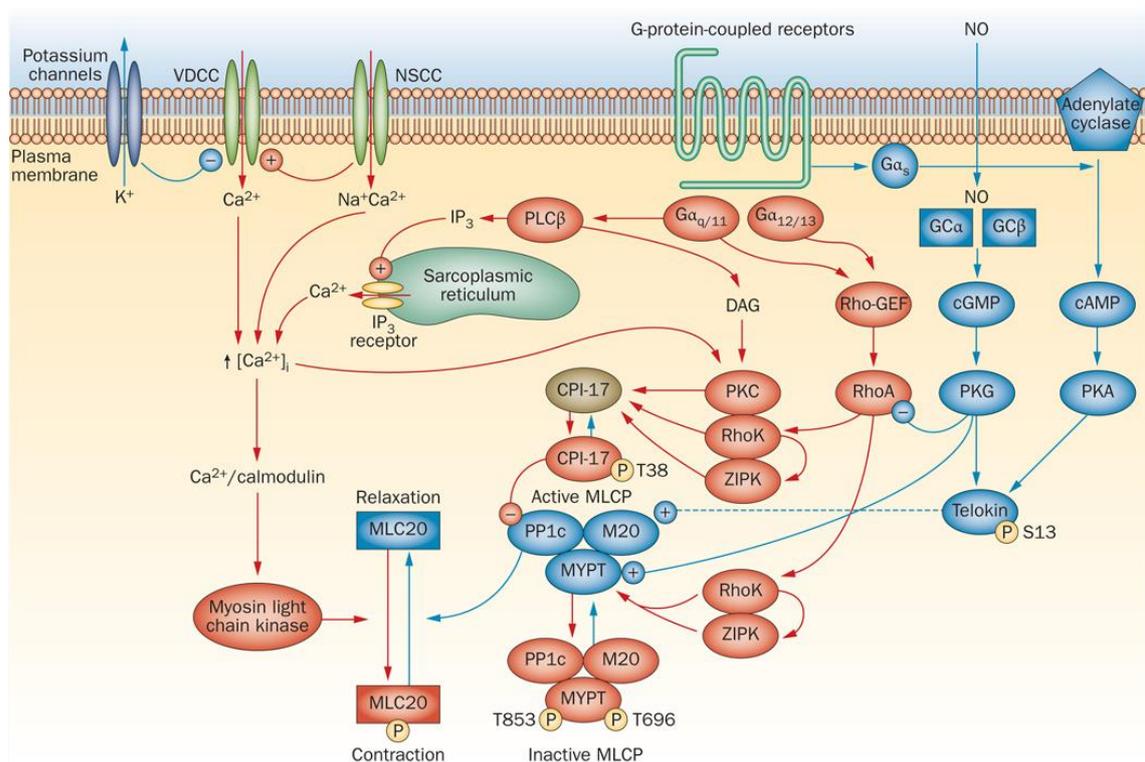


Figura 1.7: Regulación de la contracción del músculo liso intestinal. Los mecanismos que inducen contracción están representados en rojo, mientras que las vías vinculadas a una relajación se indican en azul²⁸.

Relajación del músculo liso

La relajación del músculo liso puede ocurrir, bien debido a una relajación pasiva, consecuencia de la desaparición del estímulo contráctil, o bien debido a una relajación activa, por la acción de una sustancia que provoque la inhibición del mecanismo contráctil. Independientemente, la relajación de la musculatura lisa requiere una disminución de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y/o un aumento en la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLC)^{26,29}.

Una disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ provoca una relajación de las células musculares lisas. Parte de los mecanismos que están implicados en la disminución del calcio citosólico involucran al retículo sarcoplásmico y a la membrana plasmática²⁷. La captación del calcio por el retículo sarcoplásmico depende de la bomba SERCA, en concreto por la isoforma SERCA2b. Esta bomba Ca^{2+} -ATPasa requiere Mg^{+2} para llevar a cabo su actividad y está regulada por la proteína fosfolambán (PLN) y las proteínas secuestradoras de calcio calreticulina y calsecustrina. Cuando el PLN es fosforilado por la proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA), activa la bomba SERCA, lo que aumenta el flujo de Ca^{2+} hacia el retículo sarcoplásmico disminuyendo la $[Ca^{2+}]_i$ ^{29,30}.

Los canales de Ca^{2+} operados por ligando o los canales de calcio activados por voltaje (VGCC) localizados en la membrana plasmática también tienen un papel fundamental en el flujo de Ca^{2+} y en la contracción del músculo liso. Una inhibición en estos canales bloquea la entrada de Ca^{2+} en la célula, favoreciendo así su relajación. Antagonistas de estos canales, como la dihidropiridina (DHP), las fenilalquilaminas y las benzodiazepinas se unen a distintos receptores en la proteína del canal e inhiben la entrada de Ca^{2+} en el músculo liso, produciendo la relajación muscular³⁰.

En la regulación de la contracción-relajación del músculo liso también intervienen las proteínas quinasas de la familia Rho. La Rho A y la Rho-quinasa regulan notablemente la actividad de la fosfatasa de la MLC³¹. La Rho A, una proteína G monomérica, tiene regulada su actividad por la unión de guanósín trifosfato (GTP), transición mediada por un factor Rho intercambiador de nucleótidos de guanina. Este habilita el intercambio de nucleótidos Rho A-GDP a Rho A-GTP, activando así la Rho A^{32,33}. Rho A-GTP activa la Rho-quinasa, la cual fosforila la subunidad de la fosfatasa de la MLC de unión a la miosina (MYPT1) e inhibe su actividad^{33,34}. *In vivo*, la inhibición farmacológica de la Rho-quinasa provoca la relajación del músculo liso³⁵.

Otra vía de relajación muscular es la vía NO/GMPc/GKlc. El óxido nítrico (NO) es la molécula mensajera más pequeña. Es un gas que participa en la mediación de numerosos procesos fisiológicos, como el tono vascular, la motilidad intestinal, la agregación plaquetaria, la apoptosis o la neurotransmisión, entre otros.³⁶ Su presencia puede inducir relajación de la musculatura lisa debido a un descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ ^{37,38}. El NO tiene varias vías de actuación. En general, se acepta que se une al hierro del grupo hemo de la

guanilato ciclasa soluble, produciendo la síntesis de guanosín-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) y la activación de una proteína quinasa tipo I dependiente de GMPc (GK1c)³⁹, la cual regula la afinidad del calcio por el aparato contráctil. Esta proteína fosforila a la Rho A, induciendo su traslocación desde la membrana citoplasmática al citosol, y dejándola inactiva. Esta reacción podría disminuir la activación de Rho-quinasa e incrementar la actividad de la fosfatasa de la MLC, produciendo de este modo una disminución de la afinidad por el calcio y la relajación del músculo liso³⁹. Además, el NO puede inhibir el incremento de calcio producido por los agonistas por varias vías; afectando a la producción de IP₃⁴⁰ o modificando las concentraciones del calcio intracelular⁴¹.

1.3. DIANAS FARMACOLÓGICAS: CANÁLES IONICOS Y ENZIMAS

El término conocido como “diana farmacológica” hace referencia al lugar donde un fármaco determinado ejerce su función en el organismo. Por norma general suelen ser proteínas específicas con un papel fisiológico en la célula, como receptores, enzimas, transportadores, canales iónicos o incluso material genético como el ADN. El requisito previo indispensable para ser una diana farmacológica es que su estructura sea lo suficientemente compleja para que se le una específicamente un determinado fármaco. En las proteínas, esta característica viene dada por su estructura terciaria. Esta unión, diana-fármaco, ejerce un efecto farmacológico, modulando su función celular⁴².

Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas que permiten el paso de iones cargados a través de membranas hidrófobas. Estas son unos sistemas complejos que conducen los iones de manera específica a una velocidad cercana a la de difusión bajo una regulación muy estricta⁴³.

Debido al papel que juegan los canales iónicos en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, estas proteínas de membrana son el objetivo de numerosos fármacos, es decir, son considerados dianas terapéuticas, como en el tratamiento de la epilepsia o procesos inflamatorios, aunque es un terreno en vías de desarrollo debido a su complejidad⁴³. Los canales iónicos se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligando y canales mecanosensibles. Los más importantes terapéuticamente hablando son los canales activados por voltaje de calcio, potasio, sodio y cloro, presentes en la membrana de una gran variedad de células, siendo responsables de la excitabilidad eléctrica y de la señalización en células nerviosas y musculares⁴⁴. Además, estas proteínas de membrana están también involucradas en la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de fármacos, definiendo así importantes aspectos de la farmacodinamia y farmacocinética⁴⁵, contribuyendo de manera frecuente en la aparición de los llamados efectos adversos. Debido a la importancia de estos elementos en el funcionamiento del cuerpo humano, hace unos años se instauró el concepto de “canalopatía”, el cual hace

referencia a las patologías resultantes de alteraciones en la estructura o función de los canales iónicos.

Las células musculares lisas expresan uno o dos tipos de canales de calcio activados por voltaje (VGCC)⁴⁶, al menos cuatro tipos diferentes de canales de potasio^{47,48}, dos o más canales de cloro⁴⁹ y canales catiónicos no selectivos (NSCC) como los canales de la familia TRP (receptor de potencial transitorio)^{50,51}. Hay dos tipos de canales iónicos intracelulares: los liberadores de calcio activados por calcio (RyR, receptores de la ryanodina) y los receptores del inositol trifosfato (IP₃R) (figura 1.8).

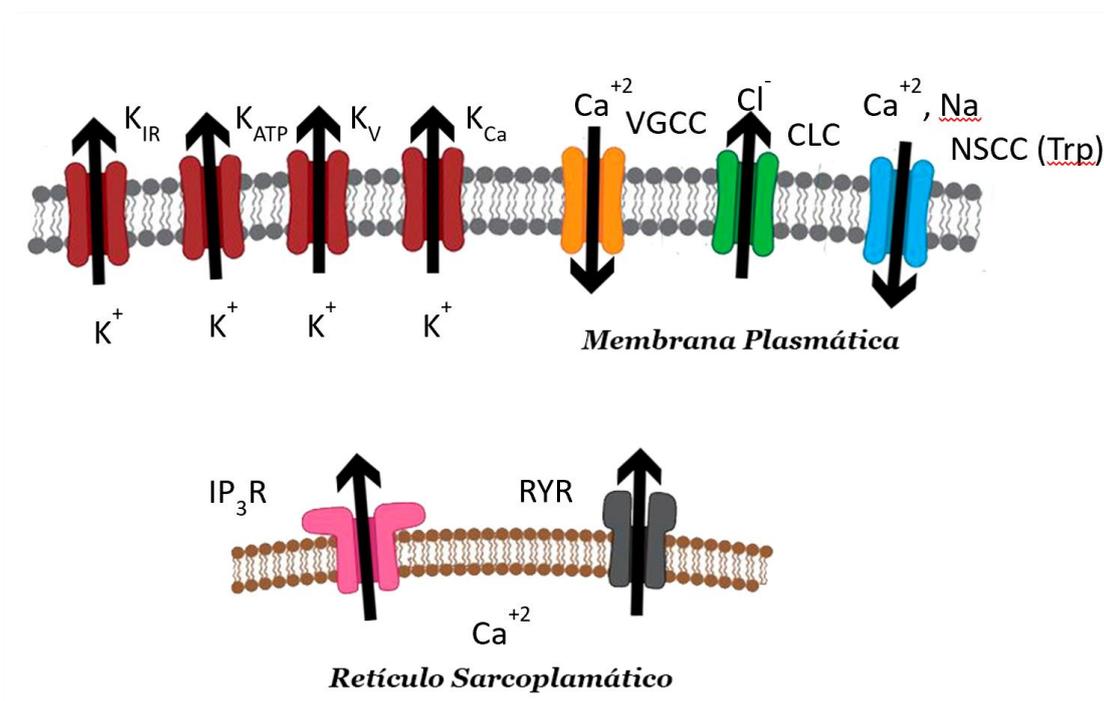


Figura 1.8: Canales iónicos en el músculo liso, modificado⁵².

Debido a la gran cantidad de canales que presentan las células musculares y con el objetivo de facilitar la lectura y comprensión de este apartado, se explicarán con mayor detalle los canales abordados en esta tesis doctoral.

Canales de calcio

Como hemos visto en el apartado de la regulación del músculo liso, el calcio tiene un papel fundamental en la célula muscular. El aumento de la [Ca²⁺]_i es el primer paso para el fenómeno de la contracción. Existen dos vías que provocan este aumento: a) la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular y b) la liberación del Ca²⁺ desde los reservorios

intracelulares. En el caso de las células musculares lisas, su mayor reservorio es el retículo sarcoplásmico⁵³, aunque también las mitocondrias y otros orgánulos pueden almacenarlo⁵⁴.

- Canales de Ca^{2+} activados por voltaje (VGCC)

Estos canales están codificados por al menos seis genes y compuestos de subunidades α formando un poro y varias subunidades accesorias⁵⁵. Estas son grandes proteínas con 4 segmentos repetidos, cada uno con seis dominios transmembrana (S1-S6)⁵⁶. Podemos distinguir tres tipos de VGCCs: los activados por alto voltaje tipo L o Ca_v1 ($Ca_v1.1-1.4$), los activados por alto voltaje tipo N o Ca_v2 ($Ca_v2.1-1.3$, P, Q, R) y los activados por bajo voltaje tipo T o $Ca_v3.1-3.3$. En la musculatura lisa gastrointestinal sin embargo solo se encuentran los tipo L y los tipo T⁵⁷.

La principal entrada de calcio dentro de las células de la musculatura lisa gastrointestinales se produce a través de los canales de calcio tipo L sensibles a la DHP⁵⁸. Estos canales están expresados en todas las células de musculatura lisa del tracto gastrointestinal. Su importancia ha sido demostrada a través de la inhibición de la contracción muscular cuando se han utilizado sustancias bloqueantes de las DHP. Este canal está activado por voltaje, con una activación observada aproximadamente a -40 mV y tiene su máxima activación cerca de 0 mV. La entrada de calcio genera una retroalimentación negativa en el propio canal tipo L, a través de una unión directa del ion con la proteína del canal, lo que lleva a una disminución en la probabilidad de apertura⁵⁹.

El canal de Ca^{2+} tipo L demuestra mecanosensibilidad cuando se le somete a tensión, presión o a incrementos del tamaño celular (**figura 1.9**). Las fuerzas mecánicas aplicadas conllevan un incremento en el influjo de calcio a través de este canal⁶⁰. Este proceso de activación del canal en el músculo liso es muy importante, ya que tanto la respuesta contráctil como otras funciones del músculo liso visceral que dependen del Ca^{2+} como molécula de señalización pueden ser directamente reguladas por fuerzas mecánicas en la célula, fuerzas que pueden venir de la actividad de la propia célula o de actividad adyacente.

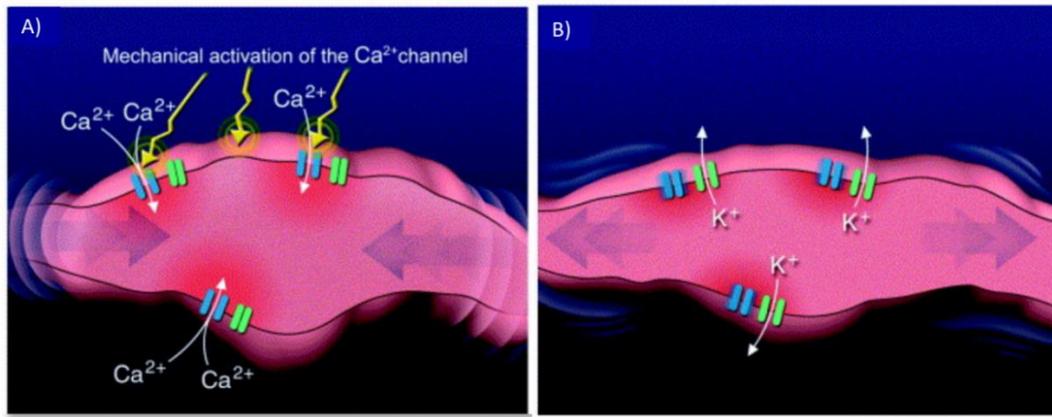


Figura 1.9: Imagen representativa de la activación mecanosensible de los canales Ca^{2+} tipo L. **(A)** Simulación de una distensión luminal que provoca la activación mecánica de los canales de Ca^{2+} tipo L, aumento del Ca^{2+} intracelular e inicio de la contracción. **(B)** Un aumento del Ca^{2+} intracelular activa los canales KCa , provocando un flujo de K^+ hacia el exterior de la célula, la hiperpolarización de esta, el cierre de los canales de Ca^{2+} tipo L y la relajación muscular⁵⁷.

Comparados con los canales tipo L, los canales tipo T se activan a un menor voltaje, siendo más resistentes a la DHP y presentando una inactivación más rápida. Aunque la presencia de este canal se ha comprobado en miocitos intestinales de cobaya, rata y *bufo marinus*, su función fisiológica no está tan clara como en los canales tipo L⁶¹. En las células sinoauriculares cardíacas, los canales tipo T se han relacionado con la generación de la corriente marcapasos⁶², siendo esta su función más aceptada en las células del músculo liso gastrointestinal y las células intersticiales de Cajal⁶¹.

- **Canales catiónicos no selectivos (NSCC)**

Los NSCC son habitualmente permeables al K^+ y al Na^+ y, en menor medida al Ca^{2+} y Mg^{2+} . El flujo de estos iones a través del canal depende del gradiente electroquímico de estos cationes. Se incluyen dentro de esta familia los canales TRP, una superfamilia que incluye más de 20 canales catiónicos que poseen secuencias homólogas que predicen estructuras similares. Están compuestos por 4 subunidades que forman el poro y cada subunidad, a su vez, está formada por 6 dominios transmembrana⁶³. Los canales TRP tienen múltiples mecanismos de activación; por ligando, por estiramiento y tónicamente⁶⁴. Se han descrito al menos dos canales TRP como responsables de la corriente marcapasos de las ICC en un modelo murino^{65,66}, sin embargo, aún son necesarias más investigaciones para definir el papel exacto de estos canales y establecer si están involucrados en la corriente marcapasos en humanos⁶⁷.

Canales de potasio

El K^+ es el principal ion que interviene en restablecer el potencial de reposo celular. Debido a su mayor relevancia en el transporte de este ion en la musculatura lisa gastrointestinal y en las ICC, nos centraremos en los canales de potasio activados por voltaje (K_v) y canales de potasio activados por Ca^{2+} .

- Canales de Potasio activados por voltaje (K_v)

Este tipo de canal está expresado en todos los músculos lisos gastrointestinales estudiados. Este canal mantiene una pequeña actividad de salida de K^+ en el potencial de reposo de la membrana. Durante la despolarización adquieren su máxima actividad, siendo el pico a potenciales de 0 mV. Esto se demostró al aumentar la actividad de estos canales de manera proporcional a la despolarización celular⁶⁸. Ante una despolarización mantenida, los K_v tienden a inactivarse y cesar su corriente. En función de sus rangos de activación y desactivación, podemos distinguir entre dos tipos de K_v , los rápidos ($K_{v\text{ fast}}$) y los lentos ($K_{v\text{ slow}}$). Los $K_{v\text{ slow}}$ pueden ser bloqueados hasta un 50% por el tetraetilamonio, mientras que los $K_{v\text{ fast}}$ son mucho más resistentes, logrando sólo un 30% de bloqueo en los mejores casos. Sin embargo la 4-aminopiridina los bloquea por completo^{69,70}. Por otro lado, la bibliografía existente sugiere que la PKA y agentes que aumenten la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) incrementan la probabilidad de abrir estos canales⁷¹. Estos mismos canales son responsables de la hiperpolarización de la membrana provocada por agentes que estimulan la producción de AMPC⁷². También se ha asociado al NO con la estimulación de la apertura de estos canales⁷¹.

- Canales de Potasio activados por Calcio (KCa)

En la mayoría de los tipos de células musculares lisas, una fuerte entrada de Ca^{2+} en la célula produce una despolarización y esta se acompaña por una fuerte salida de K^+ . Se han identificado tres tipos de canales de potasio activados por calcio: canales de potasio activados por calcio de larga conductancia (BK_{Ca}), canales de potasio activados por calcio de media conductancia (IK_{Ca}) y los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (SK_{Ca})⁷³.

Gran parte de este gradiente de salida de potasio fuera de la célula es generado por la apertura de los canales BK_{Ca} ⁷⁴⁻⁷⁷, donde podemos encontrar el $KCa1.1$, $KCa4.1$, $KCa4.2$ y $KCa5.1$. Estos canales se comportan de una manera similar a los K_v , ya que se activan por

voltaje. Conforme aumenta la concentración de Ca^{2+} en la despolarización, disminuye su umbral de activación. Esto hace que los canales BK_{Ca} se activen en el pico de los potenciales de acción mediados por el Ca^{2+} en el músculo liso gastrointestinal y contribuyan a la fase de repolarización.

Estudios de biología molecular han demostrado que la sensibilidad al Ca^{2+} de los canales BK_{Ca} reside en una región C-terminal exclusiva de los mismos⁷⁸. Los canales BK_{Ca} tienden a abrirse en ráfagas, lo que indica que la apertura concertada de muchos de estos canales da lugar casi simultáneamente a corrientes externas transitorias espontáneas (STOC), que se han registrado a partir de células musculares lisas del aparato gastrointestinal^{75,79}. Las denominadas STOC se cree que son activadas por liberaciones pulsátiles de Ca^{2+} desde los almacenes sensibles a la rianodina, desencadenados por el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L⁷⁹.

A pesar de que la actividad de los canales BK_{Ca} está principalmente regulada por la concentración de Ca^{2+} dentro de la célula, un estudio en células musculares lisas vasculares mostró que pueden ser directamente activados por NO o GMPc ⁸⁰. El NO estimula los canales BK_{Ca} produciendo la hiperpolarización de la membrana y el cierre de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L, eliminando el influjo de calcio y produciendo por lo tanto la relajación del músculo liso.

Los canales BK_{Ca} son dianas utilizadas por agentes antiinflamatorios en el intestino y se ha demostrado que su actividad aumentaba en células musculares lisas de colon canino en procesos inflamatorios de su mucosa⁸¹. El más conocido de estos canales es el KCa1.1 , estando en investigación diversas sustancias que producen su apertura como nuevas terapias para accidentes cerebrovasculares, epilepsia, hiperreactividad de la vejiga, asma e hipermotilidad gástrica⁸². El KCa4.1 y KCa4.2 contribuyen a ralentizar las hiperpolarizaciones durante la señalización neuronal repetitiva⁸³. Mientras que el papel fisiológico del KCa5.1 permanece desconocido.

Los canales de potasio activados por calcio de media conductancia (IK_{Ca1} o SK_{Ca4} (KCa3.1) y baja conductancia (SK_{Ca1} (KCa2.1), SK_{Ca2} (KCa2.2) y SK_{Ca3} (KCa2.3)) tienen una sensibilidad al calcio 10 veces mayor que los BK_{Ca} y aparentemente no tienen una dependencia del voltaje⁸⁴.

El canal KCa3.1 de intermedia conductancia fue descrito por primera vez por Gardos en eritrocitos en 1958⁸⁵. Comparte entre un 42-44% de secuencia con los canales KCa2 y tiene un extremo C-terminal similar con dominio de unión para CaM, aunque más pequeño⁸⁶. Altos niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) han sido hallados en placenta, pulmón, glándulas salivares, colon distal, próstata y tejidos inmunes, como el timo, hígado, bazo, médula ósea, nódulos linfáticos y linfocitos de sangre periférica^{87,88}. El KCa3.1 tiene una importante función fisiológica en endotelios, epitelios secretores, proliferación de células musculares lisas y células del sistema hematopoyético. En todos estos tejidos forma parte de la cascada de señalización que involucra aumentos de calcio durante la proliferación celular, la secreción y la regulación de volumen⁸⁶. Al contrario que en los KCa2, la fuente de Ca²⁺ para la activación del KCa3.1 no son los canales VGCCs, sino canales rectificadores internos en las células T^{89,90} o canales iónicos TRP anteriormente nombrados, como el TRPC1 en la proliferación de músculo liso⁹¹. En el epitelio, el Ca²⁺ para su activación durante los procesos de secreción es liberado de almacenes intracelulares, después de la activación de los receptores acoplados a la proteína G, como el receptor muscarínico de la acetilcolina⁸⁶.

En tejidos que participan en el transporte de sales y líquidos, como el intestino, el colon, pulmones y las glándulas salivales, la actividad del KCa3.1 se encuentra en el lado basolateral del respectivo epitelio, donde genera un flujo de potasio que favorece la secreción de cloro y agua hacia el lado apical (**figura 1.10**)⁹². Las células epiteliales acumulan iones cloruro por encima de su potencial electroquímico a través de la activación del cotransportador NKCC1, mientras que el canal KCa3.1 y el Kv7.1 reciclan K⁺ fuera de la célula, generando así el gradiente que favorece la secreción de cloro⁹³⁻⁹⁵. Este cloro sale a la luz intestinal a través del canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) localizado en la membrana apical.

Su papel en la regulación del transporte electrolítico lo ha relacionado con algunas patologías gastrointestinales, habiéndose observado una reducción de su expresión a nivel epitelial en pacientes con colitis ulcerosa, supuestamente implicada en los cambios en la secreción absorción de cloruro en esta enfermedad⁹⁶. Además, su bloqueo farmacológico podría tener efectos antidiarreicos, teniendo en cuenta que el clotrimazol, inhibidor selectivo del canal, redujo la diarrea inducida por la toxina del cólera⁹⁷.

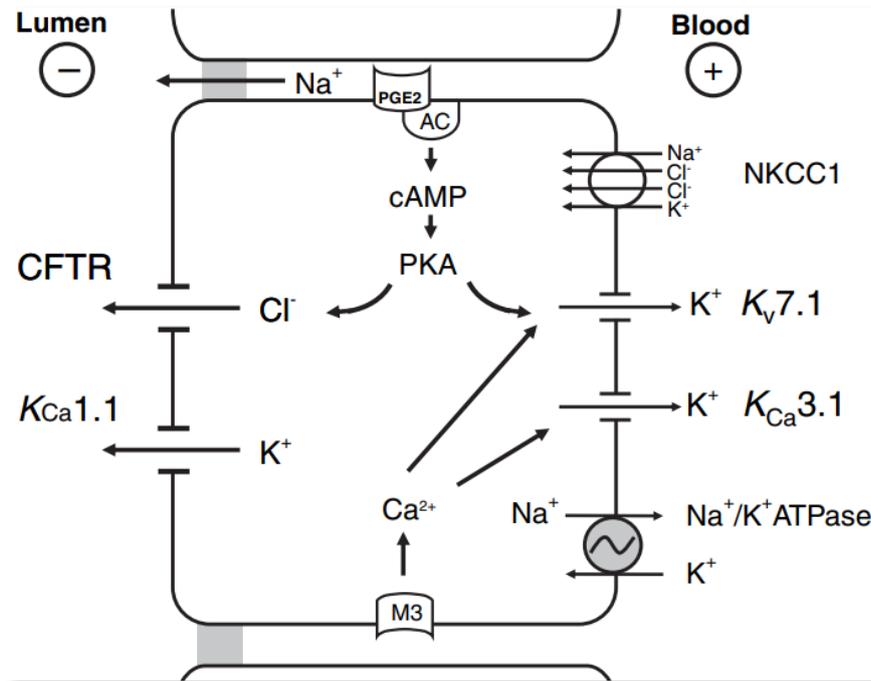


Figura 1.10: Esquema de la secreción electrogénica de Cl^- en criptas de colon distal murino⁹².

Finalmente, los SK_{Ca} fueron localizados por primera vez en músculo esquelético de rata⁹⁸ y fueron caracterizados por su sensibilidad a la toxina de veneno de abeja, la apamina. Su identidad molecular no fue descubierta hasta 14 años después, cuando fue clonado por Köhler y cols.⁹⁹. La familia de canales SK_{Ca} es altamente homóloga, con un grado significativo de conservación de la secuencia en la región del poro, así como en el extremo C-terminal, donde se puede encontrar el dominio de unión de la Calmodulina. El análisis bioquímico, así como estudios de expresión en ovocitos de *Xenopus*, han confirmado que la estequiometría entre subunidades SK_{Ca} y CaM es 1:1, lo que concuerda con el hecho de que cada subunidad del canal posee un dominio de unión para la CaM^{87,100}. El papel de estos canales en la regulación del potencial de membrana, su modulación en la secreción de neurotransmisores y hormonas y su modulación de la excitabilidad postsináptica, han hecho que se le relacione con actividades tan diversas como la regulación del tono vascular o la capacidad de memoria y aprendizaje⁸⁶.

Canales de cloro

Muchos de los canales iónicos considerados de cloro son permeables no solo a este, sino también a otros aniones como nitratos, fosfatos y aminoácidos cargados negativamente. El potencial de equilibrio para el Cl^- en miocitos gastrointestinales no está estrictamente establecido, aunque se le considera cercano a -40 mV. La apertura de un canal de cloro en una célula muscular o ICC normalmente acompaña a una salida de Cl^- y por lo tanto a la despolarización celular. Sin embargo, si la cinética del canal es tal que el canal está abierto a potenciales de membrana más positivos que el potencial de equilibrio del Cl^- , como el que puede ocurrir en la meseta de una onda lenta, se producirá una entrada de Cl^- a la célula y por tanto, una hiperpolarización⁶⁷.

Los canales iónicos del ion cloruro son muy diversos. Se pueden clasificar en función de su mecanismo de activación en, canales activados por voltaje, CFTR, activados por calcio, activados por volumen y activados por ligando (como los canales del ácido γ -aminobutírico o GABA). Los descritos hasta la fecha en el músculo liso gastrointestinal e ICC incluyen los activados por ligando, por voltaje, por volumen y por calcio⁶⁷.

A pesar de que no ha sido descrita una mecanosensibilidad presente en los canales de cloro de la musculatura lisa gastrointestinal y las ICC, los canales de cloro activados por volumen presentan actividad ante un incremento del tamaño de las células, como ocurre cuando están sometidas a un medio hipotónico, aumentando de este modo tanto el potencial de la membrana en reposo como el potencial de meseta de onda lenta⁶⁷.

Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, acelerando reacciones químicas que suceden en el organismo. Están implicadas en numerosas reacciones metabólicas, tanto fisiológicas como patológicas, por lo que su modulación como dianas farmacológicas puede alterar el desarrollo y evolución de una enfermedad. Enzimas como las óxido nítrico sintasas (NOS), las ciclooxigenasas (COX) o las lipooxigenasas, entre otras, son claves en el desarrollo de la cascada inflamatoria y juegan un papel crucial en enfermedades inflamatorias intestinales como la CU¹⁰¹.

Óxido Nítrico Sintetasas

El óxido nítrico es un neurotransmisor parasimpático inhibitorio no adrenérgico no colinérgico, considerado el principal neurotransmisor inhibitorio en la regulación de la musculatura lisa intestinal^{102,103}. Es producido por el sistema nervioso entérico, permitiendo relajar la musculatura lisa gastrointestinal y regulando así la peristalsis¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. El NO se produce a partir de la arginina en una reacción catalizada en el intestino principalmente por tres enzimas denominadas óxido nítrico sintetasas, la NOS neuronal (nNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS).

La nNOS es la fuente principal de NO en el intestino^{107,108} y una alteración en su producción puede alterar notablemente la motilidad gastrointestinal normal¹⁰⁹. En ratones, los antagonistas de la vía NO/GMPc inhiben la relajación de la musculatura lisa gastrointestinal¹⁰⁵ y la deleción genética de la nNOS retrasa el tránsito intestinal^{107,109,110}. En humanos, la inhibición de la nNOS aumenta la contractibilidad gastrointestinal, mientras que el aumento de las neuronas nitrérgicas se relaciona con en el estreñimiento crónico idiopático y otros trastornos de la motilidad^{109,111}.

La eNOS se expresa de manera constitutiva en los endotelios intestinales y es responsable de los bajos niveles basales de NO. Este NO regula el tono vascular y el flujo sanguíneo de la mucosa de una manera dependiente del GMPc y neuronal. También se requiere una producción constitutivamente baja de NO para el mantenimiento de los capilares¹¹² y la homeostasis¹¹³ de la mucosa. Además, el NO puede proteger del estrés oxidativo eliminando los radicales del oxígeno¹¹⁴. El NO derivado de la eNOS también promueve la adhesión de los leucocitos al endotelio, facilitando el reclutamiento de estos (quimiotaxis)¹¹⁵.

Por último, la iNOS es expresada en altas concentraciones durante la inflamación y es la responsable de los altos niveles de NO, el cual incrementa fuertemente el flujo de sangre dilatando los capilares. Una alta expresión de iNOS sostenida en el tiempo en el intestino causada por lipopolisacáridos (LPS) puede provocar un fallo en la barrera intestinal¹¹⁶. De hecho, altos niveles de NO observados durante la inflamación ejercen efectos perjudiciales sobre la barrera intestinal, que conducen a un aumento de la translocación bacteriana^{117,118}, una función mitocondrial deteriorada¹¹⁹ y una inhibición

de la migración de enterocitos al epitelio¹²⁰, así como disminución del reclutamiento de leucocitos por el endotelio^{121,122} (**figura 1.11**). Además de lo anterior, el NO reacciona fácilmente con el ion superóxido para formar peroxinitrito, una especie reactiva de oxígeno y nitrógeno que es altamente tóxica para las células epiteliales¹²³. Puede dañar el epitelio de múltiples maneras; induciendo la apoptosis e inhibiendo los procesos de restitución epitelial, incluida la proliferación y migración de enterocitos¹²⁴⁻¹²⁶.

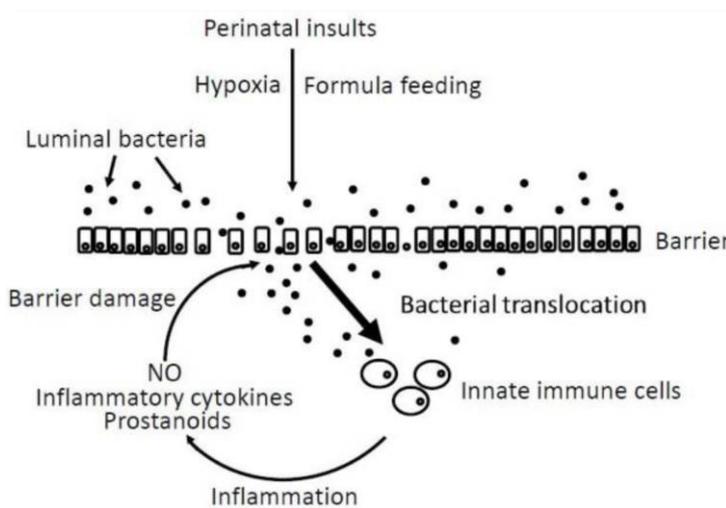


Figura 1.11: Ejemplo de daño con ruptura en la barrera intestinal. La invasión de bacterias provoca una respuesta inmune en la lámina propia que desencadena una producción de NO, citoquinas inflamatorias y prostanoides inflamatorios¹²⁷.

Ciclooxigenasas

Las enzimas ciclooxigenasas participan activamente en la fisiología y fisiopatología¹²⁸ del cuerpo humano, cumpliendo funciones en el aparato cardiovascular¹²⁹, neuronal¹³⁰, renal¹³¹, inmunitario¹³², gastrointestinal¹³³ y reproductor^{134,135}. Las isoenzimas de la COX, la COX-1 y COX-2, catalizan la formación de los prostanoides, como las prostaglandinas y tromboxanos.

Los prostanoides se producen en la mayor parte de células del cuerpo y actúan como mediadores autocrinos y paracrinos de numerosos procesos biológicos en condiciones tanto fisiológicas como patológicas¹³⁶. La COX-1 es expresada de manera constitutiva en la mayoría de las células, siendo la fuente dominante de prostanoides que realizan funciones de mantenimiento, como la citoprotección del epitelio gástrico y la homeostasis¹³⁷. La COX-2, inducida por estímulos inflamatorios, hormonas y factores de

crecimiento, genera la mayor cantidad de prostanoïdes en procesos inflamatorios o enfermedades proliferativas como el cáncer, donde está implicada en la cascada inflamatoria, la angiogénesis o la migración y proliferación celular¹³⁷.

A lo largo de la historia se han utilizado de manera empírica numerosos inhibidores de estas enzimas para el tratamiento de diversas enfermedades, como extractos de plantas con efectos antiinflamatorios o la aspirina. Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 cuando se descubrió la estructura química de los prostanoïdes^{138,139}. Desde entonces, progresivos avances en el conocimiento de su estructura, función y regulación han permitido el desarrollo de numerosos antiinflamatorios no esteroïdeos (AINE)^{140,141}. El reciente descubrimiento de antiinflamatorios muy selectivos de la COX-2, denominados "coxib", es un ejemplo del avance en esta familia de medicamentos, aumentando su eficacia y reduciendo sus efectos adversos^{142,143}. Estudios recientes han relacionado la COX-2 con cánceres digestivos, haciendo de esta enzima una diana farmacológica, aparte de antiinflamatoria, antineoplsica¹⁴⁴.

1.4. PATOLOGÍAS INTESTINALES

Hablamos de patología intestinal como cualquier disfunción del sistema gastrointestinal. Estas abarcan, entre otros, neoplasias, problemas digestivos, como intolerancias alimenticias o alteraciones del tránsito gastrointestinal, o procesos inflamatorios, incluyendo desórdenes digestivos de carácter infeccioso, el síndrome del intestino irritable (SII) o las llamadas enfermedades inflamatorias intestinales (EII): la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). En esta tesis doctoral nos centraremos en las alteraciones de la motilidad y los procesos inflamatorios del intestino, en concreto en la colitis ulcerosa.

Patologías relacionadas con el tránsito intestinal

Diarrea

La diarrea es una de las patologías más comunes diagnosticadas en atención primaria, pudiendo presentar desde sintomatología leve, a ser una de las causas de mortalidad más frecuentes, especialmente en la población pediátrica en países en vías de desarrollo¹⁴⁵. La diarrea produce una disfunción en el transporte de electrolitos y agua en el intestino, lo que se traduce en un aumento en la frecuencia, cantidad y volumen de las deposiciones, así como una disminución de su consistencia por el incremento de agua y electrolitos contenidos en ellas. Todo ello provoca un riesgo de deshidratación y trastornos del equilibrio electrolítico en el organismo¹⁴⁶.

Podemos clasificar la diarrea en función de su duración en aguda o crónica. Se denomina *diarrea aguda* cuando tiene una duración de una a cuatro semanas, siendo su etiología normalmente la ingestión de tóxicos o infecciones. Por el contrario, se considera una *diarrea crónica* cuando se extiende más de cuatro semanas. En estos casos la etiología es más heterogénea, lo que cambia la evolución de la enfermedad y el tipo de tratamiento.

Según su etiopatogenia podemos clasificar la diarrea en acuosa, inflamatoria o grasa. La *diarrea acuosa* es dividida a su vez en osmótica, secretora y funcional, en función de la etiología del aumento de líquido en el interior del lumen. Cuando hablamos de diarrea osmótica, esta es debida a la presencia de sustancias osmóticamente activas en la luz del

intestino, que provocan el paso del agua del plasma al intestino a través la pared permeable del epitelio. La diarrea secretora se caracteriza por una secreción activa de fluido isoosmolar por el epitelio intestinal en el lumen, en ocasiones con concentración electrolítica anormal. Y la diarrea funcional o motora que se diferencia de la diarrea secretora por una hipermotilidad, volúmenes más pequeños y una mejoría durante los periodos nocturnos debido al ayuno. Esta diarrea se da en pacientes con SII, el cual afecta a un 5% de la población occidental. A pesar de que los factores etiológicos de la diarrea funcional-SII son desconocidos, cada vez se reconocen más causas fisiopatológicas de la misma¹⁴⁷.

La *diarrea inflamatoria o exudativa* se produce cuando hay un daño en la mucosa intestinal (inflamación, úlceras...), lo que conlleva a un incremento en la permeabilidad intestinal y en consecuencia una pérdida pasiva de líquidos y proteínas y menor capacidad de absorción. A menudo aparece debido a enfermedades gastrointestinales como el cáncer colorrectal, los pólipos, CU, EC, celiaquía... Además, la presencia de sangre, con o sin moco, en las defecaciones es un indicativo de CU o EC¹⁴⁸.

Finalmente, la *diarrea grasa*, también denominada esteatorrea, es diagnosticada cuando la expulsión de grasa en las deposiciones supera los límites normales, siete gramos a las veinticuatro horas, los cuales corresponderían a más del nueve por ciento de las grasas ingeridas durante el día. Esta diarrea puede deberse a dos condiciones principales: una malabsorción en el intestino delgado, celiaquía o enfermedad de Wipple, o indigestiones relacionadas con una capacidad exocrina del páncreas deficiente.

Estreñimiento

El estreñimiento o constipación es la contraparte de la diarrea. Se define como una defecación insatisfactoria, caracterizada por deposiciones poco frecuentes, un paso difícil de las heces o ambas¹⁴⁹. La etiopatogenia del estreñimiento es multifactorial, lo que provoca una complicada y confusa clasificación de la enfermedad; la más común es la que divide el estreñimiento en función de causas primarias o secundarias¹⁵⁰.

El estreñimiento primario es el debido a problemas en la función del colon o en el proceso de defecación, valorado normalmente a través de la historia médica. Una vez

diagnosticado, se aplica un tratamiento empírico para tratar de remitir la patología, profundizando en su diagnóstico si no remite con este.

A su vez, dentro del estreñimiento primario podemos diferenciar 3 subtipos: estreñimiento con tránsito normal, con tránsito disminuido y el denominado trastornos en la defecación. El *estreñimiento con tránsito normal o estreñimiento funcional* cursa con una disminución en la frecuencia y un aumento de consistencia de las deposiciones, sin estar asociada a ninguna patología intestinal. Al aplicar un tratamiento empírico, incluyendo medidas higiénico-dietéticas, la patología remite con facilidad. En el *estreñimiento con tránsito disminuido* encontramos una disminución en la frecuencia de los movimientos intestinales, menos de uno a la semana, siendo más frecuente en mujeres que en hombres¹⁵¹. Se cree que es debido a una alteración neuromuscular del colon, con una reducción de las ICC¹⁵² y alteraciones en el número de neuronas del plexo mientérico que expresan la sustancia P¹⁵³, un neurotransmisor excitatorio, en la pared intestinal. Por último, los *trastornos en la defecación* están causados por un grupo de desórdenes funcionales y anatómicos del ano-recto. Clínicamente, los pacientes sufren dolorosa tensión abdominal causada por un aumento del tono muscular del suelo pélvico, teniendo graves problemas para realizar deposiciones y un aumento en la incidencia de hemorroides y fisuras anales.

El estreñimiento secundario es causado por factores externos a la propia fisiología intestinal y es clasificado habitualmente en tres subtipos: secundario a medicación, a desórdenes neurológicos y a una disfunción neurogénica intestinal. El *estreñimiento secundario a medicación* es un efecto adverso común en una gran variedad de fármacos. El seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes con estos tratamientos es la medida preventiva más eficaz para conseguir una detección precoz de este problema¹⁵⁴. El *estreñimiento secundario a desórdenes neurológicos* se debe a que determinadas patologías que involucran al sistema nervioso, como la neuropatía autonómica, diabetes mellitus y otras enfermedades endocrinas, así como casos más raros como el Mal de Chagas y la enfermedad de Hirschprung¹⁵⁰. Por último, *el estreñimiento secundario a una disfunción neurogénica intestinal* lo observamos en pacientes con lesión medular, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson. El origen de este estreñimiento es debido a disfunciones en el nervio pélvico y autonómico. Además, los medicamentos utilizados

por estos pacientes normalmente presentan el estreñimiento como efecto adverso común, incluyéndose en el grupo ya nombrado¹⁵⁰.

Enfermedades inflamatorias intestinales

El término de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se aplica a todo proceso inflamatorio crónico e idiopático del intestino. Estas patologías crónicas, entre las que encontramos la CU o la EC, alternan periodos de inactividad o quiescencia, con periodos agudos de actividad clínica denominados brotes o recidivas. Al contrario que en otros procesos inflamatorios del tracto digestivo, la EII no posee una causa específica identificable. La teoría más aceptada es que una pérdida del equilibrio inmunológico entre el propio intestino con la microbiota residente, además de otros antígenos intraluminales dependientes del entorno, que en determinados sujetos propensos genéticamente, provoca la alteración tisular que desencadena la sintomatología propia de las EII¹⁵⁵.

A pesar de ser enfermedades diferentes, los puntos comunes entre la CU y la EC en ocasiones hacen difícil el diagnóstico. Para realizarlo, es necesario la identificación de características clínicas, radiológicas, serológicas, endoscópicas, histológicas y su evolución a lo largo de la enfermedad y el tiempo. En líneas generales, la EC es una enfermedad crónica granulomatosa y transmural, pudiendo afectar a cualquier punto del aparato digestivo, aunque su presencia es más común en íleon y colon de manera discontinua. Por otro lado, la CU es también una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa del colon, aunque no granulomatosa, pudiendo afectar desde el íleon terminal hasta el ano, siendo más recurrente en la parte distal del colon. Su distribución suele ser más continua que en el caso de la EC y comúnmente se la relaciona con complicaciones como abscesos, fístulas y estenosis^{156,157}.

La sintomatología de ambas cursa con procesos de malabsorción, dolor abdominal, sangrado rectal, diarrea, fiebre y pérdida de peso¹⁵⁸. Las EII también pueden presentar síntomas extraintestinales, normalmente asociados al sistema inmune, como artritis y dolor lumbar, aftas bucales, úlceras cutáneas y alteraciones hepáticas.

Debido a estas semejanzas, en aproximadamente un 10% de los casos no es posible hacer un diagnóstico definitivo entre la EC y la CU, hablándose entonces de Colitis Indeterminada¹⁵⁹.

Una parte importante de esta tesis doctoral se realizó en un modelo murino de colitis inducido por dextrano sulfato de sodio (DSS), modelo experimental que presenta en ratones una fisiopatología muy semejante a la colitis ulcerosa humana^{160,161}. Por ello, a partir de ahora describiremos con más detalle esta patología.

Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria crónica de origen inespecífico que afecta principalmente a la mucosa del intestino grueso, de manera difusa y circunferencialmente. Habitualmente, comienza en zonas distales del recto y se va extendiendo de forma proximal, hasta terminar afectando a varias porciones del colon.

Esta patología tiene una mayor incidencia y prevalencia en los países desarrollados, observándose mayores ratios en América del Norte y Europa y más bajos en el hemisferio sur y los países orientales¹⁶². La explicación que se ha dado a este hecho es el mejor acceso a recursos sanitarios de los que disponen los países desarrollados. Diversos estudios han sugerido que la menor exposición a infecciones entéricas durante la niñez puede producir una falta de maduración del sistema inmune, lo que puede acabar desencadenando en una enfermedad inflamatoria intestinal más adelante^{163,164}.

Sin embargo, esta distribución ha ido evolucionando a lo largo de los últimos años, observándose una meseta o incluso un receso de los casos en países desarrollados, y un aumento de los casos en los países en vías de desarrollo como Latinoamérica, Asia o Europa del este^{165,166}. Esto podría deberse a que la industrialización y desarrollo de estos países va acompañada por la aparición de otros factores epidemiológicos antes inexistentes.

A pesar del gran esfuerzo humano, económico y social invertido en esclarecer la etiología de la CU y de otras EII, todavía hay muchas dudas al respecto. Los motivos que no han permitido una conclusión clara son la falta de un modelo experimental globalmente aceptado y el gran abanico de alteraciones, síntomas y factores de riesgo que se ven involucrados en el entorno de las EII, haciendo muy difícil diferenciar cuáles son esenciales y cuáles no. Pese a no haber una etiología generalizada, si encontramos un consenso en que una predisposición genética individual unida a una serie de factores internos y externos son los causantes de la aparición de estas patologías¹⁶⁷.

El historial familiar es considerado el factor independiente más importante para el desarrollo de las enfermedades inflamatorias intestinales¹⁶⁸. El mayor riesgo se ha observado cuando ambos padres han padecido una EII, donde su descendencia tiene hasta un 33% de posibilidades de heredarlas¹⁶⁹. En concreto, en la colitis ulcerosa la prevalencia en familiares de primer grado puede llegar a ser hasta 15 veces superior con respecto a los que no presentan antecedentes¹⁷⁰. Además del propio riesgo inherente a la genética, se debe tener en cuenta que el entorno familiar comparte además muchos de los factores de riesgo externos, influenciando estos también en las posibilidades de desarrollo de estas patologías.

Los últimos estudios genéticos revelan una estrecha relación entre la microbiota y la inmunidad innata, sugiriendo un cambio en la flora intestinal como factor fundamental en el desarrollo de patologías inflamatorias intestinales como la CU^{167,171-174}. A día de hoy se sabe que cambios en los hábitos alimenticios, el uso abusivo de antibióticos, el tabaco, la anticoncepción oral, o el envejecimiento son factores que producen cambios en la microbiota, provocando de manera indirecta, un incremento en la incidencia de las EII en la sociedad actual¹⁶⁶. Diversos estudios han observado que determinadas infecciones gastrointestinales agudas pueden aumentar hasta al doble la probabilidad de terminar desarrollando CU, debido supuestamente a los cambios que pueden originar en la composición de la microbiota^{175,176}.

Otros factores de riesgo con menor evidencia, o menos esclarecida, son el uso de AINE, donde se ha relacionado su mayor selectividad por la COX-2 con una menor posibilidad del desarrollo y recaída de la enfermedad^{177,178}, la apendicectomía, factor protector especialmente relevante si ha sido realizada antes de los 20 años¹⁷⁹, el estilo de vida, el estrés o la ansiedad¹⁸⁰.

En cuanto a la fisiopatología de la CU, la **figura 1.12** muestra un esquema donde se observa cómo se produce esta enfermedad, resaltando la interacción entre las alteraciones de la barrera intestinal, la microbiota colónica y la actividad inmunitaria. La barrera intestinal es la primera línea de defensa del sistema inmune intestinal, encargada de mantener una separación física entre las células inmunes y el contenido del lumen y sintetizar péptidos antimicrobianos¹⁶². En primer lugar, encontramos una capa de moco, formado por mucinas secretadas por las células caliciformes, que sirve para evitar el

contacto de sustancias exógenas con el epitelio mientras deja paso a moléculas más pequeñas. En fases activas de la CU se han encontrado defectos específicos en esta capa, caracterizados por unas células caliciformes menos numerosas y de menor espesor que, además, contienen y secretan menos cantidad de mucina-2, glicoproteína específica del intestino delgado y colon, generando una debilitación de la barrera intestinal¹⁸¹. Durante la instauración de la CU también se produce una alteración en la regulación de las proteínas de unión estrecha, que genera un daño en la estructura y función del epitelio intestinal incrementando su permeabilidad¹⁸². Esta pérdida del efecto barrera da lugar a una penetración de bacterias y antígenos luminales que desencadenan una respuesta inmunitaria. Sin embargo, no está claro si dicha disfunción precede a la CU o es resultado de una inflamación previa.

Por otro lado, además de su efecto como barrera física, el epitelio intestinal tiene una función inmune mediante la secreción de péptidos antimicrobianos, como las defensinas. Esta actividad se ha visto incrementada en el colon de pacientes con CU, aunque no está claro si es debido a la presencia de bacterias exógenas, citoquinas inflamatorias o ambas^{183,184}.

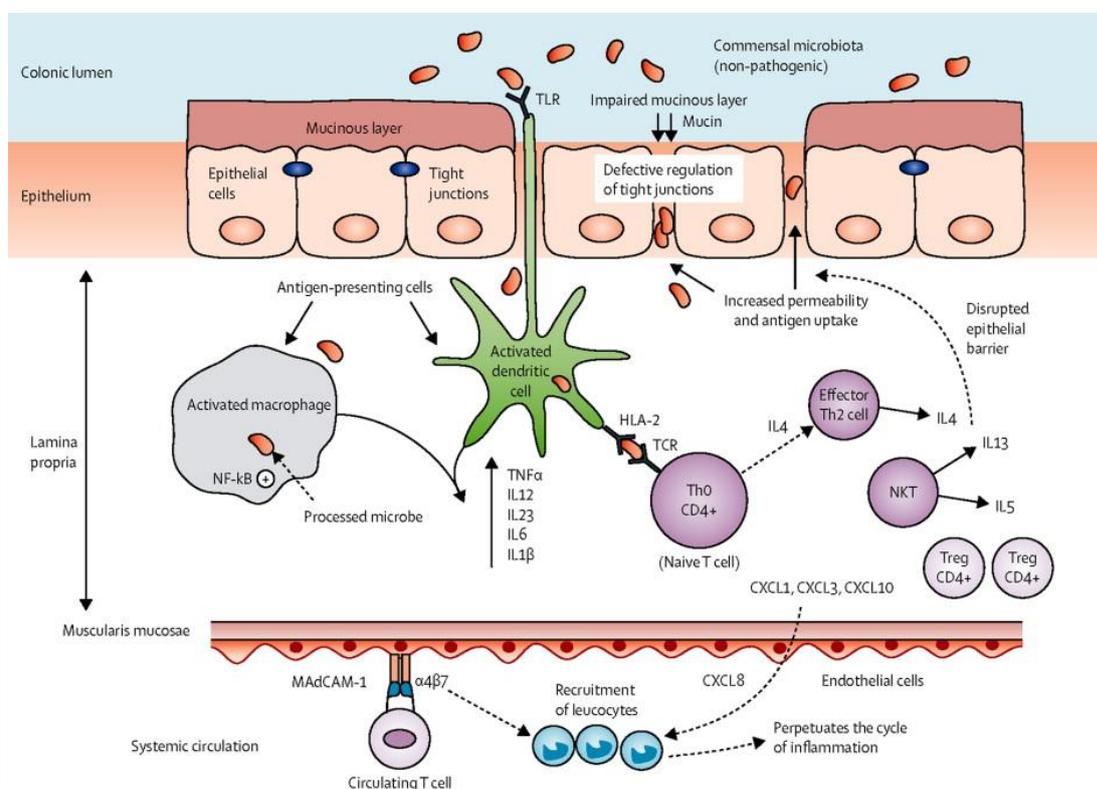


Figura 1.12. Esquema de la fisiopatología de la colitis ulcerosa¹⁶².

En situaciones fisiológicas normales, el sistema inmunitario intestinal mantiene un equilibrio entre la tolerancia frente a la microbiota comensal y los antígenos presentes en la dieta y la respuesta defensiva frente a patógenos entéricos. Sin embargo, una alteración en la composición de la microbiota del intestino puede provocar un aumento en la proporción de bacterias dañinas, lo que resulta en una respuesta inflamatoria intestinal^{185,186}. Estas bacterias liberan productos metabólicos, como las enterotoxinas, que aumentan la permeabilidad de la mucosa intestinal y reducen la eficacia del sistema inmune. Una capa mucosa comprometida permite un contacto directo con las células epiteliales intestinales, que agrava aún más el daño sobre la barrera intestinal y la traslocación de bacterias a la lámina propia. Esto genera una retroalimentación positiva que potencia la inflamación, el daño tisular y termina afectando de manera sistémica¹⁸⁷.

La actividad inmunitaria intestinal comienza con la respuesta inmune innata de captación de antígenos por parte de las células dendríticas y macrófagos, localizados en la lámina propia, y su presentación a las células B y T, lo que desencadena la respuesta inmune adaptativa. En pacientes con CU se ha observado un mayor número de células dendríticas, proporcional a la actividad de la enfermedad, sugiriendo su implicación en el comienzo y mantenimiento de la inflamación del intestino¹⁸⁸.

Estas células expresan numerosos receptores de reconocimiento de antígenos implicados en la respuesta inmune, incluyendo los de tipo Toll (TLR). Su función es proporcionar una defensa frente a patógenos externos y el daño epitelial, contribuyendo en la homeostasis intestinal y en el mantenimiento de su barrera epitelial¹⁶². Se han observado cambios en la expresión de los distintos subtipos de TLR expresados en las células epiteliales de la lámina propia de pacientes con CU activa, como un aumento de TLR4 que en condiciones normales es prácticamente inexistente^{189,190}. La activación de los TLR desencadena respuestas inmunes innatas y adaptativas que conduce a la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), claves en la activación de la cascada inflamatoria. En la inflamación crónica del intestino, el NF- κ B cumple un papel fundamental, regulando las funciones proinflamatorias y de supervivencia celular en macrófagos y células T, por lo que la alteración de su expresión se considera un factor determinante en la patogenia de la CU¹⁹¹⁻¹⁹³.

Desde un punto de vista macroscópico, podemos encontrar una apariencia del colon distinta en función del estadio o la actividad de la enfermedad (**figura 1.13**). Así, en fases activas de la enfermedad, la superficie de la luz intestinal está húmeda y con evidencias de sangre y moco. La mucosa está enrojecida, friable y granulosa, sangrando al contacto y con posibilidad de hemorragias petequiales. Este aspecto eritematoso se debe posiblemente a la combinación de la dilatación capilar, la depleción de mucina y las hemorragias intersticiales. La serosa puede aparecer congestiva, habitualmente en mayor medida que las lesiones mucosas. En los casos más leves, especialmente en pacientes de larga duración, las lesiones terminan provocando eritema, pérdida del patrón vascular y friabilidad. Tras la cicatrización de las úlceras se pueden observar nódulos rojizos sésiles sobreelevados, conocidos como pseudopólipos. En casos graves y activos, determinados segmentos o incluso todo el colon pueden llegar a dilatarse (megacolon tóxico). En estos casos la inflamación de la mucosa se puede extender hacia la submucosa, favoreciendo un adelgazamiento de la pared. Frecuentemente se puede observar peritonitis, así como exudados fibrinosos o fibrinopurulentos en la superficie peritoneal. El colon descendente y sigmoide suelen mostrar las lesiones agudas más graves¹⁹⁴.

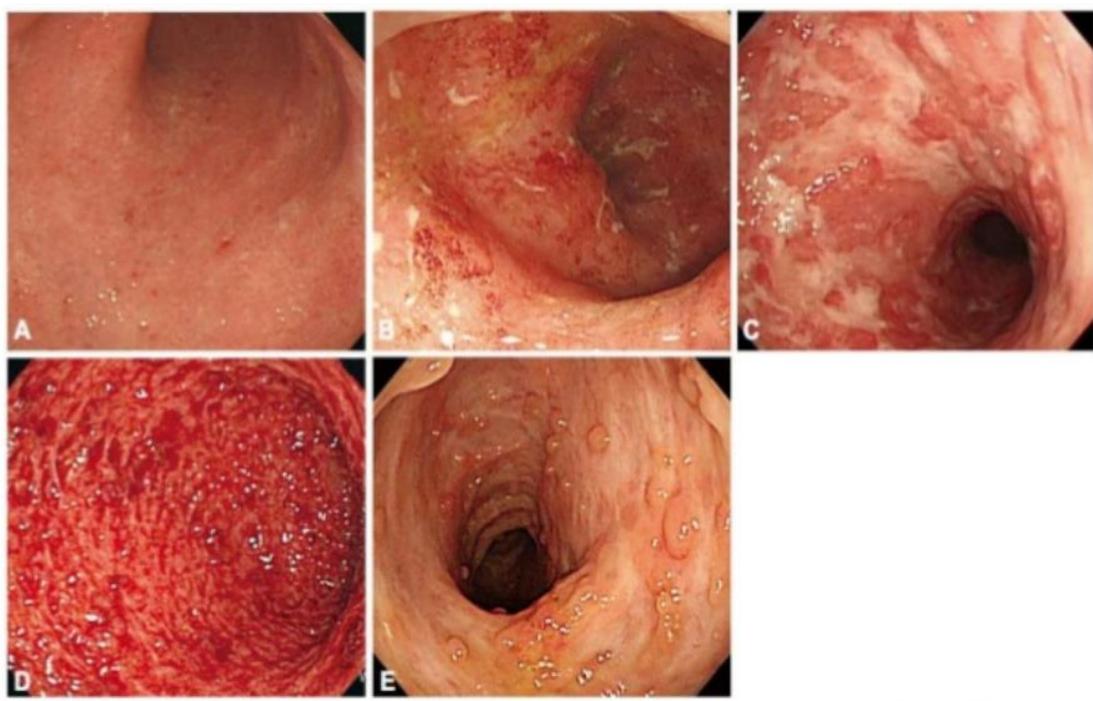


Figura 1.13. Lesiones típicas de la CU. (A) Leve: eritema de la mucosa, disminución de las marcas vasculares. (B) Moderada: eritema marcado, pérdida de las marcas vasculares, erosiones. (C) Severa: úlceras. (D) Severa: hemorragias espontáneas. (E) Severa: Estrechamiento luminal con pseudopólipos¹⁹⁵.

En cuanto a las lesiones microscópicas, estas incluyen la presencia de una superficie irregular, denominada en ocasiones vellosa o pseudovellosa, alteraciones en la arquitectura de las criptas además de una reducción grave de su densidad (atrofia), metaplasia de las células de Paneth distal al ángulo esplénico, un fuerte incremento transmucoso difuso en las células de la lámina propia (plasmocitosis basal) y una depleción grave de la mucina.

Clínicamente, las fases preliminares de la enfermedad comienzan de manera gradual, presentando los pacientes estreñimiento, seguido rápidamente de sangrados rectales, urgencias defecatorias, diarreas, molestias abdominales y síntomas sistémicos en consecuencia, como pérdida de peso o de apetito. En algunas ocasiones la enfermedad empieza súbitamente con los síntomas más graves. Estos periodos agudos suelen ir seguidos de fases de remisión, manteniendo los pacientes una alternancia entre ambos estadios, supeditada a factores desencadenantes como la dieta, el estrés o la medicación, entre otros.

El diagnóstico de la CU se basa en el patrón microscópico único, bien desarrollado, comentado anteriormente, el cual muestra una combinación de alteraciones estructurales y una reacción inflamatoria característica limitada a la mucosa. A veces, las lesiones pueden afectar también a la submucosa o la capa muscular de la pared intestinal, pero incluso en los casos más graves, las lesiones son más prominentes en la mucosa, con tendencia a disminuir hacia la submucosa, lo cual contrasta con otras EI como la EC.

1.5. TRATAMIENTOS DE PATOLOGÍAS INTESTINALES

Las patologías intestinales producen un importante gasto sanitario y ocupan una gran parte de los servicios de atención primaria de los sistemas sanitarios mundiales. Muchas de ellas son crónicas e incurables y producen un importante descenso en la calidad de vida de los pacientes. Además, la falta de efectividad de los tratamientos convencionales ha producido un incremento en el uso de las llamadas terapias complementarias y alternativas (CAM)¹⁹⁶, como la fitoterapia, a la cual dedicaremos un apartado especial dentro de este capítulo. En muchos de los casos, los pacientes refieren que recurren a este tipo de tratamientos de manera concomitante a sus tratamientos habituales buscando una mejora en su calidad de vida.

Dentro de las patologías relacionadas con la motilidad, observamos que en la *diarrea* los tratamientos más habituales son astringentes, como la loperamida, un derivado opioide sintético de la piperidina, los cuales producen una disminución de la actividad motora del músculo liso, tanto circular como longitudinal, que ralentiza la motilidad y reduce el número de deposiciones. Se trata de un tratamiento inespecífico contraindicado en diarreas infecciosas, sanguinolentas o superiores a dos días, incluyendo aquí las EII¹⁹⁷. Este mecanismo de acción limita su uso y genera numerosas contraindicaciones, lo que deja paso a una gran variedad de tratamientos alternativos que buscan reducir la sintomatología o incluso acortar su duración, como la rehidratación, los tratamientos con probióticos o algunos extractos vegetales con propiedades digestivas, entre otros. En el caso del *estreñimiento* el tratamiento de elección son los laxantes en todas sus categorías, formadores de bolo, lubricantes, suplementos de fibra, estimulantes, osmóticos y procinéticos¹⁹⁸, los cuales, a pesar de ser eficaces y seguros, acaban generando problemas debido a su tolerancia y dependencia. Esto provoca que en el caso de su uso continuado cronifiquen la patología y dificulten su tratamiento a largo plazo. Para evitarlo es común el uso de compuestos de origen vegetal con alto contenido en fibra, medidas higiénico-dietéticas, el uso de probióticos e incluso terapias alternativas menos habituales como la acupuntura, con el objetivo de volver a un tránsito gastrointestinal normal¹⁹⁹.

En las *enfermedades inflamatorias intestinales*, el uso de CAM se ha incrementado exponencialmente en los últimos años²⁰⁰. Al contrario de lo que sucede en la diarrea y el estreñimiento, en este caso no se busca la sustitución de los tratamientos convencionales, sino su complementación. La prevalencia del uso de CAM en las EII es entre un 21 y un 60%²⁰¹, siendo las más usadas la fitoterapia, los probióticos, las vitaminas y el aceite de pescado²⁰².

Fitoterapia

Una parte fundamental de las CAM la ocupa la fitoterapia, la utilización de las plantas medicinales y sus derivados con finalidad terapéutica. Históricamente, la fitoterapia ha sido la madre de la farmacología moderna, estando presente en la mayoría de las civilizaciones. La presencia de plantas con propiedades medicinales en la tumba de un neandertal en Iraq ya sugiere su utilización hace más de 60.000 años²⁰³. Los primeros documentos provienen de China, donde el emperador Shen Nung realizó el *Pen Tsao* (El Gran Herbario) alrededor del 3.000 a.C. Este libro ha tenido numerosas ediciones posteriores, albergando las descripciones y características de miles de plantas medicinales utilizadas aun a día de hoy en China²⁰⁴. Más adelante, egipcios, mesopotámicos, griegos, hindús, y otras culturas de todo el mundo han contribuido a este conocimiento con distintos tratamientos de origen vegetal que han ido utilizando.

La procedencia multicultural de la fitoterapia, así como su uso extendido en el tiempo hasta nuestros días, defienden el valor terapéutico que se le atribuye. Con el avance tecnológico en la síntesis de fármacos, la fusión de lo antiguo con lo moderno ha dado lugar a la creación de importantes principios activos de origen vegetal, como la digoxina de las dedaleras (*Digitalis lanata*), el ácido salicílico de la corteza de sauce (*Salix alba*), la quinina de la corteza de la chinchona (*Cinchona ledgeriana*), la morfina de la adormidera (*Papaver somniferum*) o el paclitaxel de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). Estas técnicas siguen siendo utilizadas en la actualidad, encontrando uno de los últimos descubrimientos más importantes en la artemisina, un antimalárico aislado a partir de *Artemisia annua*, que otorgó el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 2015 a la Doctora Tu Youyou²⁰⁵. Además, las principales compañías farmacéuticas poseen amplias

líneas de investigación que participan en programas de detección para identificar y aislar compuestos farmacológicamente activos de origen vegetal.

Hoy en día, en torno a un 50% de la población occidental y más de un 80% de los países en vías de desarrollo recurren a la fitoterapia como medicina habitual, de la que una parte significativa lo hacen para el tratamiento o prevención de los trastornos digestivos. Aunque la mayoría de las indicaciones para el uso de estos remedios proceden de su uso tradicional, cada vez hay más ensayos controlados que demuestran sus efectos beneficiosos. Así, la continua investigación científica y el desarrollo de nuevas técnicas han permitido dar evidencia científica a muchos de los extractos utilizados, demostrando propiedades antimicrobianas, antioxidantes, inmunomoduladoras, antiespasmódicas, citotóxicas, etc. Algunos ejemplos conocidos son la uña de gato (*Uncaria tomentosa*), utilizada en la medicina tradicional peruana como digestiva y antiinflamatoria, la cual ha demostrado *in vitro* la inhibición de la apoptosis inducida por oxidación en líneas celulares epiteliales y macrófagos, la expresión de iNOS inducida por LPS y la activación del NF- κ B²⁰⁶; la cúrcuma (*Curcuma longa*), utilizada también como antiinflamatoria y digestiva, cuyo activo principal ha demostrado bloquear la activación del NF- κ B mediada por citoquinas y la expresión de genes proinflamatorios²⁰⁷; o el *Ginkgo biloba*, originario de la medicina tradicional china y cada vez más usado en nuestra sociedad actual para el desarrollo cognitivo, favorecer la concentración, el tratamiento de la enfermedad vascular periférica y la insuficiencia cerebral. Su extracto ha demostrado la inhibición del factor activador de plaquetas²⁰⁸ y la eliminación de radicales superóxidos²⁰⁹ como mecanismos de acción principales.

Uno de los usos más comunes de la fitoterapia es el tratamiento de patologías gastrointestinales, ya que no suelen desarrollar una clínica especialmente grave y sus tratamientos farmacológicos suelen ser principalmente sintomáticos y presentan efectos adversos importantes. Es posible encontrar alternativas fitoterápicas con una amplia variedad de usos, como el jengibre (*Zingiber officinale*) en náuseas y vómitos, el cardo mariano (*Silybum marianum*) en patologías hepáticas, los extractos de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) o el chile (*Capsicum*) para el tratamiento de la úlcera péptica, la medicina herbal china en el síndrome del intestino irritable, derivados de opio (*Papaver somniferum*) en la

diarrea o la goma esterculia (extraída de árboles del género *Sterculia*) y la ispágula (*Plantago ovata*) en el estreñimiento, entre otros^{210,211}.

Los efectos farmacológicos producidos por los productos de origen vegetal dependen de la presencia de componentes funcionales, unas moléculas, generalmente distintas de hidratos de carbono, lípidos o proteínas, que pueden modular uno o más procesos metabólicos en el cuerpo, pudiendo ejercer un efecto beneficioso para la salud. Dentro de los componentes funcionales destacan los fitoquímicos, sustancias químicas producidas por el metabolismo de las plantas, sin capacidad nutritiva y biológicamente activas²¹².

Para comprender la obtención de estos compuestos hay que centrarse en el metabolismo de las plantas. Las plantas realizan un metabolismo primario, el cual consiste en reacciones químicas para sintetizar o degradar materia orgánica, obteniendo moléculas orgánicas esenciales para la vida del organismo, como glúcidos, lípidos o proteínas, involucradas en procesos energéticos, morfogénesis o en la reproducción; y un metabolismo secundario, en el cual las reacciones de síntesis o degradación de materia orgánica producen compuestos no esenciales para la vida de la planta, diferentes en función de los grupos taxonómicos de estas, pero que presentan una vital importancia en fitoterapia y en farmacología, ya que son los responsables de determinadas funciones biológicas como dar color, sabor, aroma, textura, defensa frente a radicales libres o infecciones bacterianas, víricas o fúngicas. Estas sustancias son los metabolitos secundarios y se clasifican en función de su estructura química en tres grupos principales: alcaloides, terpenoides y polifenoles.

Los *alcaloides* son compuestos orgánicos de origen natural sintetizados, de manera general, a partir de aminoácidos, lo que les otorga al menos un átomo de nitrógeno en su estructura. A principio del siglo XIX el concepto alcaloide fue introducido por el químico alemán W. Meissner, indicando que eran compuestos naturales que reaccionaban como bases. El primer alcaloide aislado fue la morfina, derivada del opio, marcando un precedente que vino seguido de cerca de otros como la estricnina, emetina, brucina, piperina, cafeína o la quinina²¹³. Los alcaloides son producidos de manera natural por una amplia variedad de organismos, como plantas, hongos, bacterias o algunos animales, y se han utilizado en medicina desde la antigüedad. Sus efectos son tan variados como su

origen, habiéndose identificados en ellos propiedades antipalúdicas, (quinina), antiasmáticas (efedrina), vasodilatadoras (vincamina), antihipertensivas (reserpina), antineoplásicas (vinblastina y vincristina), antiarrítmicas (quinidina) y antibacterianas (sanguinarina). También poseen actividades psicotrópicas y estimulantes (cocaína, cafeína y nicotina) y pueden ejercer un efecto analgésico y sedante, como la morfina²¹³.

Los *terpenoides*, también llamados isoprenoides, son un amplio grupo de productos naturales a base de isopreno con funciones fundamentales en el metabolismo de todos los organismos. De los más de 40.000 terpenoides existentes, la gran mayoría están presentes en el reino vegetal como metabolitos secundarios, desempeñando funciones variadas como pigmentos claves en el proceso de fotosíntesis o repeler herbívoros y atraer a sus depredadores o especies polinizadoras²¹⁴. Una parte de los terpenoides, los monoterpenos y los sesquiterpenos, forman parte fundamental de los aceites esenciales de las plantas aromáticas, confiriéndoles su característico aroma y muchas de sus funciones biológicas²¹⁵. Su amplia distribución en la naturaleza ha provocado que muchos se utilicen de manera fortuita en la medicina, presentes en remedios tradicionales, pero no hayan sido identificados hasta el desarrollo de técnicas de caracterización modernas²¹⁶. A pesar de sus beneficios, su variedad estructural hace que algunos de ellos tengan un rango terapéutico estrecho o produzcan toxicidad, lo que dificulta en algunas ocasiones su uso en fitoterapia.

En cuanto a los *polifenoles* o *compuestos fenólicos*, son el grupo más abundante en los compuestos vegetales, con una variedad de más de 8.000 compuestos identificados²¹⁷. Tienen en común la presencia de más de un grupo fenol por molécula y son considerados uno de los grupos de agentes antioxidantes más importantes de la dieta humana, ya que están presentes en la mayoría de las frutas, verduras, granos, infusiones o zumos que ingerimos. Numerosos estudios han demostrado que la ingesta de dietas con alto contenido en compuestos fenólicos reduce las posibilidades de desarrollar enfermedades metabólicas, degenerativas, cardiovasculares o incluso cáncer²¹⁸. Estas propiedades están debidas a sus funciones antioxidantes, directas captando y eliminando radicales libres o indirectas evitando su formación, antiinflamatorias, protectoras del epitelio intestinal, inmunomoduladoras, antisépticas o antiagregantes, entre otras²¹⁹⁻²²². Por otra parte, a pesar de los múltiples beneficios que han demostrado tener, existen ciertas controversias

con su uso, como un posible efecto prooxidante en dosis elevadas²²² o las limitaciones en su absorción y su alteración en los procesos de digestión^{221,223,224}. Sin embargo, este último tiene un efecto beneficioso asociado, ya que la falta de absorción de algunos polifenoles facilita su llegada al colon, donde han demostrado un efecto beneficioso sobre algunas patologías como los trastornos de la motilidad o las enfermedades inflamatorias intestinales^{221,225}.

Aunque algunos estudios se han centrado en demostrar los efectos individuales de muchos fitoquímicos, es la composición global de los extractos donde reside el verdadero potencial farmacológico. Su combinación puede producir cambios en los efectos biológicos y biodisponibilidad de cada uno de ellos generando un efecto sinérgico que potencia sus efectos, mejorando así su perfil antioxidante, antiinflamatorio, antineoplásico, etc.²²⁶. Por ejemplo, el gel de Aloe vera, mucílago de la pulpa de la hoja del *Aloe barbadensis*, contiene más de 70 compuestos biológicamente activos, incluyendo mono y polisacáridos, aminoácidos, diversas enzimas, como la ciclooxigenasa, vitaminas, minerales y ácido salicílico entre otros²²⁷. Esta composición tan diversa hace muy difícil determinar un mecanismo de acción individual que justifique su efecto terapéutico *in vivo*, siendo este el resultado de la acción de sus componentes y su posible sinergia.

La fitoterapia es tan antigua como extensa, son innumerables las formas que existen de utilizar los vegetales con fines terapéuticos, desde las más sencillas, como ingerir un fruto, a la preparación de extractos liofilizados, pasando por aceites esenciales, cataplasmas, ungüentos o pomadas, formando parte de multitud de productos cosméticos, complejos vitamínicos y un largo etcétera. Uno de los métodos más comunes son las infusiones: una bebida obtenida de la extracción de partes solubles de hojas, flores, raíces, cortezas, frutos e incluso semillas de algunos vegetales mediante su infusión en agua caliente.

De las infusiones existentes, la más conocida y utilizada en el mundo es el té, proveniente del chino *tscha* (pronunciado como "tai", "cá" o "chai"), nombre de la infusión de la planta de *Camellia sinensis*. En España, sin embargo, la palabra té es utilizada en un espectro más amplio. En el Diccionario de la Real Academia Española, además de definirla como la planta original de té y su infusión, su 5ª acepción la describe como cualquier infusión.

Popularmente, se ha utilizado de una manera un poco más específica, nombrando a la mayor parte de las infusiones digestivas presentes en la península. Alrededor de 130 especies de plantas han sido utilizadas en España con tales fines terapéuticos, de las cuales alrededor de la mitad son conocidas como té²²⁸. Una de las más comunes ha sido la infusión procedente de la planta *Jasonia glutinosa* (L.) DC. de la familia de las compuestas (*Compositae*), conocida popularmente como té de Roca, té de Aragón o té de monte, a la cual vamos a dedicar un apartado específico, debido a su relevancia en esta tesis doctoral.

1.6. *JASONIA GLUTINOSA* (L.) DC.

Jasonia glutinosa (L.) DC., conocida en España como té de roca (TR), (**figura 1.14**) es una planta medicinal endémica de la costa occidental en el mediterráneo, conocida principalmente por sus propiedades digestivas²²⁹.

En términos taxonómicos, desde 2012 el nombre aceptado es *Chiliadenus glutinosus* (L.) Fourr., aunque *Jasonia glutinosa* es considerado sinónimo y sigue siendo el nombre más utilizado^{230,231}. Este cambio está basado en ciertas diferencias morfológicas y moleculares entre los géneros *Chiliadenus* y *Jasonia*, ya recogidos en la tesis doctoral de Nicolás Sánchez en 2007²³², aunque lejos del consenso, algunos autores las consideran poco consistentes²²⁹.

Botánicamente pertenece a la familia *Compositae*. Es una planta perenne, de hasta 50 cm de altura, con raíces leñosas y tallos herbáceos, muy foliosos y pelosos, ramificados en la parte superior. Sus hojas, de color verde claro y unos 3 cm de longitud, son lanceoladas, muy glandulosas y pelosas, que producen una sustancia resinosa de olor alcanforado y sabor amargo característico. Sus flores son todas iguales, tubulosas y hermafroditas, de un color amarillo vivo²³³.

Su carácter perenne hace que mantenga sus hojas todo el año, floreciendo, en función de la climatología y la región, en los meses de julio a septiembre, momento que se aprovecha para la recolección de sus partes aéreas, utilizadas para elaborar los preparados medicinales.

Se distribuye en la región mediterránea occidental, incluyendo el este de España, norte de Marruecos, sur de Francia, Islas Baleares, Sicilia y Malta, donde crece en grietas y recovecos soleados de roca caliza entre los 250 y 1800 metros sobre el nivel del mar.

Sus nombres populares están relacionados con sus usos y distribución. Los más comunes son té de roca, té de monte, té de Aragón, té de Moncayo, té de piedra, té de sierra, harkaitzetako tea (“té de las rocas” en euskera), árnica o árnica de montaña entre otros.



Figura 1.14. *Jasonia glutinosa* silvestre en los montes de Concud, Teruel.

El uso más común del té de roca en la medicina tradicional ha sido para tratar trastornos del aparato digestivo, como indigestiones o dolores de estómago, habitualmente en forma de infusión teiforme, lo que le ha dado la categoría de “té” ya comentada²²⁸. De hecho, también se denomina en algunos lugares “manzanilla de monte”, en alusión a las propiedades semejantes de la Manzanilla (*Chamaemelum nobile*), perteneciente a la misma familia²³⁴, y al hábitat rocoso de *Jasonia glutinosa*. Además de como infusión, también se utiliza en la elaboración de licores de hierbas utilizados como digestivos.

Otras propiedades terapéuticas reflejadas en la bibliografía también han estado vinculadas a sus nombres vulgares. Un ejemplo son el número importante de nombres derivados de “árnica”, debido a su utilización a nivel tópico para el tratamiento de contusiones, dolores reumáticos y reducir los hematomas. Esta última propiedad como posible venotónico también le ha dado el nombre de “yerba de la sangre”, debido a su uso para rebajar la tensión arterial o la anemia²²⁹.

Además de estos usos principales, existen otros usos secundarios referidos en la medicina tradicional de distintos puntos geográficos, recogidos en la **tabla 1.1**^{229,231,235}.

Tabla 1.1. Usos terapéuticos de *Jasonia glutinosa* (L.) DC.

Usos terapéuticos de <i>Jasonia glutinosa</i>	Formas de administración
Sistema gastrointestinal Digestivo, antidiarreico, laxante, antiulceroso, carminativo, emético, estimulante del apetito.	Infusión
Sistema circulatorio Hipotensor, venotónico, antivaricoso.	Infusión
Sistema genito-urinario Diurético, depurativo, tratamiento de cálculos renales.	Infusión
Sistema respiratorio Antigripal, broncodilatador, tratamiento de faringitis.	Infusión / vahos
Sistema endocrino-metabólico Adelgazante, lipolítico.	Infusión
Sistema nervioso Antimigrañoso, antidepressivo, tranquilizante.	Infusión
Musculatura y esqueleto Antirreumático, antiinflamatorio, analgésico local.	Infusión vía tópica
Piel y tejido celular subcutáneo Cicatrizante, antiséptico, antiinflamatorio.	Infusión / emplasto / ungüento / pomada

Estas propiedades terapéuticas sugieren la presencia de un gran número de compuestos bioactivos en la composición de *Jasonia glutinosa*, algunos de los cuales han sido identificados en diversos estudios fitoquímicos. Valero y cols.²³³ realizaron una revisión en 2013 de los principales análisis existentes con diferentes aceites y extractos de las partes aéreas de la planta, las cuales se utilizan para elaborar sus preparados fitoterápicos.

Los trabajos que analizan su aceite esencial, como los de Guillén y cols.²³⁶ y González-Romero y cols.²³⁷, identificaron la presencia mayoritaria de terpenoides, destacando el alcanfor como su componente mayoritario (30 - 40%) seguido del borneol (15 - 20%) y en menor proporción nerolidol, β -pineno y otros compuestos de elevado peso molecular. Cabe destacar que en ambos estudios compararon esta composición con la de extractos obtenidos por otros métodos y las proporciones fueron muy similares. Además, en otros extractos se han identificado taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, glúcidos, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides, destacando los derivados de la patuletina, quercetina, y kaempferol por su conocida acción farmacológica^{231,238,239}.

Estudios farmacológicos previos a esta tesis doctoral han investigado algunos de los mecanismos de acción de *Jasonia glutinosa*, centrándose en su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antiprotozoaria. Así, Bermejo y cols.²⁴⁰ realizaron un estudio *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratón con los sesquiterpenos contenidos en el TR, donde tanto la lucinona, la glutinona, el epi-kutdtriol y el kutdtriol mostraron una acción antiinflamatoria. Estos compuestos inhibieron la COX-1, disminuyendo la producción de la prostaglandina E2 (PGE2), conocido marcador proinflamatorio²⁴¹.

El efecto antioxidante del TR fue estudiado por López y cols.²⁴² en un trabajo sobre plantas de la medicina tradicional española. En sus experimentos, distintos extractos de *Jasonia glutinosa* demostraron su capacidad para la captación de radicales libres mediante la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, más conocido como DPPH. Este efecto estaría relacionado con algunos de sus componentes que han demostrado propiedades antioxidantes en otros estudios, como los terpenoides²¹⁶ o los flavonoides²⁴³.

Algunas plantas muestran capacidad antimicrobiana como mecanismo de defensa frente a parásitos o depredadores. En el caso del TR, Villaescusa y cols.^{244,245} realizaron dos estudios de su efecto frente a protozoos, descubriendo su capacidad leishmanicida frente a *Leishmania donovani*, *Trichomonas vaginalis* y *Plasmodium falciparum*; mientras que López y cols.²⁴² confirmaron su capacidad antifúngica frente a *Rhizopus stolonifer*, hongo utilizado como modelo al estudiar actividades contra hongos filamentosos.

En cuanto a su acción hipotensora o venotónica, Valero y cols.²⁴⁶ estudiaron el efecto del TR en aorta de rata, demostrando un efecto relajante a nivel de la musculatura lisa vascular a través del bloqueo de los canales de calcio tipo L.

En definitiva, aunque algunos autores han estudiado las acciones individuales de compuestos aislados de *Jasonia glutinosa* o el efecto global de un extracto de TR, la mayoría de ellos han sido estudios *in vitro* y hasta el momento no hay ninguno que se haya centrado en estudiar su papel a nivel del sistema gastrointestinal, así como en su mecanismo de acción. Esta tesis doctoral presenta los resultados obtenidos sobre el efecto terapéutico del TR, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* en el aparato digestivo y sus mecanismos de acción, evidenciando de este modo su uso tradicional en el tratamiento de patologías gastrointestinales.

1.7. REFERENCIAS

1. Cascales Angosto M, Doadrio Villarejo A. *Monografía: FISIOLÓGÍA DEL APARATO DIGESTIVO*. Madrid; 2014. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1492/1555>. Accessed September 25, 2018.
2. Megías M, Molist P, Pombal MÁ. *Atlas de Histología Vegetal y Animal: Intestino Delgado*. Vigo; 2017. <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-grueso.php>. Accessed September 19, 2018.
3. Juan C F, Luis T, Gladis A. Histología normal del intestino delgado. *Rev Med Hered*. 1996;7(1):46-57. doi:<https://doi.org/10.20453/rmh.v7i1.507>
4. El aparato digestivo y su funcionamiento. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-digestivas/aparato-digestivo-funcionamiento>. Published 2008.
5. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003;36(3):147-156. doi:10.1007/s00795-003-0219-y
6. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int*. 2013;63(1):1-12. doi:10.1111/pin.12021
7. Keshav S. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukoc Biol*. 2006;80(3):500-508. doi:10.1189/jlb.1005556
8. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*. 2007;19(2):70-83. doi:10.1016/J.SMIM.2007.04.002
9. Miller DL. Rat small intestine: Development, composition and effects of perfusion. *Am J Dig Dis*. 1971;16(3):247-254. doi:10.1007/BF02235247
10. Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*. 1987;22(2):737-752. doi:[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90369-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90369-1)
11. Snipes RL. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1981;162(4):455-474. doi:10.1007/BF00301871
12. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *DMM Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16. doi:10.1242/dmm.017400
13. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010;90(3):859-904. doi:10.1152/physrev.00045.2009
14. Kåhrström CT, Pariente N, Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. *Nature*. 2016;535(7610):47-47. doi:10.1038/535047a

15. Oswaldo Romero-Trujillo J, Nadine Frank-Márquez D, Cervantes-Bustamante R, et al. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. *Acta Pediatr Mex.* 2012;33(4):207-214.
16. J. Gordon Betts, Desaix P, Johnson E, et al. *Anatomy and Physiology*. Houston: OpenStax; 2013. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/23-5-the-small-and-large-intestines/>. Accessed September 19, 2018.
17. Associate Degree Nursing. *Gastrointestinal (GI) Motility*. Austin; 2008. <http://www.austincc.edu/apreview/EmphasisItems/GImotility.html>. Accessed September 25, 2018.
18. Christensen J. Motility of the Colon. *Physiol Gastrointest Tract.* 2014;(January 1994):991-1024.
19. Hall JE, Guyton AC. *Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 13th ed. (Casanova DXG, ed.). Barcelona: Elsevier; 2016. www.meddics.com. Accessed November 7, 2019.
20. Ohama T, Hori M, Ozaki H. Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced? *J Smooth Muscle Res.* 2007;43(2):43-54. doi:10.1540/jsmr.43.43
21. Megías M, Molist P, Pombal MA. *Atlas de Histología Animal y Vegetal. Tejidos Animales*. Vigo; 2017. <http://www.scribus.net/>. Accessed September 26, 2018.
22. Bozler E. Conduction, automaticity, and tonus of visceral muscles. *Experientia.* 1948;4(6):213-218. doi:10.1007/BF02155366
23. Sanders KM. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20:39-53. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x
24. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68(1):307-343. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094718
25. Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20:54-63. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01109.x
26. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 1996;76(4):967-1003. doi:10.1152/physrev.1996.76.4.967
27. Webb RC. SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. *Adv Physiol Educ.* 2003;27(4):201-206. doi:10.1152/advan.00025.2003
28. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(11):633-645. doi:10.1038/nrgastro.2012.168
29. Murthy KS. SIGNALING FOR CONTRACTION AND RELAXATION IN SMOOTH MUSCLE OF THE GUT. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:345-374. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707

30. Sanders KM. Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol*. 2001;91(3):1438-1449. doi:10.1152/jappl.2001.91.3.1438
31. Chu J, Miller CT, Kislitsyna K, et al. Decreased myosin phosphatase target subunit 1(MYPT1) phosphorylation via attenuated rho kinase and zipper-interacting kinase activities in edematous intestinal smooth muscle. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24(3):257-e109. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01855.x
32. Wagner E, Glotzer M. Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *J Cell Biol*. 2016;213(6):641-649. doi:10.1083/jcb.201603025
33. Chitale K, Weber D, Webb RC. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2001;3(2):139-144. doi:10.1007/s11906-001-0028-4
34. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2016;118(2):352-366. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306532
35. Klein S, Van Beuge MM, Granzow M, et al. HSC-specific inhibition of Rho-kinase reduces portal pressure in cirrhotic rats without major systemic effects. *J Hepatol*. 2012;57(6):1220-1227. doi:10.1016/j.jhep.2012.07.033
36. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
37. Takeuchi T, Niioka S, Kishi M, et al. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation mediated by nitric oxide with concomitant change in Ca²⁺ level in rectal circular muscle of rats. *Eur J Pharmacol*. 1998;353(1):67-74. doi:10.1016/s0014-2999(98)00351-3
38. Serio R, Grazia Zizzo M, Mulè F. Nitric oxide induces muscular relaxation via cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms in the longitudinal muscle of the mouse duodenum. *Nitric Oxide*. 2003;8(1):48-52. doi:10.1016/S1089-8603(02)00144-1
39. Cohen RA, Adachi T. Nitric-Oxide-Induced Vasodilatation: Regulation by Physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16(4):109-114. doi:10.1016/j.tcm.2006.02.001
40. Moustafa A, Sakamoto KQ, Habara Y. Nitric oxide stimulates IP₃ production via a cGMP/PkG-dependent pathway in rat pancreatic acinar cells. *Jpn J Vet Res*. 2011;59(1):5-14. doi:10.14943/jjvr.59.1.5
41. Toda N, Herman AG. Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves. *Pharmacol Rev*. 2005;57(3):315-338. doi:10.1124/pr.57.3.4
42. Kenakin TP. *Pharmacology in Drug Discovery: Understanding Drug Response*. Academic Press; 2012.
43. Fernández-Ballester G, Fernández-Carvajal A, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A. Ionic channels as targets for drug design: a review on computational methods.

- Pharmaceutics*. 2011;3(4):932-953. doi:10.3390/pharmaceutics3040932
44. Terlau H, Stühmer W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften*. 1998;85(9):437-444. doi:10.1007/s001140050527
 45. Chang C, Ray A, Swaan P. In silico strategies for modeling membrane transporter function. *Drug Discov Today*. 2005;10(9):663-671. doi:10.1016/S1359-6446(05)03429-X
 46. Hughes AD. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*. 1995;32(6):353-370. doi:10.1159/000159111
 47. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Physiol*. 1995;268(4):C799-C822. doi:10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799
 48. Jackson WF. Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation*. 1998;5(2-3):85-90. doi:10.1111/j.1549-8719.1998.tb00057.x
 49. Kitamura K, Yamazaki J. Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature. *Jpn J Pharmacol*. 2001;85(4):351-357. doi:10.1254/jjp.85.351
 50. Nishida M, Hara Y, Inoue R, Mori Y. TRP channels: formation of signal complex and regulation of cellular functions. *Folia Pharmacol Jpn*. 2003;121(4):223-232. doi:10.1254/fpj.121.223
 51. Albert AP, Large WA. Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 2003;33(5-6):345-356. doi:10.1016/s0143-4160(03)00048-4
 52. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*. 2005;12(1):113-127. doi:10.1080/10739680590896072
 53. Devine CE, Somlyo A V, Somlyo AP. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J Cell Biol*. 1972;52(3):690-718. doi:10.1083/jcb.52.3.690
 54. Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. In: *Metal Ions in Life Sciences*. Vol 12. ; 2013:119-168. doi:10.1007/978-94-007-5561-1_5
 55. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular Basis for CA²⁺ Channel Diversity. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17(1):399-418. doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.002151
 56. Catterall WA, Swanson TM. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol*. 2015;88(1):141-150. doi:10.1124/mol.114.097659
 57. Lyford GL, Farrugia G. Ion channels in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(6):583-587. doi:10.1016/J.COPH.2003.06.010
 58. Farrugia G, Rich A, Rae JL, Sarr MG, Szurszewski JH. Calcium currents in human and

- canine jejunal circular smooth muscle cells. *Gastroenterology*. 1995;109(3):707-717. doi:10.1016/0016-5085(95)90377-1
59. Imredy JP, Yue DT. Mechanism of Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Neuron*. 1994;12(6):1301-1318. doi:10.1016/0896-6273(94)90446-4
 60. Farrugia G, Holm AN, Rich A, Sarr MG, Szurszewski JH, Rae JL. A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*. 1999;117(4):900-905. doi:10.1016/s0016-5085(99)70349-5
 61. Farrugia G. IONIC CONDUCTANCES IN GASTROINTESTINAL SMOOTH MUSCLES AND INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL. *Annu Rev Physiol*. 1999;61(1):45-84. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.45
 62. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 1988;395(1):233-253. doi:10.1113/jphysiol.1988.sp016916
 63. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The trp ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(6):387-396. doi:10.1038/35077544
 64. Thorneloe KS, Nelson MT. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83(3):215-242. doi:10.1139/y05-016
 65. Walker RL, Koh SD, Sergeant GP, Sanders KM, Horowitz B. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Physiol*. 2002;283(6):C1637-C1645. doi:10.1152/ajpcell.00266.2002
 66. Kim BJ, Lim H, Yang DK, et al. Melastatin-Type Transient Receptor Potential Channel 7 Is Required for Intestinal Pacemaking Activity. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1504-1517. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.016
 67. Kraichely r. e., Farrugia G. Mechanosensitive ion channels in interstitial cells of Cajal and smooth muscle of the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19(4):245-252. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00880.x
 68. Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev*. 1992;72(suppl_4):S69-S88. doi:10.1152/physrev.1992.72.suppl_4.S69
 69. Vogalis F, Lang RJ, Bywater RA, Taylor GS. Voltage-gated ionic currents in smooth muscle cells of guinea pig proximal colon. *Am J Physiol Physiol*. 1993;264(3):C527-C536. doi:10.1152/ajpcell.1993.264.3.C527
 70. Carl A. Multiple components of delayed rectifier K⁺ current in canine colonic smooth muscle. *J Physiol*. 1995;484(2):339-353. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020669
 71. Koh SD, Sanders KM, Carl A. Regulation of smooth muscle delayed rectifier K⁺ channels by protein kinase A. *Pflugers Arch*. 1996;432(3):401-412. doi:10.1007/s004240050151
 72. Du C, Carl A, Smith TK, Sanders KM, Keef KD. Mechanism of cyclic AMP-induced

- hyperpolarization in canine colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268(1):208-215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8301560>. Accessed May 16, 2019.
73. Vogalis F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J Auton Pharmacol.* 2000;20(4):207-219. doi:10.1046/j.1365-2680.2000.00183.x
 74. Mitra R, Morad M. Ca²⁺ and Ca²⁺-activated K⁺ currents in mammalian gastric smooth muscle cells. *Science.* 1985;229(4710):269-272. doi:10.1126/science.2409600
 75. Benham CD, Bolton TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol.* 1986;381(1):385-406. doi:10.1113/jphysiol.1986.sp016333
 76. Singer JJ, Walsh JVJ. Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch-clamp technique. *Pflugers Arch.* 1987;408(2):98-111. doi:10.1007/BF00581337
 77. Carl A, Lee HK, Sanders KM. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am J Physiol Physiol.* 1996;271(1):C9-C34. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.1.C9
 78. Schreiber M, Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J.* 1997;73(3):1355-1363. doi:10.1016/S0006-3495(97)78168-2
 79. Bolton TB, Imaizumi Y. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell Calcium.* 1996;20(2):141-152. doi:10.1016/S0143-4160(96)90103-7
 80. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368(6474):850-853. doi:10.1038/368850a0
 81. Lu G, Mazet B, Sun C, et al. Inflammatory modulation of calcium-activated potassium channels in canine colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterology.* 1999;116(4):884-892. doi:10.1016/s0016-5085(99)70071-5
 82. Gribkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI. The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels. *Adv Pharmacol.* 1997;37:319-348. doi:10.1016/s1054-3589(08)60954-0
 83. Bhattacharjee A, Kaczmarek L. For K channels, Na is the new Ca. *Trends Neurosci.* 2005;28(8):422-428. doi:10.1016/j.tins.2005.06.003
 84. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(21):11651-11656. doi:10.1073/pnas.94.21.11651
 85. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1958;30(3):653-654. doi:10.1016/0006-3002(58)90124-0
 86. Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier J-M, Shakkottai V. Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium

- channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem*. 2007;14(13):1437-1457. doi:10.2174/092986707780831186
87. Xia X-M, Fakler B, Rivard A, et al. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. 1998;395(6701):503-507. doi:10.1038/26758
 88. Chen MX, Gorman SA, Benson B, et al. Small and intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(6):602-615. doi:10.1007/s00210-004-0934-5
 89. George Chandy K, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(5):280-289. doi:10.1016/j.tips.2004.03.010
 90. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006;441(7090):179-185. doi:10.1038/nature04702
 91. Kumar B, Dreja K, Shah SS, et al. Upregulated TRPC1 Channel in Vascular Injury In Vivo and Its Role in Human Neointimal Hyperplasia. *Circ Res*. 2006;98(4):557-563. doi:10.1161/01.RES.0000204724.29685.db
 92. Matos JE, Sausbier M, Beranek G, Sausbier U, Ruth P, Leipziger J. Role of cholinergic-activated K_{Ca} 1.1 (BK), K_{Ca} 3.1 (SK4) and K_v 7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl⁻ secretion. *Acta Physiol*. 2007;189(3):251-258. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01646.x
 93. Rauer H, Pennington M, Cahalan M, Chandy KG. Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21885-21892. doi:10.1074/jbc.274.31.21885
 94. Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and Chloride Secretion in Calu-3 Human Airway Epithelial Cells. *J Gen Physiol*. 1999;113(5):743-760. doi:10.1085/jgp.113.5.743
 95. Warth R, Hamm K, Bleich M, et al. Molecular and functional characterization of the small Ca²⁺-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. 1999;438(4). doi:10.1007/s004249900059
 96. Al-Hazza A, Linley JE, Aziz Q, MacLennan KA, Hunter M, Sandle GI. Potential role of reduced basolateral potassium (IKCa3.1) channel expression in the pathogenesis of diarrhoea in ulcerative colitis. *J Pathol*. 2012;226(3):463-470. doi:10.1002/path.2994
 97. Rufo PA, Jiang L, Moe SJ, Brugnara C, Alper SL, Lencer WI. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits Cl⁻ secretion by polarized monolayers of human colonic epithelial cells. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2066-2075. doi:10.1172/JCI119012
 98. Hugues M, Schmid H, Romey G, Duval D, Frelin C, Lazdunski M. The Ca²⁺-

- dependent slow K⁺ conductance in cultured rat muscle cells: characterization with apamin. *EMBO J.* 1982;1(9):1039-1042. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6329722>. Accessed May 16, 2019.
99. Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, et al. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*. 1996;273(5282):1709-1714. doi:10.1126/science.273.5282.1709
100. Pedarzani P, Stocker M. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(20):3196-3217. doi:10.1007/s00018-008-8216-x
101. Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2011;62(1):65-73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21451211/>. Accessed September 1, 2020.
102. Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1992;262(3 25-3). doi:10.1152/ajpgi.1992.262.3.g379
103. Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Maercke YMV, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990;345(6273):346-347. doi:10.1038/345346a0
104. Shah S, Hobbs A, Singh R, Cuevas J, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Gastrointestinal motility during pregnancy: Role of nitrenergic component of NANC nerves. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(4 48-4). doi:10.1152/ajpregu.2000.279.4.r1478
105. Lefebvre RA, Smits GJ, Timmermans J. Study of NO and VIP as non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitters in the pig gastric fundus. *Br J Pharmacol*. 1995;116(3):2017-2026. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb16406.x
106. Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Bredt DS, Snyder SH, Sanders KM. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1992;263(2 26-2). doi:10.1152/ajpgi.1992.263.2.g277
107. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*. 1993;75(7):1273-1286. doi:10.1016/0092-8674(93)90615-W
108. Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, et al. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci*. 2007;27(13):3445-3455. doi:10.1523/JNEUROSCI.4799-06.2007
109. Guerra DD, Bok R, Vyas V, Orlicky DJ, Lorca RA, Hurt KJ. Akt phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase regulates gastrointestinal motility in mouse ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(35):17541-17546. doi:10.1073/pnas.1905902116
110. Dickson EJ, Heredia DJ, McCann CJ, Hennig GW, Smith TK. The mechanisms

- underlying the generation of the colonic migrating motor complex in both wild-type and nNOS knockout mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(2). doi:10.1152/ajpgi.00399.2009
111. Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lise M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci.* 1995;40(11):2450-2455. doi:10.1007/BF02063253
 112. Kolb E. Current knowledge on the formation of nitric oxide in endothelial cells of blood vessels, in nerve cells and macrophages as well as its significance in vascular dilatation, information transmission and damage of tumor cells. *Z Gesamte Inn Med.* 1991;46(12):431-436. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1719706>. Accessed May 22, 2019.
 113. Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, et al. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2004;287(4):G865-G874. doi:10.1152/ajpgi.00187.2004
 114. Krauss H, Sosnowski P, Biczysko M, et al. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle, small and large intestines. *Chin J Physiol.* 2011;54(1):7-18. doi:10.4077/cjp.2011.amk011
 115. Hierholzer C, Kalff JC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ, Harbrecht BG. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2004;286(2):G225-G233. doi:10.1152/ajpgi.00447.2002
 116. Sorrells DL, Friend C, Koltuksuz U, et al. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg.* 1996;131(11):1155-1163. doi:10.1001/archsurg.1996.01430230037007
 117. Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CEI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function. *J Hepatol.* 2013;58(6):1125-1132. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.038
 118. Hackam DJ. Danger at the doorstep: Regulation of bacterial translocation across the intestinal barrier by nitric oxide. *Crit Care Med.* 2011;39(9):2189-2190. doi:10.1097/CCM.0b013e31822661ad
 119. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric Oxide and Mitochondrial Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2524-2531. doi:10.1161/ATVBAHA.107.151167
 120. Cetin S, Leaphart CL, Li J, et al. Nitric oxide inhibits enterocyte migration through activation of RhoA-GTPase in a SHP-2-dependent manner. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2007;292(5):G1347-G1358. doi:10.1152/ajpgi.00375.2006
 121. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70(7):3602-3610. doi:10.1128/iai.70.7.3602-3610.2002
 122. Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS, et al. Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte

- adhesion. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(9):881-888. doi:10.1016/s0891-5849(00)00391-9
123. Ford HR. Mechanism of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure: insight into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2006;41(2):294-299. doi:10.1016/j.jpedsurg.2005.11.003
124. Guner YS, Ochoa CJ, Wang J, et al. Peroxynitrite-induced p38 MAPK pro-apoptotic signaling in enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(2):221-225. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.091
125. Potoka DA, Upperman JS, Zhang X-R, et al. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2003;285(5):G861-G869. doi:10.1152/ajpgi.00412.2002
126. Wendel M, Heller AR. Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2010;160(5-6):118-123. doi:10.1007/s10354-010-0766-5
127. Grishin A, Bowling J, Bell B, Wang J, Ford HR. Roles of nitric oxide and intestinal microbiota in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):13-17. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.006
128. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7908-7916. doi:10.1038/sj.onc.1203286
129. Lettino M, Cantú F, Mariani M. Cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 and cardiovascular vascular system. *Dig Liver Dis*. 2001;33:S12-S20. doi:10.1016/S1590-8658(01)80154-7
130. Graham SH, Hickey RW. Cyclooxygenases in Central Nervous System Diseases. *Arch Neurol*. 2003;60(4):628. doi:10.1001/archneur.60.4.628
131. FitzGerald GA. The choreography of cyclooxygenases in the kidney. *J Clin Invest*. 2002;110(1):33-34. doi:10.1172/JCI16044
132. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001;108(1):15-23. doi:10.1172/JCI13416
133. Peura DA. Gastrointestinal safety and tolerability of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory agents and cyclooxygenase-2-selective inhibitors. *Cleve Clin J Med*. 2002;69 Suppl 1:S131-9. doi:10.3949/ccjm.69.suppl_1.s131
134. Kniss DA. Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J Soc Gynecol Investig*. 1999;6(6):285-292. doi:10.1016/s1071-5576(99)00034-9
135. Lim H, Paria BC, Das SK, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997;91(2):197-208. doi:10.1016/s0092-8674(00)80402-x
136. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol.* 2011;31(5):986-1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
137. DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12(12):1063-1073. doi:10.1096/fasebj.12.12.1063
 138. Domínguez Z. Los prostanoides, una revolución autacoide. *An Venez Nutr.* 2006;19(2):74-82. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522006000200004. Accessed September 12, 2020.
 139. Lee HJ, Cantú SM, Peredo HA, Puyó AM, Donoso A. Prostanoides: un viaje a lo largo de su evolución histórica y aplicaciones clínicas. *Cienc Invest.* 2017;67(4):13-20. <http://aargentnapiencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCel/tomo67-4/2-cei67-4-3.pdf>. Accessed September 12, 2020.
 140. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69(1):145-182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145
 141. Kurumbail RG, Kiefer JR, Marnett LJ. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(6):752-760. doi:10.1016/s0959-440x(01)00277-9
 142. Isakson P, Seibert K, Masferrer J, Salvemini D, Lee L, Needleman P. Discovery of a better aspirin. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995;23:49-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732896>. Accessed May 27, 2019.
 143. Prasit P, Wang Z, Brideau C, et al. The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2-inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(13):1773-1778. doi:10.1016/s0960-894x(99)00288-7
 144. Nagaraju GP, El-Rayes BF. Cyclooxygenase-2 in gastrointestinal malignancies. *Cancer.* 2019;125(8):1221-1227. doi:10.1002/cncr.32010
 145. Corinaldesi R, Stanghellini V, Barbara G, Tomassetti P, De Giorgio R. Clinical approach to diarrhea. *Intern Emerg Med.* 2012;7(S3):255-262. doi:10.1007/s11739-012-0827-4
 146. Riverón Corteguera RL. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cubana Pediatr.* 1999;71(2):86-115. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311999000200005. Accessed March 27, 2019.
 147. Quigley EMM, Abdel-Hamid H, Barbara G, et al. A Global Perspective on Irritable Bowel Syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46(5):356-366. doi:10.1097/MCG.0b013e318247157c
 148. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. Recent advances in understanding ulcerative colitis. *Intern Emerg Med.* 2012;7(2):103-111. doi:10.1007/s11739-011-0719-z
 149. Brandt LJ, Prather CM, Quigley EMM, Schiller LR, Schoenfeld P, Talley NJ. Systematic Review on the Management of Chronic Constipation in North America. *Am J*

- Gastroenterol.* 2005;100(s1):S5-S21. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.50613_2.x
150. Andrews CN, Storr M. The pathophysiology of chronic constipation. *Can J Gastroenterol.* 2011;25(Suppl B):16B-21B. doi:10.1155/2011/169319
151. Preston DM, Lennard-Jones JE. Severe chronic constipation of young women: "idiopathic slow transit constipation". *Gut.* 1986;27(1):41-48. doi:10.1136/gut.27.1.41
152. He CL, Burgart L, Wang L, et al. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology.* 2000;118(1):14-21. doi:10.1016/s0016-5085(00)70409-4
153. Tzavella K, Riepl RL, Klauser AG, Voderholzer WA, Schindlbeck NE, Müller-Lissner SA. Decreased substance P levels in rectal biopsies from patients with slow transit constipation. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996;8(12):1207-1211. doi:10.1097/00042737-199612000-00014
154. Fosnes GS, Lydersen S, Farup PG. Constipation and diarrhoea - common adverse drug reactions? A cross sectional study in the general population. *BMC Clin Pharmacol.* 2011;11(1):2. doi:10.1186/1472-6904-11-2
155. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006;12(30):4807-4812. doi:10.3748/wjg.v12.i30.4807
156. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):91-99. doi:10.3748/wjg.v20.i1.91
157. Lichtenstein GR. Inflammatory Bowel Disease. *Goldman's Cecil Med.* January 2012:913-921. doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00143-3
158. Laroux FS, Grisham MB. Immunological basis of inflammatory bowel disease: role of the microcirculation. *Microcirculation.* 2001;8(5):283-301. doi:10.1038/sj/mn/7800095
159. Meucci G, Bortoli A, Riccioli FA, et al. Frequency and clinical evolution of indeterminate colitis: a retrospective multi-centre study in northern Italy. GSMII (Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali). *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11(8):909-913. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514127>. Accessed December 13, 2018.
160. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014;(SUPPL.104). doi:10.1002/0471142735.im1525s104
161. Whittem CG, Williams AD, Williams CS. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp.* 2010;(35):e1652. doi:10.3791/1652
162. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. In: *The Lancet.* Vol 380. Elsevier; 2012:1606-1619. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
163. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda

- De Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: A Spanish casecontrol study. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(12):1464-1471. doi:10.3109/00365521.2010.510575
164. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(5):993-1002. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00381.x
 165. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6102-6108. doi:10.3748/wjg.v12.i38.6102
 166. Bernstein CN. Review article: changes in the epidemiology of inflammatory bowel disease-clues for aetiology. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(10):911-919. doi:10.1111/apt.14338
 167. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(4):205-217. doi:10.1038/nrgastro.2015.34
 168. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI a., Binder V. Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med.* 1991;324(2):84-88. doi:10.1056/NEJM199101103240203
 169. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3668-3672. doi:10.3748/wjg.v12.i23.3668
 170. Monsén U, Broström O, Nordenvall B, Sörstad J, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1987;22(2):214-218. doi:10.3109/00365528708991882
 171. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1489-1499. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009
 172. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The Treatment-Naive Microbiome in New-Onset Crohn's Disease. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):382-392. doi:10.1016/j.chom.2014.02.005
 173. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity.* 2017;46(4):562-576. doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008
 174. Alarcón P, González M, Castro É. Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev Med Chil.* 2016;144(7):910-916. doi:10.4067/S0034-98872016000700013
 175. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious Gastroenteritis and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2008;135(3):781-786. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.081
 176. Rodríguez LAG, Ruigómez A, Panés J. Acute Gastroenteritis Is Followed by an Increased Risk of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.*

- 2006;130(6):1588-1594. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.004
177. Singh S, Graff LA, Bernstein CN. Do NSAIDs, Antibiotics, Infections, or Stress Trigger Flares in IBD? *Am J Gastroenterol.* 2009;104(5):1298-1313. doi:10.1038/ajg.2009.15
 178. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, et al. Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use, and Risk for Crohn Disease and Ulcerative Colitis. *Ann Intern Med.* 2012;156(5):350. doi:10.7326/0003-4819-156-5-201203060-00007
 179. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.* 2001;344(11):808-814. doi:10.1056/NEJM200103153441104
 180. Choi K, Chun J, Han K, et al. Risk of Anxiety and Depression in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Nationwide, Population-Based Study. *J Clin Med.* 2019;8(5):654. doi:10.3390/jcm8050654
 181. Van Klinken BJW, Van Der Wal JWG, Einerhand A, Büller HA, Dekker J. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut.* 1999;44(3):387-393. doi:10.1136/gut.44.3.387
 182. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology.* 2005;129(2):550-564. doi:10.1053/j.gastro.2005.05.002
 183. Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, et al. β -defensin production by human colonic plasma cells: A new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(7):847-855. doi:10.1002/ibd.20141
 184. Rahman A, Fahlgren A, Sundstedt C, Hammarström S, Danielsson Å, Hammarström ML. Chronic colitis induces expression of β -defensins in murine intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;163(1):123-130. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04282.x
 185. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122(1):44-54. doi:10.1053/gast.2002.30294
 186. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):179-184. doi:10.1002/ibd.21339
 187. Shen ZH, Zhu CX, Quan YS, et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol.* 2018;24(1):5-14. doi:10.3748/wjg.v24.i1.5
 188. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005;129(1):50-65. doi:10.1053/j.gastro.2005.05.013
 189. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression

- of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68(12):7010-7017. doi:10.1128/IAI.68.12.7010-7017.2000
190. Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET, Thomas LS, Hsu D, Abreu MT. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: A comprehensive analysis. *Innate Immun*. 2010;16(2):93-103. doi:10.1177/1753425909339231
 191. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA, et al. Opposing functions of IKK β during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):15058-15063. doi:10.1073/pnas.0808216105
 192. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(2):92-99. doi:10.1097/MOG.0b013e328324f857
 193. Rogler G, Brand K, Vogl D, et al. Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998;115(2):357-369. doi:10.1016/S0016-5085(98)70202-1
 194. Gassull M., Gomollon F, Hinojosa J, Obrador A. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. III Edició. ARAN; 2007.
 195. Srivastava A. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE ULCERATIVE COLITIS*.; 2017. <https://www.slideshare.net/AbhinavKumar14/inflammatory-bowel-disease-ulcerative-colitis>. Accessed March 18, 2019.
 196. Michelfelder AJ, Lee KC, Bading EM. Integrative Medicine and Gastrointestinal Disease. *Prim Care Clin Off Pract*. 2010;37(2):255-267. doi:10.1016/j.pop.2010.02.003
 197. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. *Ficha Técnica Loperamida*.; 2015. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/78978/FichaTecnica_78978.html.pdf. Accessed April 11, 2019.
 198. Jin J. Over-the-counter Laxatives. *JAMA*. 2014;312(11):1167. doi:10.1001/jama.2014.2078
 199. Wang X, Yin J. Complementary and Alternative Therapies for Chronic Constipation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:396396. doi:10.1155/2015/396396
 200. Langhorst J, Wulfert H, Lauche R, et al. Systematic Review of Complementary and Alternative Medicine Treatments in Inflammatory Bowel Diseases. *J Crohn's Colitis*. 2015;9(1):86-106. doi:10.1093/ecco-jcc/jju007
 201. Lin SC, Cheifetz AS. The Use of Complementary and Alternative Medicine in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2018;14(7):415-425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30166957>. Accessed April 11, 2019.
 202. Cheifetz AS, Gianotti R, Lubert R, Gibson PR. Complementary and Alternative Medicines Used by Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;152(2):415-429.e15. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.004

203. Solecki RS. Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. *Science* (80-). 1975;190(4217):880-881. doi:10.1126/science.190.4217.880
204. Guthrie D. *A History Of Medicine*. London: Thomas Nelson And Sons Ltd London; 1945. <https://archive.org/details/historyofmedicin035119mbp/page/n8>. Accessed April 22, 2019.
205. Su X-Z, Miller LH. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci China Life Sci*. 2015;58(11):1175-1179. doi:10.1007/s11427-015-4948-7
206. Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang XJ, et al. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappaB. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12(12):1279-1289. doi:10.1046/j.1365-2036.1998.00424.x
207. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*. 1999;163(6):3474-3483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477620>. Accessed April 22, 2019.
208. Kurihara K, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Inhibition of platelet-activating factor (PAF)-induced chemotaxis and PAF binding to human eosinophils and neutrophils by the specific ginkgolide-derived PAF antagonist, BN 52021. *J Allergy Clin Immunol*. 1989;83(1):83-90. doi:10.1016/0091-6749(89)90480-6
209. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia*. 1989;45(8):708-712. doi:10.1007/BF01974564
210. Langmead L, Rampton DS. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease-benefits and dangers. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(9):1239-1252. doi:10.1046/j.1365-2036.2001.01053.x
211. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*. 2014;4:177. doi:10.3389/fphar.2013.00177
212. Abuajah CI, Ogbonna AC, Osuji CM. Functional components and medicinal properties of food: a review. *J Food Sci Technol*. 2015;52(5):2522-2529. doi:10.1007/s13197-014-1396-5
213. Barbieri R, Coppo E, Marchese A, et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res*. 2017;196:44-68. doi:10.1016/j.micres.2016.12.003
214. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*. 2007;3(7):408-414. doi:10.1038/nchembio.2007.5
215. De Groot AC, Schmidt E. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis*. 2016;27(4):161-169. doi:10.1097/DER.000000000000193
216. Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. *Molecules*. 2019;24(21):3961.

- doi:10.3390/molecules24213961
217. Somerville V, Bringans C, Braakhuis A. Polyphenols and Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport Med.* 2017;47(8):1589-1599. doi:10.1007/s40279-017-0675-5
 218. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 205AD;81(1):215-217. doi:https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215S
 219. Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Oludemi T, Ayuda-Durán B, González-Manzano S. Plant phenolics as functional food ingredients. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* Vol 90. ; 2019:183-257. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.012
 220. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007;18(9):567-579. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.10.007
 221. Kaulmann A, Bohn T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9346470. doi:10.1155/2016/9346470
 222. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 2016;8:33-42. doi:10.1016/j.cofs.2016.02.002
 223. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem.* 2002;50(3):618-621. doi:10.1021/jf010919h
 224. Williamson G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr Bull.* 2017;42(3):226-235. doi:10.1111/nbu.12278
 225. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, De Villiers WJS. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem.* 2005;16(5):297-304. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.09.007
 226. Phan MAT, Paterson J, Bucknall M, Arcot J. Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(8):1310-1329. doi:10.1080/10408398.2016.1254595
 227. Plaskett LG. *The Health and Medical Use of Aloe Vera.* Tacoma, United States: Life Sciences Press; 1996. <https://scholar.google.com/scholar?hl=en&q=%0A+Plaskett%2C+LG.+%0A+The+Health+and+Medical+Use+of+Aloe+Vera.+Tacoma%2C+WA%2C+USA%3A+Life+Sciences+Press%2C++1998.%0A>. Accessed April 22, 2019.
 228. Pardo de Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: An ethnopharmaco-botanical review. *J Ethnopharmacol.* 2005;98(1-2):1-19. doi:10.1016/j.jep.2004.11.003
 229. Pardo de Santayana M, Morales R. Consideraciones sobre el género Jasonia (Compositae, Inuleae). Sistemática y usos. *Acta Bot Malacit.* 2004;29:221-232. doi:10.24310/abm.v29i0.7232

230. Flann C. Global Compositae Checklist. <https://compositae.landcareresearch.co.nz/default.aspx?Page=NameDetails&TabNum=0&NameId=f0068eec-acd1-49c1-9ec2-ec3d6538e2de>. Published 2009. Accessed July 27, 2020.
231. Pardo de Santayana M, Morales R, Muñoz Centeno LM, Tardío J, Aceituno-Mata L. *Inventario Español de Los Conocimientos Tradicionales Relativos a La Biodiversidad - Chiliadenus Glutinosus (L.) Furr. = Jasonia Glutinosa (L.) DC*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; 2014. https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/iect_chiliadenus_glutinosus_tcm30-164125.pdf.
232. López Jiménez N. Las plantas vasculares de la Comunidad de Madrid. Catálogo florístico, claves dicotómicas y estudio detallado de la familia "Compositae Giseke". Tesis doctoral. 2007. <https://eprints.ucm.es/54180/1/5325646465.pdf>. Accessed July 27, 2020.
233. Valero MS, Berzosa C, Langa E, Gómez-Rincón C, López V. Jasonia glutinosa D.C ("Rock tea"): botanical, phytochemical and pharmacological aspects. *Bol latinoam Caribe plantas med aromát.* 2013;12(6):543-557. https://www.researchgate.net/publication/259178824_Jasonia_glutinosa_DC_Rock_tea_Botanical_phytochemical_and_pharmacological_aspects. Accessed August 28, 2019.
234. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (review). *Mol Med Rep.* 2010;3(6):895-901. doi:10.3892/mmr.2010.377
235. Mulet PL. Estudios etnobotánicos en la provincia de Castellón. *Nat Medicat.* 1995;37-38:22-29.
236. Guillén MD, Ibargoitia ML. Volatile components obtained from the leaves of Jasonia glutinosa. *Food Chem.* 1996;56(2):155-158. doi:10.1016/0308-8146(95)00156-5
237. González Romero MA, Villaescusa Castillo L, Díaz Lanza AM, Arribas Bricio JM, Soria Monzón CA, Sanz Perucha J. Volatile composition of Jasonia glutinosa D. C. *Z Naturforsch C.* 2003;58(11-12):804-806. doi:10.1515/znc-2003-11-1209
238. Rubio B, Villaescusa L, Diaz A, Fernandez L, Martin T. Flavonol Glycosides from Scolymus hispanicus and Jasonia glutinosa. *Planta Med.* 1995;61(06):583-583. doi:10.1055/s-2006-959386
239. Fernandez Ocaña AM. Estudio Etnobotánico en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas. Investigación química de un grupo de especies interesantes. 2000.
240. Bermejo BP, Abad MJ, Díaz AM, Villaescusa L, González MA, Silván AM. Sesquiterpenes from Jasonia glutinosa: in vitro anti-inflammatory activity. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(1):1-4. doi:10.1248/bpb.25.1
241. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. *Biochim Biophys Acta - Mol*

- Cell Biol Lipids*. 2015;1851(4):414-421. doi:10.1016/j.bbalip.2014.07.008
242. López V, Akerreta S, Casanova E, García-Mina J, Caverro R, Calvo M. Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities. *Pharm Biol*. 2008;46(9):602-609. doi:10.1080/13880200802179634
243. Złotek U, Szymanowska U, Pecio Ł, Kozachok S, Jakubczyk A. Antioxidative and Potentially Anti-inflammatory Activity of Phenolics from Lovage Leaves *Levisticum officinale* Koch Elicited with Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Molecules*. 2019;24(7):1441. doi:10.3390/molecules24071441
244. Villaescusa L, Diaz AM, Martin T, Gasquet M, Delmas F, Balansard G. Preliminary screening of antiprotozoal activity of *Jasonia glutinosa* aerial parts. *Pharm Biol*. 1996;34(4):303-304. doi:10.1076/phbi.34.4.303.13231
245. Villaescusa-Castillo L, Díaz-Lanza AM, Gasquet M, et al. Antiprotozoal Activity of Sesquiterpenes from *Jasonia Glutinosa*. *Pharm Biol*. 2000;38(3):176-180. doi:10.1076/1388-0209(200007)3831-SFT176
246. Valero MS, Oliván-Viguera A, Garrido I, et al. Rock Tea extract (*Jasonia glutinosa*) relaxes rat aortic smooth muscle by inhibition of L-type Ca²⁺ channels. *J Physiol Biochem*. 2015;71(4):785-793. doi:10.1007/s13105-015-0442-8

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades del sistema gastrointestinal abarcan una gran diversidad de patologías con diferente gravedad y clínica. Algunas más leves, como el meteorismo, la diarrea aguda o el estreñimiento ocasional presentan una alta incidencia y poca mortalidad, mientras que otras más graves, como procesos neoplásicos o diarreas infecciosas, sí generan numerosas víctimas mortales. También son características enfermedades crónicas con un alto impacto en la calidad de vida, como las enfermedades inflamatorias intestinales o trastornos nutricionales relacionados con alteraciones de la absorción intestinal, intolerancias o alergias. Su variedad provoca multitud de síntomas de distintas consideraciones, lo que a veces las hace difíciles de diagnosticar y tratar. Además, suelen afectar no sólo de manera local, sino que acaban teniendo una repercusión sistémica en los pacientes. Esta combinación provoca un gran impacto en su calidad de vida, con el gasto social y económico que esto conlleva.

Durante años, los tratamientos para estas enfermedades han sido poco eficaces, centrados en reducir la sintomatología y presentando numerosos efectos adversos. Con la aparición de los tratamientos biológicos se ha mejorado el control de algunas de estas enfermedades, pero no son válidos para todos los pacientes y su elevado coste exige unos estrictos criterios de inclusión.

A la vista de esta situación, es necesaria la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas y el desarrollo de terapias alternativas, permitiendo encontrar nuevas vías de tratamiento que permitan mejorar y complementar las existentes.

El canal KCa3.1 está implicado en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con la secreción de cloro y agua. Sin embargo, hay muy pocos estudios *in vivo* sobre la importancia funcional de este canal en el intestino.

Por otro lado, una de las plantas medicinales más utilizadas dentro de la costa occidental mediterránea occidental para el tratamiento de patologías digestivas es *Jasonia glutinosa* (L.) DC., más conocida en España como té de roca. A pesar de su uso tradicional, hay pocos trabajos científicos realizados *in vitro* que justifiquen su efecto o

describan su mecanismo de acción, sin haberse descrito hasta el momento su posible efecto *in vivo* a nivel digestivo.

Por ello, nuestra **hipótesis** de trabajo es que el canal KCa3.1 está implicado en la funcionalidad del aparato digestivo, pudiendo ser una diana farmacológica para el tratamiento de patologías intestinales, y que *Jasonia glutinosa* (L.) DC. presenta diversos efectos a nivel del sistema gastrointestinal, lo que avalaría su uso tradicional como digestivo.

Para comprobar esta hipótesis, los **objetivos** planteados en esta tesis doctoral son:

1. Evaluar el efecto de la sobreexpresión o delección del canal KCa3.1 en la morfología, estructura y función motora del aparato digestivo de ratón.
2. Estudiar el posible efecto espasmolítico de un extracto de *Jasonia glutinosa* (L.) DC., valorando la amplitud y frecuencia de las contracciones espontáneas y su efecto sobre la fibra precontraída, así como estudiar su posible papel como antagonista de los canales de Ca²⁺ en el duodeno de rata.
3. Estudiar la posible acción antiinflamatoria y protectora de la barrera intestinal de un extracto de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. en un modelo murino de colitis, evaluando la sintomatología, el grado de lesión y la motilidad del intestino.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS RELATIVAS A LOS ESTUDIOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos realizados con animales en esta tesis doctoral fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza y autorizados por el Gobierno de Aragón (códigos PI 32/15, PI 45/11 y PI 66/14 para los estudios 1, 2 y 3 respectivamente). El programa de cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con el RD53/2013, que transpone la Directiva Europea 63/2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

3.2. ESTUDIO 1: PAPEL DEL CANAL KCa3.1 EN EL APARATO DIGESTIVO

Animales

Los ratones utilizados en este estudio fueron alojados en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Se estabularon en cubetas de plástico, en condiciones normales de laboratorio (20 ± 2 °C, 40-60% humedad relativa y ciclo normal de luz/oscuridad) y acceso libre a pienso estándar y agua de bebida autoclavada.

En este estudio se utilizaron dos cepas de ratones con fondo genético CB57BL/6. Estos animales fueron modificados genéticamente para, mediante una regulación farmacológica, sobreexpresar o producir una delección del gen codificador del canal KCa3.1, el *Kcnn4*. El uso de ambos modelos *in vivo* permitió evaluar los cambios biológicos producidos por una modificación en la expresión de este canal.

El primer grupo, denominado **KCa3.1+**, estuvo formado por ratones transgénicos preparados para expresar un transgén que indujera la sobreexpresión del canal KCa3.1 en el epitelio intestinal. El segundo grupo, denominado **KCa3.1-**, fue constituido por ratones knockout (KO) condicionales, los cuales tuvieron una delección condicional del exón 4 del gen *Kcnn4*, lo que impidió la expresión de un canal KCa3.1 funcional¹.

Los ratones de ambas cepas fueron generados por el grupo del Profesor Dr. Hiroto Miura, Universidad de Nevada Medical School, mientras que la sobreexpresión o delección condicional fue realizada por el grupo del Dr. Köhler en Zaragoza.

La ingeniería genética utilizada para el desarrollo de estos ratones se encuentra detallada en el apartado de material y métodos de la primera publicación de esta tesis doctoral.

Modulación farmacológica de la expresión del canal KCa3.1

Para inducir los cambios en la expresión del canal, se utilizó la doxiciclina. Este antibiótico del grupo de las tetraciclinas es usado como regulador de la transcripción genética, generando una sobreexpresión o una delección de determinados genes. Esta comparación permitió el análisis de los fenotipos generados por la sobreexpresión o delección del canal en los ratones KCa3.1+ y KCa3.1- respectivamente.

La doxiciclina fue administrada en el agua de bebida a dosis de 1 mg/ml durante dos semanas. Con el fin de evitar el rechazo por parte de los animales, la solución fue suplementada con un 1% de sacarosa reduciendo así el amargor del preparado. Estos animales fueron denominados +DOX.

Como grupo control se utilizó a los ratones que no recibieron doxiciclina en agua de bebida, aunque esta también fue suplementada con un 1% de sacarosa para equiparar el sabor. Estos se comportaron como ratones CB57BL/6 genéticamente normales y fueron denominados como -DOX.

Además, se comprobó la posibilidad de neutralizar el fenotipo producido por la sobreexpresión del canal mediante un tratamiento farmacológico *in vivo*. Para ello, se utilizó un bloqueador del canal KCa3.1, el Senicapoc® (Icagen Inc.). Este medicamento fue incluido en un pienso preparado en una dosis de 30 mg/kg/día, la cual se conoce que alcanza niveles en plasma de 100 nM². Los controles utilizados para esta prueba fueron ratones KCa3.1+ alimentados con este pienso, pero sin la adición del Senicapoc®, con el fin de evitar cambios en la ingesta por las posibles diferencias en los piensos.

Durante la inducción de estos modelos, se midieron una serie de parámetros por parte del personal del animalario, monitorizando posibles cambios generados por la expresión de los fenotipos. Se cuantificó la cantidad de comida y bebida ingerida y se evaluó el estado de los animales, tomando medidas del peso y realizando un análisis visual de su estado clínico.

Organografía del paquete gastrointestinal

Tras finalizar la inducción del modelo genético, el personal del animalario se encargó del sacrificio de los animales mediante inhalación de CO₂ o dislocación cervical, en función del emplazamiento, y de la extracción de los tejidos. Así, se retiró el paquete gastrointestinal y se conservó en solución PBS frío (tampón fosfato salino).

Una vez recibidas las muestras, se realizó una organografía. Esta prueba consiste en la toma de medidas (peso y tamaño) de los diferentes órganos mediante una balanza de precisión y una regla milimétrica. Los datos fueron expresados como la media del peso en gramos o la longitud en centímetros de los órganos.

También se tomaron muestras de duodeno y colon para su análisis en técnicas posteriores, dividiéndolos en segmentos y guardándolos en formol, para realizar estudios de histología, o en ringer Krebs frío (NaCl 120 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 24,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7.4), para llevar a cabo estudios de miografía.

Análisis del contenido intestinal

Tras el sacrificio, además de la organografía, se guardó el contenido intestinal de los ratones para su análisis. En primer lugar, se recogió el quilo del intestino delgado, se cuantificó su volumen y se almacenó a -20°C. Por otro lado, se extrajeron las heces contenidas en el colon, se pesaron y se dejaron a temperatura ambiente durante varios días para producir su deshidratación, con el objetivo de medir su contenido en agua. La fórmula empleada para ello fue:

$$\% \text{ agua en heces} = \frac{\text{heces húmedas (mg)} - \text{heces secas (mg)}}{\text{heces húmedas (mg)}} \times 100$$

Tras estos experimentos se realizó un análisis del contenido electrolítico de las muestras recogidas. Primeramente, las muestras de quilo fueron descongeladas y centrifugadas tres veces durante 10 minutos a 8.000 rpm y a 4°C, recogiendo posteriormente el sobrenadante.

Por otro lado, las heces secas fueron rehidratadas en 1 ml de agua y se calentaron a 65°C durante 60 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Estos fueron enviados al Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Miguel Servet para su análisis, cuantificando la presencia de los iones de sodio, potasio y cloro presentes en las muestras mediante espectrofotometría de llama.

En el análisis del contenido intestinal, la cantidad de quilo fue expresada en mililitros, el peso de las heces en gramos y su contenido en agua en porcentaje respecto al peso total. En el análisis electrolítico, la concentración de los iones se expresó en milimoles.

Estudio histológico

Para realizar el estudio histológico se utilizaron muestras de tejido intestinal de duodeno y colon. Las muestras, fijadas en formol, fueron enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del CIBA para la realización de cortes histológicos y su tinción con hematoxilina y eosina. Una vez obtenidos los cortes y entregados en portaobjetos, fueron fotografiados en el laboratorio de Fisiología en la Facultad de Veterinaria utilizando una cámara digital Nikon DS-Ri1 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse Ci. Las secciones fotografiadas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ, midiéndose el área de la luz intestinal y el grosor de las capas musculares lisas longitudinal y circular. Se realizaron tres medidas de cada corte histológico en tres puntos diferentes. El área del lumen intestinal se expresó en mm² y el grosor de las capas musculares en μm.

Técnica de baño de órganos

Para analizar las posibles alteraciones producidas por la modulación del canal KCa3.1 en la función contráctil del intestino se realizó una prueba de miografía. Esta prueba *ex vivo* permitió registrar, cuantificar y analizar la contractibilidad de muestras de tejido intestinal, manteniendo condiciones similares a las fisiológicas. Específicamente, se evaluaron las contracciones espontáneas basales, el efecto de un antagonista del canal KCa3.1 y la respuesta contráctil inducida por acetilcolina (ACh).

Agentes ensayados

El TRAM-34, antagonista del canal KCa3.1, utilizado se obtuvo de Sigma. La solución madre fue preparada a partir de TRAM-34 sólido ≥98% diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) en proporción 2 mg/ml. La dilución final utilizada, 10⁻⁶M, tuvo una concentración de DMSO < 0.001%.

La ACh, un agonista colinérgico muscarínico, utilizada fue obtenida de Sigma. La solución de trabajo fue preparada a partir de cloruro de acetilcolina disuelto en agua.

Preparación del tejido

Se utilizaron segmentos de duodeno (2 cm a partir del píloro) y de colon medio (2 cm a partir del ciego). Estos fueron lavados con solución salina y almacenados en tubos Falcon

con ringer Krebs frío para su transporte hasta el laboratorio de investigación de la Universidad San Jorge, donde se llevaron a cabo los ensayos de miografía.

Una vez en el laboratorio, los tejidos fueron cortados en segmentos más pequeños, de unos 10 mm de longitud, se limpiaron de restos de mesenterio y/o grasa. Se colocaron en las copas del baño de órganos con 5ml de Ringer Krebs, a una temperatura regulada de 37°C y continuamente gaseada con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂). Para ello, un extremo del tejido se fijó a la base de la copa y el otro extremo se unió a un transductor isométrico en el sentido de las fibras musculares lisas longitudinales (**figura 3.1**).



Figura 3.1. Segmento de intestino en el baño de órganos durante el experimento. Se puede observar la copa de doble camisa para mantener la temperatura que contiene el líquido nutricio, la aguja insufladora de carbógeno y la fijación del tejido en la base de la copa en un extremo y al transductor isométrico a través de un hilo en el otro.

Una vez colocado el tejido en el baño de órganos, se dejaron estabilizar las contracciones basales durante 60 minutos, cambiando el medio cada 20 minutos.

A cada segmento se le dio una tensión inicial de ≈ 5 mN medida por el transductor isométrico. Las contracciones producidas durante los ensayos fueron amplificadas y procesadas por el hardware de baño de órganos e-coder 410® (e-DaQ) y registradas en un ordenador para su posterior análisis a través el programa eDAQ Chart v.5.5.15 (**figura 3.2**).



Figura 3.2. Foto del equipo para baño de órganos. Copas con transductores isométricos, transductor, amplificador y ordenador con el software correspondiente.

Protocolo para el estudio del canal $KCa3.1$

Para estudiar el efecto de la modulación del canal sobre la contractibilidad intestinal, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos sobre segmentos de duodeno y colon:

- Estudio de la motilidad basal. Tras el periodo de estabilización, se registraron las contracciones espontáneas durante 10 minutos. Más tarde se analizaron la frecuencia (contracciones por segundo) y la amplitud (gramos de fuerza) de dichas contracciones.
- Estudio del efecto del TRAM-34. Pasados los 10 minutos, se añadió al medio nutritivo TRAM-34 ($1 \mu\text{M}$) y se registraron las contracciones durante los siguientes 15 minutos. La amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas en presencia de TRAM-34 fueron calculadas como el porcentaje respecto a las ondas lentas de la motilidad basal.
- Estudio de la respuesta a un agonista colinérgico muscarínico, la acetilcolina. Tras haber realizado un triple lavado y dejar que el tejido se estabilizara de nuevo durante 20 minutos, se añadió a las copas ACh (10^{-4} M) y se registraron las contracciones durante 3 minutos. La respuesta motora inducida por la ACh fue

medida como el área bajo la curva (actividad mecánica de la integral por segundo) de este periodo respecto a los tres minutos previos, considerados como respuesta control. La integral de la fuerza de contracción fue normalizada al peso de los segmentos de duodeno húmedos. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje \pm error estándar respecto al grupo control (-DOX), considerado el 100%.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todas las técnicas referidas se expresaron como la media \pm error estándar.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph-Pad Prism, versión 6 (GraphPad Software, USA). Dado que las comparaciones se realizaron entre un máximo de dos grupos, +DOX y -DOX, se utilizó la prueba de t-student, aplicando la corrección de Welch para los resultados paramétricos o el test de Mann-Whitney para los no paramétricos. Los resultados se consideraron significativos para valores de $p \leq 0.05$.

3.3. ESTUDIO 2: EFECTO DEL TÉ DE ROCA SOBRE LA MUSCULATURA LISA INTESTINAL

Animales

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho, de 200-250 g de peso, obtenidas de la empresa Janvier Lab (LeGenest St. Isle, Francia). Los animales fueron estabulados en el animalario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza en cubetas de plástico, en condiciones normales de laboratorio, ciclo normal de luz/oscuridad y con acceso libre a pienso estándar y agua de bebida autoclavada.

Técnica de baño de órganos

Agentes ensayados

Para testar el efecto bioactivo de *Jasonia glutinosa* se utilizó el extracto etanólico de las partes aéreas de la planta preparado según lo descrito por Valero y cols.³. La parte etanólica del extracto fue retirada mediante un rotavapor y el extracto almacenado a -20° C hasta su utilización. Para su uso, el extracto se diluyó en agua milliQ.

Se utilizaron los siguientes reactivos: verapamilo (V), antagonista de los canales de calcio tipo L, como sustancia relajante control, cloruro de potasio (KCl) para producir una contracción sostenida sobre la musculatura lisa, cloruro de calcio (CaCl₂) para generar una contracción en un medio con ausencia de calcio y Bay-K 8644, agonista de los canales de calcio tipo L. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma® (Madrid).

El Verapamilo y Bay-K fueron primero diluidos en metanol para la realización de la solución madre. Las diluciones posteriores fueron realizadas en agua milliQ.

Preparación del tejido

La extracción de los segmentos de intestino se realizó siguiendo los pasos indicados en el estudio de miografía del canal KCa3.1. En este caso, se recogieron segmentos de duodeno de 2-6 cm a partir del píloro. La tensión establecida para el duodeno de rata fue aproximadamente de 9,8 mN.

Protocolo para el estudio del efecto del té de Roca sobre la musculatura lisa intestinal

Para evaluar el efecto de nuestro extracto de TR sobre la contractibilidad de la musculatura lisa intestinal se realizaron varios ensayos:

- Efecto sobre la motilidad basal. Tras 5 minutos del inicio del registro de las contracciones espontáneas del duodeno, se ensayaron diferentes concentraciones del extracto de TR (0.5, 1, 1.5, 2.5 y 5 mg/ml), verapamilo (10^{-8} , 3×10^{-7} , 10^{-7} , 3×10^{-6} y 10^{-6} M) y el vehículo del extracto, agua milliQ. Sobre estas contracciones se analizó el efecto producido por dichas sustancias sobre la frecuencia y la amplitud. Los resultados fueron representados como la media \pm error estándar con respecto al control, considerado como la motilidad basal previa a la adición de los reactivos. Utilizando esta curva de dosis respuesta se obtuvo la concentración necesaria para reducir un 50% la contracción máxima inicial (CI_{50}) del TR y del verapamilo. Para ello se realizó una media geométrica en la curva dosis-respuesta en el 50% de la inhibición de la respuesta inicial y se dio un valor en mg/ml de reactivo con un intervalo de confianza (IC) del 95%.
- Efecto sobre la contracción con cloruro de potasio. Se produjo una contracción sostenida en el tiempo con KCl (80 mM) y se realizaron curvas dosis respuesta con el extracto del té de roca o el verapamilo. Para su análisis cuantitativo se utilizó como control la diferencia de la precontracción inicial del KCl respecto a la motilidad basal, y esta se comparó con la respuesta tras las dosis acumulativas de los reactivos, expresándose como porcentaje respecto al control \pm error estándar.
- Estudio del extracto de TR sobre el calcio. Para conocer si el extracto inducía su respuesta a través del calcio celular se realizaron dos ensayos.
 1. Estudio del extracto sobre la contracción inducida por el $CaCl_2$. Una vez pasado el periodo de estabilización, se cambió el líquido nutricio por un ringer sin calcio ((en mM): NaCl 120, KCl 4,7, $MgSO_4$ 1,4, $NaHCO_3$ 24,5, KH_2PO_4 1, glucosa 5,6). Pasados 20 minutos de incubación en este medio se cambió por un medio sin calcio, rico en potasio ((en mM): NaCl 75, KCl 50, $MgSO_4$ 1,4, $NaHCO_3$ 24,5, KH_2PO_4 1, glucosa 5,6, y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 0,5 mM). Tras 20 minutos de incubación se añadieron a las copas el vehículo, el extracto de TR (0,5 y 5 mg/ml) o el verapamilo (10^{-6}

M). 15 minutos después, se añadieron concentraciones crecientes de CaCl_2 de manera acumulativa (10^{-5} - 10^{-2} M). Para analizar estos resultados se midieron las respuestas contráctiles producidas por el CaCl_2 en cada segmento del duodeno, comparándolo frente a su motilidad basal. Posteriormente se compararon las respuestas producidas por cada reactivo. Los datos se expresaron en media de gramos de contracción \pm error estándar.

2. Efecto del extracto sobre la contracción producida por el Bay-K 8644. En primer lugar, se añadió a los tejidos el Bay-K (10^{-5} M) y se registró la contracción producida durante 3 minutos. Posteriormente, se realizó un triple lavado y se estabilizó el tejido durante 20 minutos. Tras este periodo de tiempo, el vehículo, distintas concentraciones de extracto de TR (0,5 y 5 mg/ml) y el V (10^{-6} M) fueron adicionados al baño durante 15 minutos, adicionando después el Bay-K 8644 (10^{-5} M) y registrando de nuevo su respuesta. Para el análisis cuantitativo de la respuesta, se compararon las respuestas contráctiles producidas por el Bay-K antes y después de la adición de los reactivos, tomando como control la contracción producida en el tejido tratado con el vehículo y expresando las contracciones de los demás grupos como porcentaje del control \pm error estándar.

Cada protocolo experimental fue realizado sistemáticamente en dos segmentos del músculo longitudinal de duodeno tomados de la misma rata y repetidos en cinco o seis animales.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como el porcentaje medio con respecto al control \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el mismo software que en los estudios anteriores. Para analizar las diferencias entre grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Tukey para determinar los valores de p o mediante una prueba de t-student, aplicando la corrección de Welch para los resultados paramétricos o el test de Mann-Whitney para los no paramétricos. Los resultados se consideraron significativos para valores de $p \leq 0.05$.

3.4. ESTUDIO 3: EFECTO PROTECTOR DEL TÉ DE ROCA EN UN MODELO DE COLITIS

Animales

En este ensayo se emplearon ratones macho de la cepa C57Bl/6 macho de 8-12 semanas de edad, suministrados por Janvier Lab (LeGenest St. Isle, Francia) y aclimatados durante una semana antes del comienzo de los experimentos. Fueron estabulados en cubetas de plástico, a un ratio de 4-5 animales/cubeta, en condiciones normales de laboratorio (20 ± 2 °C, 40-60% humedad relativa y ciclo normal de luz/oscuridad), con acceso libre a pienso estándar y agua de bebida autoclavada.

Modelo murino de colitis ulcerosa

Para estudiar el posible efecto protector del té de roca en condiciones inflamatorias se utilizó un modelo de lesión-reparación mediante la administración de DSS.

Los modelos lesión-reparación constan de dos fases, la primera consiste en la inducción aguda de una lesión en un tejido determinado seguida de una fase de reparación donde se elimina el inductor y se deja un tiempo de recuperación. En estos modelos se puede probar la capacidad de un tratamiento para reducir el impacto de la lesión y en la fase de recuperación, su capacidad para acelerarla⁴.

El inductor de la lesión utilizado en nuestro modelo fue el DSS (PM: 40.000 Da, Panreac, Lörrach, Alemania). Este reactivo, con capacidad citotóxica para células epiteliales intestinal y macrófagos, administrado por vía oral produce una rotura de la barrera intestinal y una inflamación aguda del intestino que puede acabar provocando ulceraciones, simulando así la sintomatología de la colitis ulcerosa^{5,6}. La fase de inducción duró 7 días, en los cuales se administró el DSS al 2,5% en agua de bebida. Pasado este tiempo, se retiró este inductor y se dejó una fase de recuperación de tres días.

Sobre este modelo se evaluaron tres tratamientos: nuestro extracto de té de roca, a las concentraciones de 5, 25 y 50 mg/kg, la sulfasalazina (SSZ), medicamento de elección en el tratamiento de la colitis ulcerosa, a la dosis de 100 mg/kg y el vehículo de las disoluciones, agua de bebida de los ratones, como tratamiento control. Las disoluciones

se realizaron diariamente y fueron administradas mediante sonda intragástrica en un volumen de 0,2 ml.

Se administraron los tratamientos orales durante 20 días. La colitis se indujo durante los días 10 a 17. Finalmente, los animales fueron sacrificados (**figura 3.3**).

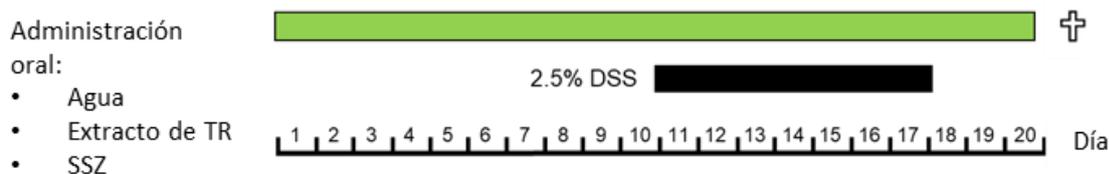


Figura 3.3. Diseño experimental de la inducción de la colitis mediante la adicción de DSS 2.5% en agua de bebida.

Para evaluar el posible efecto protector del té de roca, los animales utilizados en este experimento fueron divididos en siete grupos y nombrados en función del tratamiento recibido en agua de bebida y el recibido mediante sondaje. Los dos primeros grupos, a los que no se les indujo la enfermedad, recibieron agua y extracto de TR (50 mg/kg) respectivamente como tratamiento oral. Estos grupos fueron utilizados como control y para comprobar el efecto del extracto de TR sobre animales sanos. Los otros cinco grupos desarrollaron la enfermedad recibiendo el DSS en agua de bebida. El primero de estos grupos en el tratamiento oral solo recibió el vehículo, siendo utilizado para registrar el impacto de la enfermedad sin tratamiento. Otros tres grupos recibieron extracto de TR a distintas dosis (5, 25 y 50 mg/kg). El último grupo fue tratado con SSZ a la dosis de 100 mg/kg, elegida de acuerdo a la bibliografía⁷, utilizado como grupo de referencia con un tratamiento de elección en colitis.

Valoración de la colitis

Para la evaluación de la colitis se monitorizó diariamente a los animales, observando la sintomatología asociada. Con estos datos se realizó un índice de actividad de la enfermedad (DAI). Este índice se calculó como la suma del score de pérdida de peso, que fue el porcentaje de pérdida de peso diaria respecto a la medición inicial (0: <1%, 1: 1-5%,

2: 5-10%, 3: 10-15%, 4: $\geq 15\%$), la valoración diaria de la consistencia de las heces (0: normal, 1: heces blandas, 4: diarrea acuosa) y la presencia de sangre en heces (0: normal, 2: sangre oculta, 4: sangre visible).

La presencia de sangre oculta fue determinada mediante un test cualitativo de sangre en heces (Tri Slider FOB Guayaco, Sanilabo, España). La realización de esta prueba consiste en colocar una muestra de residuo fecal sobre una cartulina impregnada en resina guayaco. A continuación, se añade una solución alcohólica de peróxido de hidrógeno, la cual provoca una tinción azul característica en presencia de sangre debido a una reacción de oxidación de la hemoglobina. La tinción debe detectarse antes de los 30 segundos, a partir de los cuales se descarta la tinción como positivo (**figura 3.4**).

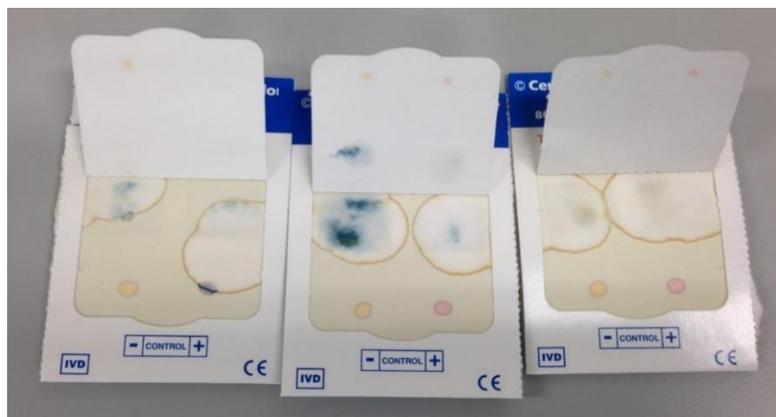


Imagen 3.4. Fotografía del test Guayaco donde se puede observar la coloración azul provocada por la reacción de oxidación de la sangre en presencia de peróxido de hidrógeno.

Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó un estudio del grado de lesión del colon. Además, se tomaron muestras de intestino para otras técnicas que se explicarán posteriormente.

Estudio macroscópico

Se realizó un análisis macroscópico del grado de lesión del colon. La longitud de colon y el grosor del colon proximal y distal se midió utilizando un calibre digital (resolución de 0,01 mm). A continuación, el colon fue abierto de manera longitudinal y fue lavado con solución salina al 0,9%. Los efectos de la colitis fueron valorados en función de un sistema de puntuación estándar: número de adherencias (0: 0, 1: 1, 2: 2, 3: >2),

diarrea (0: heces normales, 1: heces blandas, 4: diarrea acuosa), edema (0: ausencia, 1: moderado, 2: severo), estenosis (0: 0, 1: 1, 2: 2, 3: >2), moco (0: ausencia, 1: presencia), hemorragia (0: ausencia, 1: sangre visible), eritema (0: ausencia, 1: <1 cm, 2: ≥1 cm), úlceras o erosiones (0: 0, 1: <1 cm, 2: ≥ 1cm) y presencia de sangre oculta (0: no, 1: sí). El score se calculó con la suma de los diferentes apartados y se realizó para cada uno de los animales. Los resultados obtenidos se expresaron como la media ± error estándar.

Estudio de la capacidad antiinflamatoria del té de roca

Para evaluar el efecto protector del TR se llevó a cabo una evaluación de la expresión de distintos biomarcadores de inflamación en muestras de tejido del colon.

Determinación de actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa es una enzima proinflamatoria producida mayoritariamente por neutrófilos^{8,9}. Es considerada como uno de los principales indicadores de inflamación aguda debido a que los neutrófilos se infiltran de manera temprana en el sitio de la inflamación, liberando el contenido de sus gránulos de secreción al medio extracelular¹⁰⁻¹².

Para cuantificarla se utilizaron muestras de colon distal previamente extraídas y almacenadas a -80 °C. Estas muestras fueron homogeneizadas a través de un homogeneizador DI25 Basic (IKA, Staufen, Alemania) en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) y después centrifugadas a 15.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. La fracción sobrenadante fue utilizada para medir el contenido de MPO por el Kit Colorimétrico de Actividad de MPO (Sigma-Aldrich). En este kit, se utiliza la capacidad de la MPO para catalizar la formación de ácido hipocloroso, el cual reacciona con la taurina para formar un complejo llamado taurina cloroamina. Este complejo, junto con el cromóforo TNB genera un producto incoloro, el DTNB. La formación de este último compuesto es proporcional a la cantidad de MPO de la muestra utilizada, permitiendo cuantificar su presencia. Una unidad de actividad de MPO se define como la cantidad de enzima que hidroliza el sustrato y genera cloroamina de taurina para consumir 1 μmol de TNB por minuto a 25 °C. La actividad de MPO se expresó como la media de U/mg de proteína ± error estándar.

Determinación de la expresión de las interleucinas (IL) 6 y 10

Otros de los biomarcadores cuantificados fueron las interleucinas 6 y 10. La IL-6 es una citocina proinflamatoria generada por numerosas células defensivas estimulando la diferenciación de células T y B y contribuyendo a la inflamación cuando se une a su receptor¹³⁻¹⁵. Por otro lado, la IL-10 tiene un efecto antiinflamatorio, pudiendo inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias por parte de células defensivas^{16,17}. La presencia de estas proteínas en las muestras de colon distal fue medida a través de la técnica ELISA, acrónimo de “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”, mediante los kits Ready-Set-Go® de eBioscience para IL-6 e IL-10. Esta prueba permite la detección de un antígeno de una proteína objetivo mediante su unión a un anticuerpo enlazado a una enzima que produzca un producto detectable, por ejemplo, un cambio de color.

Cada kit contenía los reactivos necesarios para su ejecución, aunque los pasos realizados fueron muy semejantes. Para ambos kits se utilizaron placas de ELISA Corning Costar 9018 de 96 pocillos. En primer lugar, se añadieron 100 µL por pocillo de la solución del anticuerpo primario específico para IL-6 o 10 y se dejaron incubar toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se aspiraron y lavaron los pocillos con >250 µL/pocillo de la solución de lavado proporcionada por los kits (1x PBS, 0,05% Tween-20), retirando los restos de solución utilizando papel absorbente. A continuación, se añadieron 200 µL/pocillo del solvente del ensayo y se dejó incubar durante una hora para bloquear posibles uniones inespecíficas, retirando los restos después. Una vez retirados, se añadieron ocho concentraciones crecientes del estándar para realizar una curva de calibrado en cada kit (4 – 500 y 32 – 4000 pg/ml para IL-6 e IL-10 respectivamente) y se añadieron 100 µL/pocillo de nuestras muestras, dejando incubar estas soluciones durante toda la noche, mejorando así la unión con el anticuerpo primario y la sensibilidad de la prueba. Al día siguiente, se aspiraron y lavaron los pocillos 5 veces como se había hecho previamente para eliminar los restos de muestras o estándares. Tras esto, se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo de detección o secundario específico de cada citoquina conjugados con biotina y se incubaron una hora. De nuevo se eliminaron los restos de anticuerpo mediante 5 lavados consecutivos. Una vez retirados los residuos, se añadieron 100 µL/pocillo de la enzima de detección, el complejo avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) o estreptavidina-HRP para la IL-6 o 10 respectivamente, proporcionados en

los kits y se dejó incubar durante 30 minutos para su unión a los anticuerpos secundarios. Pasado este tiempo, se limpiaron los restos de solución lavando 7 veces cada pocillo, dejando dos minutos la solución de lavado antes de retirarla para asegurarnos la eliminación total del compuesto no unido al anticuerpo secundario. Una vez eliminados los restos de solución de lavado, se añadieron 100 µL/pocillo de la solución de sustrato (tetrametilbencidina) para generar la respuesta colorimétrica y se dejaron reposar 15 minutos. Finalmente, se añadió la solución stop correspondiente de cada kit para frenar la reacción, 50 y 100 µL/pocillo de H₃PO₄ para los kits de IL-6 e IL-10 respectivamente. Ambas placas de ELISA fueron leídas a 450 nm. Los datos fueron expresados como media ± error estándar de pg de proteína (IL-6 o 10) /mg totales de proteínas.

Determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2)

Las enzimas iNOS y COX-2 son dos de los marcadores de inflamación más utilizados. El óxido nítrico sintetizado por la iNOS se ha relacionado en los últimos años con la alteración de la función del intestino y con su participación en la patogenia de las enfermedades inflamatorias intestinales^{18,19}. La COX-2 es una enzima que participa en los procesos inflamatorios y en la síntesis de prostanoïdes. Su expresión se induce por la presencia de mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la IL-1β o el interferón γ entre otros^{20,21}.

Para cuantificar los niveles de estas enzimas en las muestras de muestras de colon distal se utilizó el Western Blot (WB) o Inmunoblotting. En el WB las proteínas son separadas por electroforesis en función de su peso molecular y a continuación se utilizan un anticuerpo primario y otro secundario específicos para detectar la proteína objetivo.

Para realizar esta técnica en nuestro estudio, las muestras de colon distal recogidas previamente fueron homogeneizadas en solución tampón de lisis fría (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,5 y Triton X-100 al 1%) complementado con un inhibidor de proteasas EDTA-free® (Roche) para evitar su degradación. Estos homogeneizados se centrifugaron a 15.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.

Para la detección específica de iNOS y COX-2, muestras de los sobrenadantes anteriores fueron colocadas en geles SDS-PAGE con 7,5% de poliacrilamida (Bio-Rad) y se

separaron sus proteínas mediante electroforesis a amperaje constante de 30 mA durante 1-2 horas. A continuación, las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas PVDF pretratadas con metanol (Immobilon-P; Millipore) para poder marcar las proteínas con anticuerpos específicos. La transferencia se realizó a amperaje constante de 200 mA durante 2 horas. Al finalizar, los huecos no ocupados por las proteínas de estas membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en solución salina tamponada con Tris suplementada con Tween-20 al 0,1% (TBST) a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, se incubaron las membranas con anticuerpos para iNOS (1:200, BD Biosciences), COX-2 (1:1000, BD Biosciences) o β -actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, usada como control) durante la noche en TBST con leche desnatada al 1% a 4 °C.

Al día siguiente, las membranas se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (1:2000, BD Biosciences) en TBST con leche desnatada al 1% durante dos horas a temperatura ambiente para la detección visual de proteínas. Los inmunocomplejos formados proteína-anticuerpo se detectaron por reacción quimioluminiscente usando el kit Western Bright Sirius (Advansta) y la señal se visualizó con un analizador (VersaDoc, Bio-Rad).

Los resultados fueron expresados como ratios iNOS/actina o COX-2/actina en unidades densimétricas arbitrarias \pm error estándar.

Determinación de la concentración de proteínas totales

La cuantificación del contenido en proteínas de las muestras se realizó a partir de muestras de colon distal como las utilizadas previamente.

Estos fragmentos de colon fueron homogeneizados como en la técnica para la medición de la iNOS y la COX-2: fueron homogeneizadas en solución tampón de lisis fría (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,5 y Triton X-100 al 1%) complementado con un inhibidor de proteasas EDTA-free® (Roche) para evitar su degradación. Estos homogeneizados se centrifugaron a 15.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico o BCA (Pierce (Thermo-Fisher)).

En el método BCA las proteínas presentes en los sobrenadantes se unen al ión Cu^{2+} , el cual se reduce a Cu^+ en un medio alcalino. Una vez reducido, BCA, crea un complejo con el Cu^+ de un fuerte color púrpura (reacción de Biuret). La absorbancia de este producto (medida a 562 nm) es mayor en función de la cantidad de proteínas presentes²²⁻²⁴. Los datos fueron expresados en mg de proteínas totales.

Determinación de la expresión de proteínas de unión estrecha

Para comprobar el efecto protector del TR sobre el daño producido por la colitis en la barrera intestinal, se analizó la expresión de las proteínas de unión estrecha, principales encargadas del mantenimiento de su estructura. En concreto, se visualizó la zonula occludens-1 (ZO-1). Para su detección y estudio de su distribución, se realizó una inmunofluorescencia, en la que se marcó dicha proteína con un complejo fluorescente y después se observó con un microscopio confocal.

Para esta técnica se utilizaron los cortes histológicos de colon proximal incluidos en parafina por el servicio de anatomía patológica del CIBA. En primer lugar, estas secciones fueron desparafinadas y rehidratadas mediante dos baños consecutivos de Histo-Clear® (National Diagnostics), concentraciones decrecientes de etanol (100°x2, 96°, 90° y 70°) y posteriormente lavados con agua destilada y TBS (solución salina tamponada con Tris; 65 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl). Los tejidos se trataron durante 30 minutos con borohidruro de sodio (NaBH_4 ; 1% peso/volumen) en TBS frío para reducir la posible autofluorescencia del tejido o sus fijadores. La unión inespecífica de los anticuerpos después utilizados fue bloqueada con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y Triton X100 al 0.5% en TBS, solución tampón de bloqueo, durante 30 minutos, renovando la disolución cada 10 minutos. A continuación, los portas se incubaron a 4 °C durante la noche con un anticuerpo anti-ZO-1 caprino (1:50, Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente, los cortes fueron lavados con solución tampón de bloqueo (durante 10 minutos por triplicado) e incubados con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra hecho en burro conjugado con el complejo fluorescente AlexaFluor 488 (1:2000, Molecular Probes). La incubación se llevó a cabo en oscuridad durante dos horas a temperatura ambiente. Tras este paso, se realizaron 3 lavados de 15 minutos en TBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. A continuación, los portaobjetos se montaron con Fluoromount-G (SouthernBiotech) que contenía 0.1% DAPI (Life Biotechnologies) y 0.4% de DraQ5

(BioStatus), los cuales marcaron el ADN. Finalmente, los cortes se visualizaron con un microscopio confocal (Olympus FV10) y fueron fotografiados utilizando el software visualizador Olympus FV10-ASW 3.0. Estas imágenes fueron posteriormente procesadas con el programa ImageJ para el montaje de las figuras.

Técnica de baño de órganos

Preparación del tejido

La extracción de los segmentos de intestino se realizó siguiendo los pasos indicados en el estudio de miografía del canal KCa3.1. En este protocolo, se recogieron segmentos de íleon terminal de ratón de 1 cm de largo (tomados en la porción adyacente al ciego). La tensión establecida para el íleon de ratón fue de ≈ 5 mN.

Protocolo de valoración del efecto protector del extracto de TR

Para evaluar el posible efecto protector del TR sobre las alteraciones contráctiles del intestino inducidas por el DSS, se registró y evaluó la motilidad basal del íleon de cada grupo de animales. En primer lugar, se valoró la amplitud, la frecuencia y el coeficiente de variación de las contracciones espontáneas. Estos valores fueron normalizados al control, considerando este como el 100%, expresando los datos del resto de grupos como el porcentaje respecto a este.

El coeficiente de variación fue calculado para valorar la irregularidad de las contracciones a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de Variación: } \frac{\text{Desviación Estándar}}{\text{Media amplitud contracciones}}$$

Además, se evaluó la respuesta motora inducida por la ACh (10^{-4} M). Para ello, se calculó el área bajo la curva de los tres minutos de respuesta a la ACh y se expresó como porcentaje respecto a la registrada los tres minutos previos a su adición, tomados como control. La respuesta motora fue normalizada por el peso húmedo de cada preparación.

Cada protocolo experimental fue realizado sistemáticamente en un segmento de íleon por ratón y repetido en 4-10 animales.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el mismo software que en los estudios anteriores. Para analizar las diferencias entre grupos se utilizó el ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey cuando se observó una distribución paramétrica, el test de Kruskal-Wallis cuando la distribución no fue paramétrica o, en caso de las comparaciones entre dos grupos, la prueba de t-student, aplicando la corrección de Welch para los resultados paramétricos o el test de Mann-Whitney para los no paramétricos. Los resultados se consideraron significativos para valores de $p \leq 0.05$.

3.5. REFERENCIAS

1. Si H, Heyken W-T, Wölfle SE, et al. Impaired Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Dilations and Increased Blood Pressure in Mice Deficient of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel. *Circ Res.* 2006;99(5):537-544. doi:10.1161/01.RES.0000238377.08219.0c
2. Sevelsted Møller L, Fiella AD, Schierwagen R, et al. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 is an important modulator of hepatic injury. *Sci Rep.* 2016;6:28770. doi:10.1038/srep28770
3. Valero MS, Oliván-Viguera A, Garrido I, et al. Rock Tea extract (*Jasonia glutinosa*) relaxes rat aortic smooth muscle by inhibition of L-type Ca²⁺ channels. *J Physiol Biochem.* 2015;71(4):785-793. doi:10.1007/s13105-015-0442-8
4. Whittem CG, Williams AD, Williams CS. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp.* 2010;(35):e1652. doi:10.3791/1652
5. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol.* 1992;27(7):529-537. doi:10.3109/00365529209000116
6. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1995;109(4):1344-1367. doi:10.1016/0016-5085(95)90599-5
7. Kim K-MM, Kim Y-SYYS, Lim JY, et al. Sasa quelpaertensis leaf extract suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the proinflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Nutr Res.* 2014;34(10):894-905. doi:10.1016/j.nutres.2014.09.002
8. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:135625. doi:10.1155/2008/135625
9. Khan A, Alsahli M, Rahmani A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci.* 2018;6(2):33. doi:10.3390/medsci6020033
10. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-1390. doi:10.1038/nm.2514
11. Wilhelm DL. Mechanisms responsible for increased vascular permeability in acute inflammation. *Agents Actions.* 1973;3(5):297-306. doi:10.1007/bf01986484
12. Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train.* 2006;41(4):457-465. doi:10.1016/s0162-0908(08)79217-1
13. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2012;23(4):446-457. doi:10.1016/s0716-8640(12)70335-8
14. Vainer N, Dehlendorff C, Johansen JS. Systematic literature review of IL-6 as a

- biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(51):29820-29841. doi:10.18632/oncotarget.25661
15. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: Insight into diagnosis, prognosis and treatment. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2017;10(3):155-167. doi:10.22037/ghfbb.v0i0.1163
 16. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(1):683-765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
 17. Girndt M. Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10. *Blood Purif*. 2002;20(5):485-488. doi:10.1159/000063553
 18. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol*. 2004;143(7):908-918. doi:10.1038/sj.bjp.0705941
 19. Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: Controversies in inflammatory bowel disease. *J Investig Med*. 2002;50(4):272-283. doi:10.2310/6650.2002.33281
 20. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/561459
 21. Barrios-Rodiles M, Chadee K. Novel Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production by IFN- γ in Human Macrophages. *J Immunol*. 1998;161(5):2441-2448. <http://www.jimmunol.org/content/161/5/2441.abstract>.
 22. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:5-8. doi:10.1385/1-59259-169-8:11
 23. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
 24. Olson BJSC, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc protein Sci*. 2007;Chapter 3:Unit 3.4. doi:10.1002/0471140864.ps0304s48

4. RESULTADOS

4.1 CANAL KCa3.1 EN EL APARATO DIGESTIVO

Los resultados de este estudio forman parte de la **primera publicación** adjunta en esta tesis doctoral. Se analizó la función del canal KCa3.1 en un modelo murino *in vivo*, con dos cepas modificadas genéticamente para permitir la modulación de la expresión del canal KCa3.1. El tratamiento con doxiciclina durante dos semanas (+DOX) produjo una sobreexpresión en el caso de la primera cepa, los animales **KCa3.1+**, o generó una mRNA/proteína disfuncional en la segunda cepa, los animales **KCa3.1-**. Los animales de ambas cepas que no recibieron doxiciclina (-DOX) mostraron una expresión fisiológica.

Los **animales KCa3.1+** tratados con doxiciclina (+DOX) expresaron un fenotipo caracterizado por un engrosamiento de la piel (hiperqueratosis) y lesiones cutáneas¹. En cuanto a los patrones de alimentación, aumentaron su ingesta de agua hasta un 60% durante la segunda semana del tratamiento respecto a los ratones control (-DOX), pero no mostraron diferencias significativas en la cantidad de comida ingerida (**tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Consumo de agua y comida de ratones KCa3.1+ tratados (+DOX) y no tratados (-DOX) con doxiciclina. Datos expresados como la media \pm error estándar (EE), $n = 11-33$. *** $p < 0,001$.

KCa3.1 +	(- DOX) <i>media \pm EE</i>	(+ DOX) <i>media \pm EE</i>
Comportamiento		
<i>Ingesta de agua 1ª semana (mL/día)</i>	4,7 \pm 0,3	4,1 \pm 0,4
<i>Ingesta de agua 2ª semana (mL/día)</i>	4,2 \pm 0,3	6,8 \pm 0,6 ^{***}
<i>Ingesta de comida (g/día)</i>	1,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2

Después de dos semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron y se realizó un estudio para observar los posibles cambios anatómicos y/o funcionales en el sistema digestivo que la sobreexpresión del canal pudiera haber provocado.

El examen anatómico del sistema digestivo mostró diferencias en cuanto al peso en algunos órganos en los animales +DOX respecto a sus ratones control, -DOX. Como puede verse en la **tabla 4.2**, los animales KCa3.1+ con sobreexpresión del canal presentaron un incremento significativo en el peso del paquete gastrointestinal, del intestino delgado y del ciego, sin encontrarse diferencias significativas en el resto de las vísceras.

Tabla 4.2. Peso de los órganos del sistema gastrointestinal, normalizado al peso corporal y expresado como porcentaje ((g órgano/g peso corporal) x100). Datos expresados como la media ± error estándar (EE), n = 10-12. * p<0,05, *** p<0,001.

KCa3.1 +	(- DOX) media ± EE	(+ DOX) media ± EE
Organografía		
Paquete gastrointestinal (g/g PV)	12,7 ± 0,6	17,5 ± 1,8*
Estómago (g/g PV)	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3
Intestino delgado (g/g PV)	6,5 ± 0,4	10,4 ± 1,2*
Ciego (g/g PV)	1,6 ± 0,1	4,9 ± 0,6***
Colon (g/g PV)	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1

Al analizar el contenido de los órganos, en el intestino delgado de los animales +DOX se encontró un volumen de quilo $2,16 \pm 0,23$ veces superior al de los animales control (**figura 4.1A**).

En cuanto al contenido del colon, los animales +DOX presentaron una mayor cantidad, cuantificando una media de 140 ± 11 mg por ratón, en comparación con los 97 ± 10 mg recogidos en los animales control (**figura 4.1B**). Pese a esta diferencia significativa, las heces no presentaron cambios en cuanto a la forma, el tamaño o la cantidad de agua ($\approx 71 \pm 1\%$) (**figura 4.1C**).

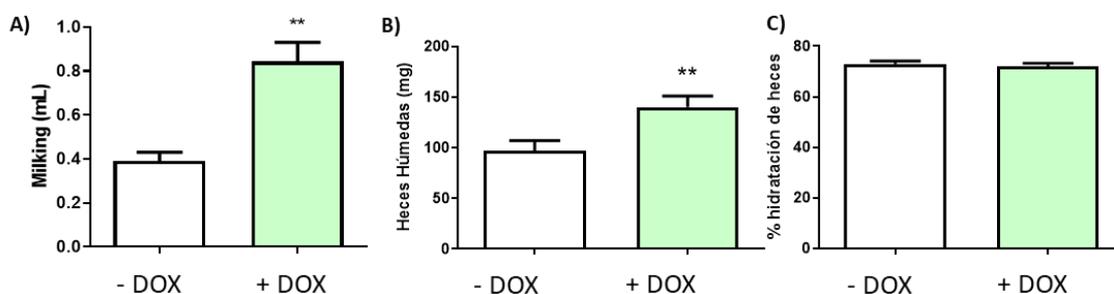


Figura 4.1. Análisis del contenido intestinal. (A) Volumen de quilo. (B) Peso de heces húmedas. (C) Contenido de agua de las heces, expresado como % del peso. Datos expresados como la media ± error estándar, n = 3-8. * p<0,05, ** p<0,01.

En base a estas diferencias en el contenido intestinal, se realizó un análisis de la composición de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- en las muestras de quimo (**figura 4.2A**) y heces (**figura 4.2B**). Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los ratones +DOX y los animales control -DOX.

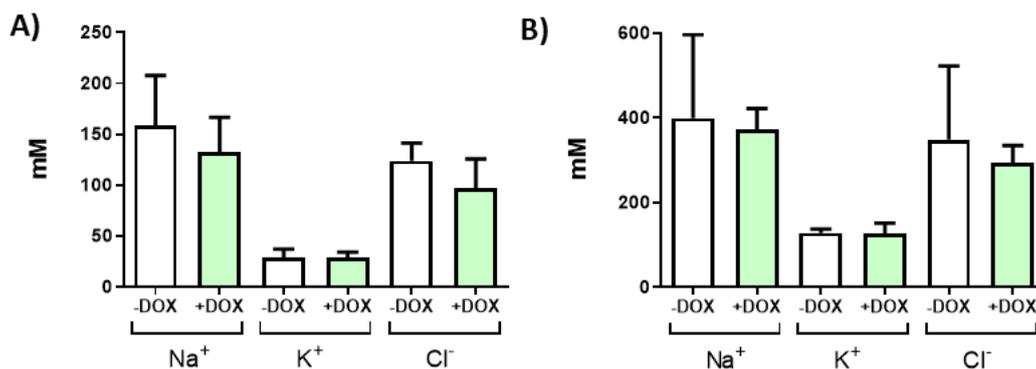


Figura 4.2. Análisis del contenido electrolítico del contenido intestinal de ratones -DOX y +DOX: concentraciones de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en: (A) quimo intestinal, (B) heces deshidratadas. Los datos están expresados como la media \pm error estándar, $n = 3-8$.

La acumulación de quilo en el intestino delgado produjo una distensión de la pared intestinal, la cual se observó al realizar un análisis microscópico de los cortes histológicos del duodeno. En ellos se encontró un aumento significativo en el área del lumen (**figura 4.3A**), registrando en los animales +DOX un área 3,5 veces mayor respecto a los animales control (-DOX) (**figura 4.3B**).



Figura 4.3. Estudio de los cortes histológicos del duodeno en los animales KCa3.1+. (A) Fotos de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. (B) Área del lumen intestinal. Datos expresados como la media \pm error estándar. $n=6-15$. ** $p < 0,01$.

Se realizaron medidas del grosor de la capa muscular circular y longitudinal para comprobar si la dilatación del duodeno había provocado cambios en ellas. Como se puede observar en la **figura 4.4**, no se encontraron diferencias significativas en el grosor de las dos capas entre los grupos +DOX y -DOX.

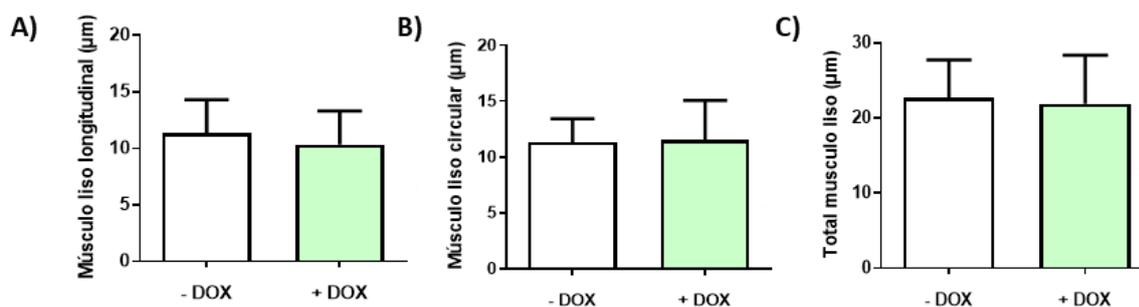


Figura 4.4. Análisis del grosor de las capas musculares lisas del duodeno. (A) Grosor de la capa muscular lisa longitudinal. (B) Grosor de la capa muscular lisa circular. (C) Suma del grosor de las capas musculares lisas circular y longitudinal. Datos expresados como la media \pm error estándar. $n=10-15$.

El aumento del contenido intestinal encontrado sugería cambios en la motilidad en los animales KCa3.1+ tratados con doxiciclina. Para valorar esta posibilidad, se realizó un estudio de miografía en duodeno y colon, el cual, como se va a detallar a continuación, reveló diferencias significativas en la contractibilidad intestinal entre ambos grupos.

La **figura 4.5A** muestra registros representativos de la motilidad basal del duodeno de los animales -DOX y +DOX. Como puede observarse, las contracciones espontáneas del duodeno de los animales +DOX presentaron una menor frecuencia que los animales -DOX, sin haber modificaciones en cuanto a la amplitud de las ondas (**figura 4.5B**). Para comprobar si este efecto era producido por un efecto directo de la sobreexpresión del canal KCa3.1, este se bloqueó de manera selectiva con TRAM-34 (10^{-6} M). Como se aprecia en la **figura 4.5C**, este antagonista no produjo cambios significativos ni en la frecuencia ni en la amplitud de las contracciones espontáneas en ninguno de los dos grupos (-DOX y +DOX).

Para valorar posibles alteraciones en la respuesta contráctil del duodeno, se adicionó acetilcolina (10^{-4} M). Al comparar las respuestas producidas, tampoco se observaron cambios significativos entre los animales +DOX y -DOX (**figura 4.5D**).

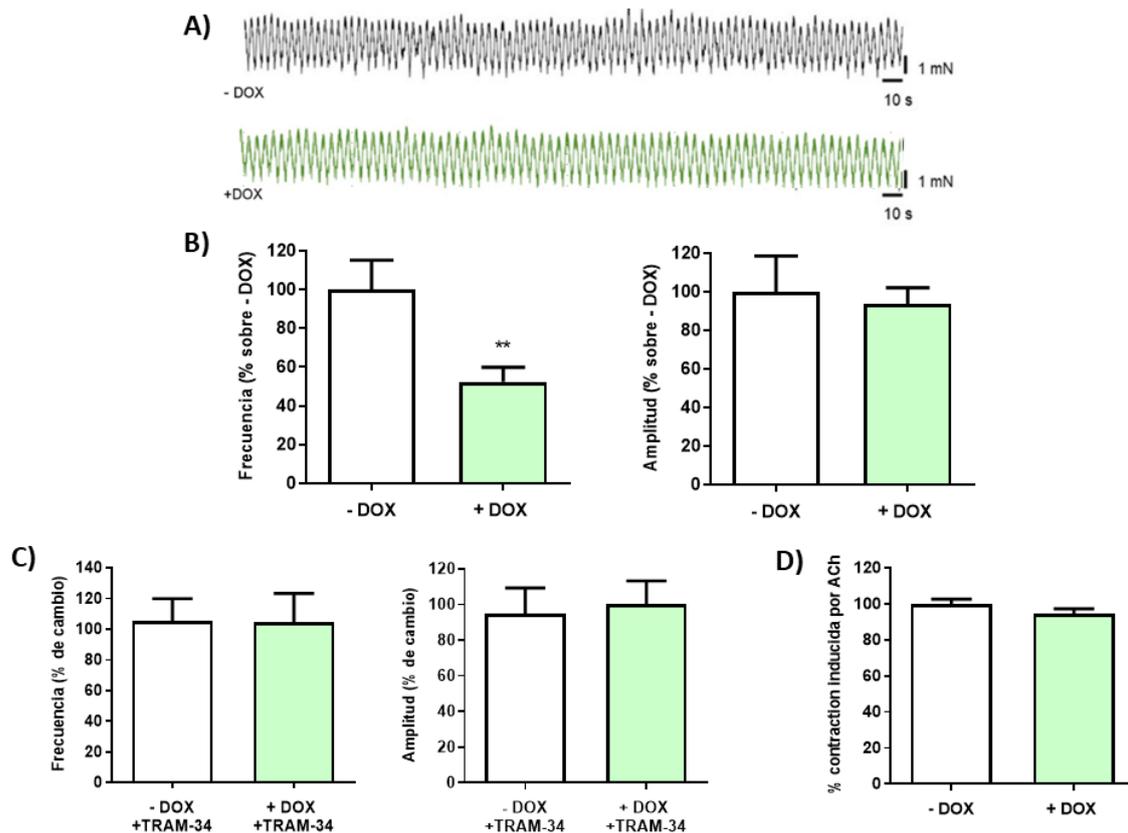


Figura 4.5. Impacto de la inducción del transgén *KCa3.1* en la contractibilidad duodenal de ratones *KCa3.1+*, comparando ratones -DOX con +DOX. **(A)** Registro de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal. **(B)** Frecuencia y amplitud de las contracciones espontáneas de la motilidad basal. **(C)** Efecto del TRAM-34 (10⁻⁶ M) en la frecuencia y amplitud en las contracciones espontáneas, expresado como % respecto a la motilidad basal. **(D)** Respuesta contráctil a la adición de ACh (10⁻⁴ M), expresada como % de respuesta respecto a su control. Datos expresados como la media \pm error estándar; $n = 12-16$. ** $p < 0,01$.

En cuanto al colon, al comparar los registros de la motilidad basal del colon medio de los animales -DOX y +DOX (**figura 4.6A**), se encontró que los ratones con sobreexpresión del canal presentaban unas contracciones espontáneas menos sincronizadas, con una menor frecuencia y una mayor amplitud (**figura 4.6B**).

Al igual que en el duodeno, se bloqueó el canal *KCa3.1* con TRAM-34 para estudiar la posible relación directa de su sobreexpresión en la motilidad basal, sin encontrarse cambios significativos en la frecuencia ni en la amplitud de las contracciones espontáneas (**figura 4.6C**).

La adición de ACh (10^{-4} M) tampoco mostró diferencias significativas en la respuesta contráctil de la musculatura lisa del colon entre los grupos +DOX y -DOX (**figura 4.6D**), mostrando un similar funcionamiento de la musculatura lisa.

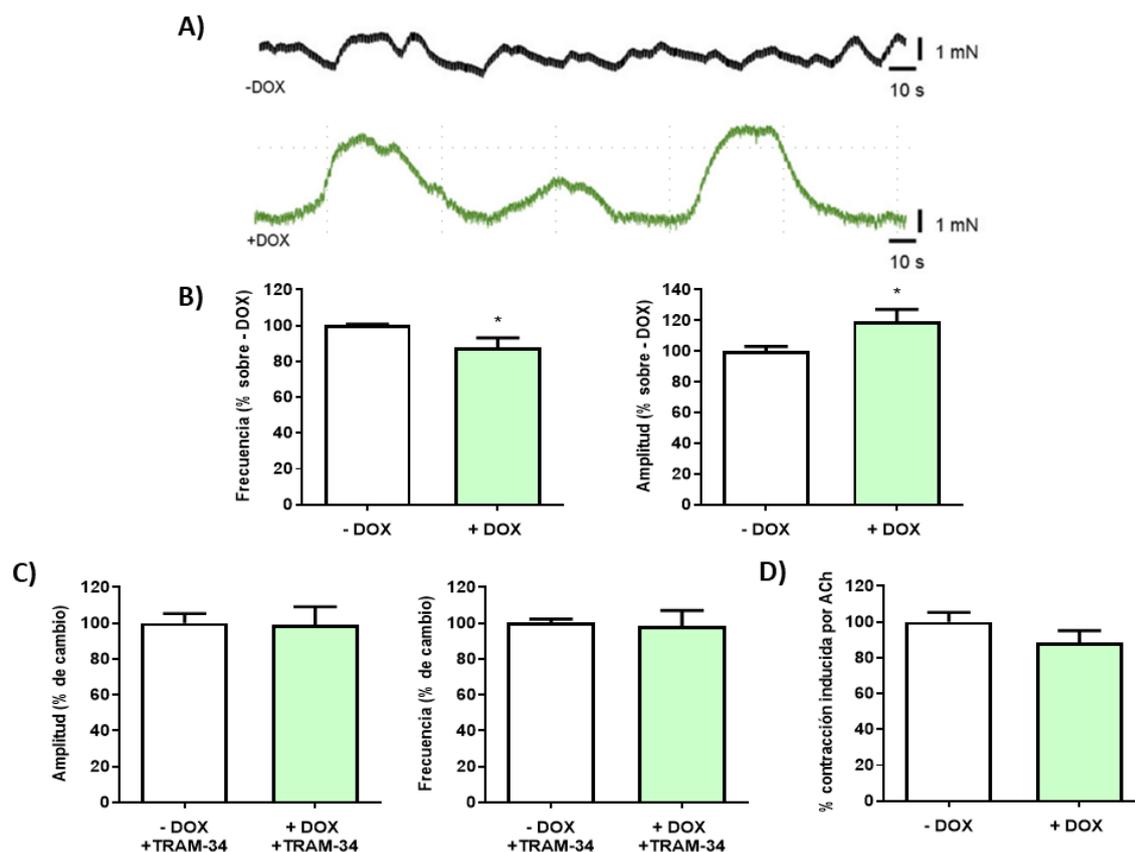


Figura 4.6. Efecto de la inducción del transgén *KCa3.1* en la contractibilidad colónica de ratones *KCa3.1+*, comparando ratones -DOX con +DOX. **(A)** Registros representativos de las contracciones espontáneas en la musculatura lisa longitudinal. **(B)** Frecuencia y amplitud de las contracciones espontáneas. **(C)** Efecto del TRAM-34 (10^{-6} M) en la frecuencia y amplitud en las contracciones espontáneas, expresado como % respecto a la motilidad basal. **(E)** Respuesta contráctil a la ACh (10^{-4} M), normalizada a la respuesta de su control. Datos expresados como la media \pm error estándar; $n = 12-16$. * $p < 0,05$.

Con el objetivo de comprobar si se podía prevenir el fenotipo generado por la sobreexpresión del canal, se bloqueó farmacológicamente el canal *in vivo* mediante la administración de Senicapoc® en el pienso (30 mg/kg/día)²⁻⁴, un bloqueador específico del canal. Los resultados obtenidos en este grupo de ratones se compararon con un grupo control con una expresión fisiológica del canal. La **tabla 4.3** recoge la comparativa realizada entre ambos grupos, expresando los datos del grupo tratado con Senicapoc® normalizados como el porcentaje respecto al control, considerado el 100%. El bloqueo de la inducción del canal previno los cambios fenotípicos mostrados previamente, incluyendo las diferencias en la ingesta de agua, la variación en el peso del intestino delgado, del ciego y las alteraciones de la capacidad contráctil del duodeno y del colon.

Tabla 4.3. Resultado del bloqueo *in vivo* del canal KCa3.1 con el tratamiento con Senicapoc (30 mg/kg/día). Datos normalizados al control (-DOX), considerado el 100%, expresados como la media \pm error estándar, $n = 4-6$.

KCa3.1 + (Datos normalizados al control - DOX)	(+ DOX) (+ Senicapoc) media \pm EE	<i>p</i> vs. - DOX
Comportamiento		
<i>Ingesta de agua 1ª semana</i>	79 \pm 27	ns
<i>Ingesta de agua 2ª semana</i>	98 \pm 17	ns
<i>Ingesta de comida</i>	147 \pm 22	ns
Organografía		
<i>Paquete gastrointestinal</i>	121 \pm 9	ns
<i>Estómago</i>	129 \pm 17	ns
<i>Intestino delgado</i>	123 \pm 17	ns
<i>Ciego</i>	125 \pm 12	ns
<i>Colon</i>	100 \pm 20	ns
<i>Quimo (contenido del ID)</i>	74 \pm 9	ns
<i>Área del lumen del ID</i>	105 \pm 30	ns
Contractibilidad Duodenal		
<i>Frecuencia</i>	102 \pm 23	ns
<i>Amplitud</i>	90 \pm 13	ns
Contractibilidad Colónica		
<i>Frecuencia</i>	96 \pm 4	ns
<i>Amplitud</i>	105 \pm 3	ns

Siguiendo la misma metodología que en los ensayos anteriores, se evaluó el posible fenotipo mostrado por los **ratones KCa3.1-**. Estos ratones presentaron una delección subcrónica del canal durante las dos semanas de administración de doxiciclina, no mostrando además cambios fenotípicos producidos por la supresión del canal KCa3.1 en el epitelio intestinal. Al compararlos con su control, estos animales no mostraron diferencias significativas en la ingesta de agua o de comida, en el contenido intestinal (quilo y heces), alteraciones en el peso de los órganos ni variaciones en la motilidad basal o capacidad contráctil (**tabla 4.4**).

Tabla 4.4. Efecto de la supresión a corto plazo del canal KCa3.1 en ratones KCa3.1- tratados +DOX vs ratones no tratados -DOX. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n = 8-15$.

KCa3.1 -	(- DOX) <i>medias \pm EE</i>	(+ DOX) <i>medias \pm EE</i>
Comportamiento		
<i>Ingesta de agua 1ª semana (mL/día)</i>	1,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1
<i>Ingesta de agua 2ª semana (mL/día)</i>	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
<i>Ingesta de comida (g/día)</i>	1,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2
Heces		
<i>Peso heces secas (mg)</i>	236 \pm 31	213 \pm 29
<i>Peso heces húmedas (mg)</i>	40,7 \pm 6,3	36,0 \pm 5,2
<i>Contenido hídrico (%)</i>	81,3 \pm 0,5	81,5 \pm 1,3
Organografía		
<i>Paquete gastrointestinal (g/g PC)</i>	19,8 \pm 1,0	21,8 \pm 0,3
<i>Estómago (g/g PC)</i>	1,8 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
<i>Intestino delgado (g/g PC)</i>	6,3 \pm 0,3	7,2 \pm 0,4
<i>Ciego (g/g PC)</i>	2,6 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2
<i>Colon (g/g PC)</i>	1,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
<i>Quimo (contenido del ID) (mL)</i>	0,3 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0
<i>Área del lumen del ID (mm²)</i>	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
Contractibilidad Duodenal		
<i>Frecuencia (% de -DOX)</i>	100 \pm 2	99 \pm 2
<i>Amplitud (% de -DOX)</i>	100 \pm 16	99 \pm 13
<i>Frecuencia (% cambio tras TRAM-34)</i>	103 \pm 1	100 \pm 3
<i>Amplitud (% cambio tras TRAM-34)</i>	99 \pm 18	98 \pm 24
Contractibilidad Colónica		
<i>Frecuencia (% de -DOX)</i>	100 \pm 6	116 \pm 7
<i>Amplitud (% de -DOX)</i>	100 \pm 17	96 \pm 19
<i>Frecuencia (% cambio tras TRAM-34)</i>	99 \pm 4	98 \pm 4
<i>Amplitud (% cambio tras TRAM-34)</i>	105 \pm 20	96 \pm 12

EE: error estándar, PC: peso corporal, ID: intestino delgado

4.2 ESTUDIO 2: EFECTO DEL TÉ DE ROCA SOBRE LA MUSCULATURA LISA INTESTINAL

En el primer estudio sobre *Jasonia glutinosa* (L.) DC. realizado en esta tesis doctoral se evaluó el efecto de un extracto etanólico sobre la contractibilidad de la musculatura lisa longitudinal del duodeno y el mecanismo de acción por el cual lo realiza. Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* de miografía en duodeno de rata. Los resultados de este estudio forman parte de la **segunda publicación** adjuntada en esta tesis doctoral.

La **figura 4.7** muestra el registro de la motilidad espontánea de segmentos aislados de duodeno frente a la adición de agua milliQ (**figura 4.7A**), vehículo del extracto utilizado como control, y de concentraciones crecientes de extracto de té de roca (TR) (**figura 4.7B**) y de verapamilo, un antagonista de los canales de calcio tipo L (**figura 4.7C**). Como se observa, el extracto de TR mostró una actividad relajante, de manera dosis dependiente, sobre las contracciones espontáneas de la musculatura lisa duodenal, de manera similar al verapamilo. La CI_{50} del extracto de TR fue de 2,29 mg/ml (IC 2,5-2), mientras que el verapamilo obtuvo una CI_{50} de 0,16 μ M (IC 0,22-0,19).

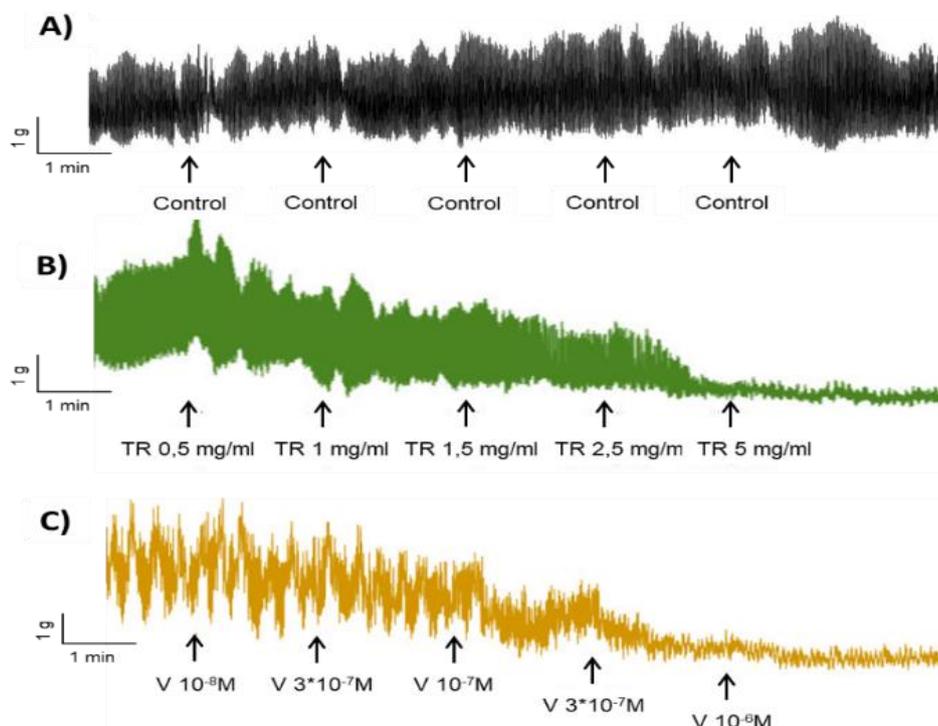


Figura 4.7. Registro de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal de duodeno de rata frente a la adición de (A) agua milliQ, (B) extracto de té de roca y (C) verapamilo, a diferentes concentraciones, $n = 5-6$.

La relajación de la musculatura lisa provocada, tanto por el extracto de TR como por el verapamilo, fue debida a una disminución significativa de la amplitud de las contracciones espontáneas, sin afectar a la frecuencia (**tabla 4.5**).

Tabla 4.5. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de extracto de té de roca (TR) y verapamilo (V) sobre la amplitud y frecuencia de las contracciones espontáneas de la motilidad basal del duodeno de rata. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n=5-6$. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ respecto al control.

	Amplitud media \pm EE	Frecuencia media \pm EE		Amplitud media \pm EE	Frecuencia media \pm EE
Control	102,0 \pm 0,2	100,4 \pm 4,6	Control	101,0 \pm 0,5	100,0 \pm 0,7
TR 0,5 mg/ml	88,4 \pm 5,3	104,2 \pm 5,6	V 10^{-8} M	99,5 \pm 1,9	97,9 \pm 2,3
TR 1 mg/ml	81,9 \pm 2,7	105,6 \pm 3,3	V 3×10^{-7} M	88,7 \pm 3,7	95,7 \pm 4,6
TR 1,5 mg/ml	74,8 \pm 5,2**	107,2 \pm 7,8	V 10^{-7} M	66,3 \pm 7,5***	95,4 \pm 4,8
TR 2,5 mg/ml	47,6 \pm 6,6***	104,6 \pm 6,5	V 3×10^{-6} M	39,6 \pm 4,1***	94,1 \pm 2,0
TR 5 mg/ml	25,1 \pm 5,0***	105,1 \pm 7,1	V 10^{-6} M	30,5 \pm 2,5***	93,4 \pm 2,3

EE: error estándar

Tras comprobar el efecto sobre la motilidad basal, se analizó el efecto del extracto de TR sobre segmentos de duodeno previamente contraídos con KCl (80 mM). Como recoge la **tabla 4.6**, tanto el extracto de TR como el verapamilo produjeron una relajación dosis dependiente de la musculatura lisa longitudinal, con una CI_{50} de 0,87 mg/ml (IC 0,9-0,8) y 0,03 μ M (IC 0,04-0,02) respectivamente.

Tabla 4.6. Efecto relajante de las diferentes concentraciones de extracto de té de roca (TR) y verapamilo (V) sobre segmentos aislados de duodeno de rata previamente contraídos por KCl (80 mM). Datos expresados como la media \pm error estándar, $n=5-6$. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ respecto al control.

	% de contracción media \pm EE		% de contracción media \pm EE
Control	103,0 \pm 0,2	Control	100,5 \pm 0,3
TR 0,5 mg/ml	68,1 \pm 3,7***	V 10^{-8} M	76,8 \pm 6,9**
TR 1 mg/ml	44,4 \pm 4,5***	V 3×10^{-7} M	45,6 \pm 7,6***
TR 1,5 mg/ml	30,9 \pm 3,0***	V 10^{-7} M	22,7 \pm 3,5***
TR 2,5 mg/ml	18,0 \pm 3,9***	V 3×10^{-6} M	11,7 \pm 2,9***
TR 5 mg/ml	3,3 \pm 1,7***	V 10^{-6} M	5,1 \pm 2,2***

Para estudiar el efecto del extracto de TR sobre la entrada de calcio a la célula, se registró la actividad contráctil de los segmentos de duodeno frente a la adición de concentraciones crecientes de CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2} M), en un medio sin calcio. La **figura 4.8** muestra el registro de las contracciones producidas por los segmentos de duodeno del grupo control, preincubados con agua milliQ, el solvente del extracto de TR. La preincubación del duodeno con extracto de TR a distintas concentraciones provocó un bloqueo dosis dependiente de la respuesta generada por el CaCl_2 . El extracto de TR desplazó la curva de contracción hacia abajo y a la derecha e inhibió la máxima contracción producida por el CaCl_2 un $39,9 \pm 4\%$ y un $53,7 \pm 14\%$ a las concentraciones de 0,5 y 5 mg/ml respectivamente. Esta respuesta fue muy similar a la generada por el verapamilo, que desplazó la curva de contracción de la misma manera y bloqueó la respuesta del tejido a la máxima concentración de CaCl_2 un $62,7 \pm 6,7\%$, sugiriendo así un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} al citosol.

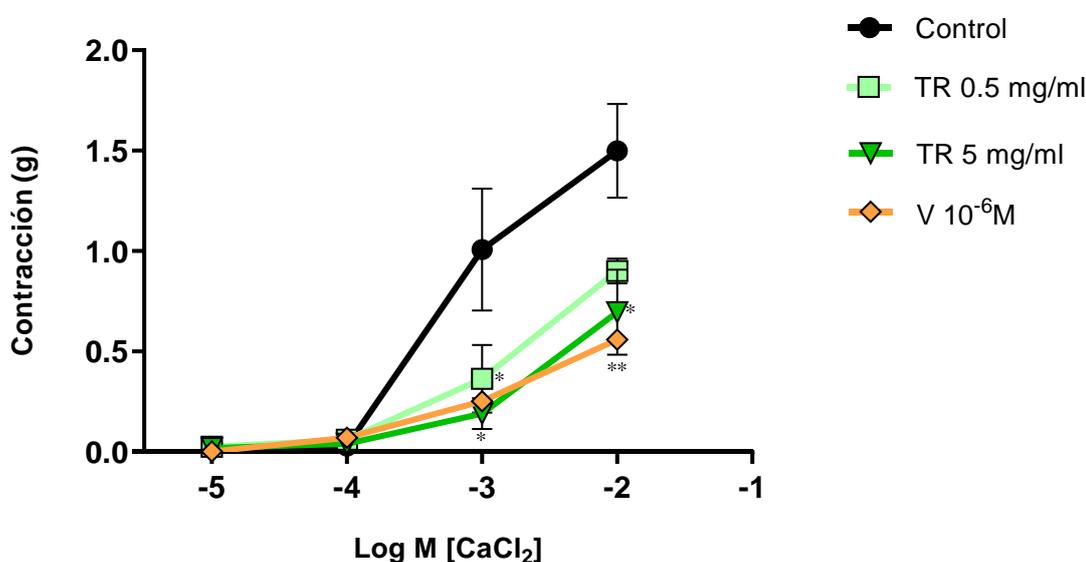


Figura 4.8. Contracción (expresada en gramos de tensión) producida a diferentes concentraciones de CaCl_2 en presencia del vehículo (control), del extracto de TR 0,5 y 5 mg/ml y del V 10^{-6} M en duodeno de rata. Datos expresados como la media \pm error estándar. $n=5-6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al control.

Para estudiar si el mecanismo de acción el extracto de TR era debido a un efecto antagonista sobre los canales de calcio tipo L, se estudió su efecto sobre un agonista específico de estos canales, el Bay-K8644. En los segmentos preincubados con el vehículo de nuestro extracto, utilizados como control, se puede observar como el Bay-K8644 (10^{-5} M) produjo una fuerte contracción de la musculatura lisa del duodeno, provocada por la apertura de estos canales de calcio (**figura 4.9A**). Dicha contracción fue reducida significativamente tanto por el extracto de TR como por el verapamilo. Al cuantificar la respuesta, el bloqueo producido por el extracto de TR a las concentraciones de 0,5 y 5 mg/ml fue de un $85,7 \pm 7,8\%$ y $94,4 \pm 1,7\%$ respectivamente, respecto a la registrada en el grupo control (**figura 4.9B**). El verapamilo (10^{-6} M), tuvo un comportamiento similar a la mayor concentración del extracto de TR, bloqueando la respuesta un $91,9 \pm 2,9\%$.

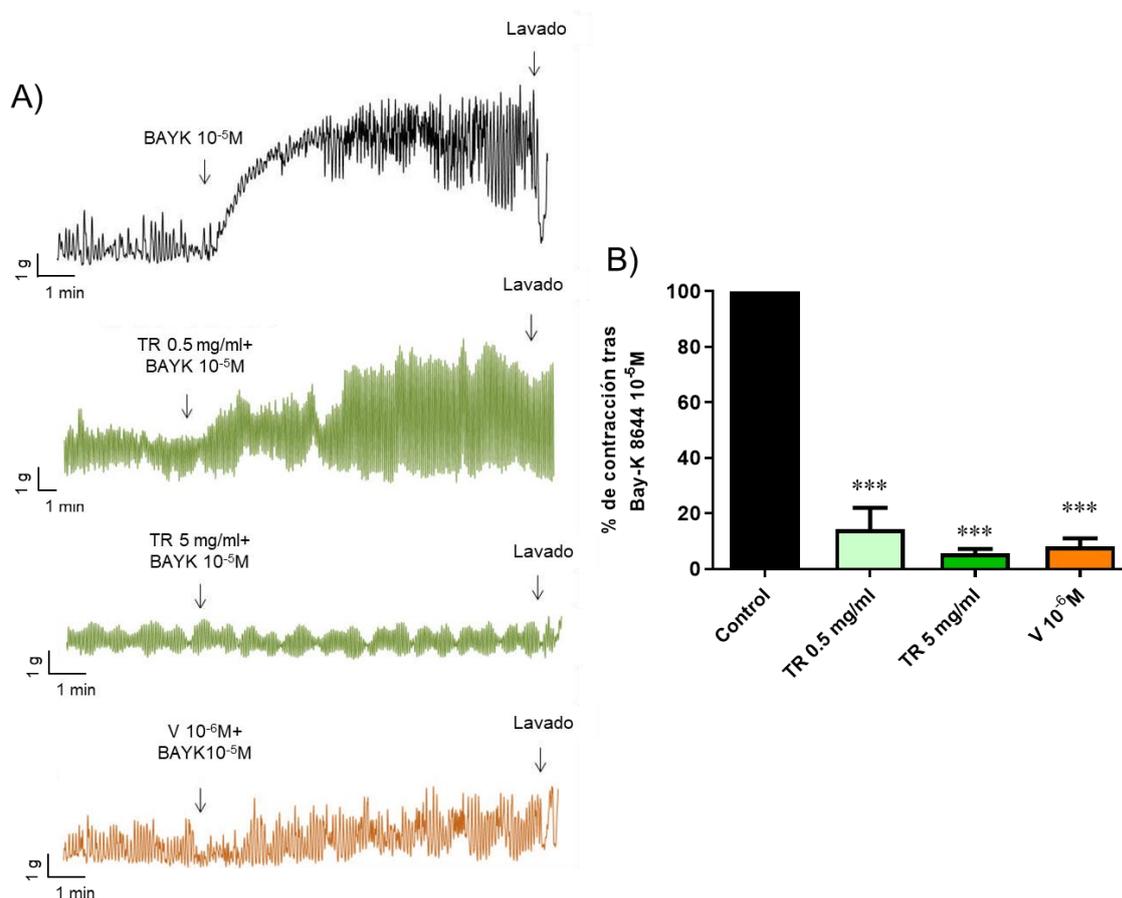


Figura 4.9. (A) Registros de las contracciones inducidas por Bay-K8644 frente a diferentes reactivos. (B) Efecto del extracto de té de roca (TR; 0,5 y 5 mg/ml) y verapamilo (V; 10^{-6} M) en la respuesta contráctil inducida por Bay-K8644 (10^{-5} M) respecto al control en segmentos de duodeno de rata. Datos expresados como la media \pm error estándar. $n=5-6$. *** $p<0,001$ respecto al control.

4.3 ESTUDIO 3: EFECTO PROTECTOR DEL TÉ DE ROCA EN UN MODELO DE COLITIS

Los resultados obtenidos en este apartado forman parte de la **tercera publicación** adjuntada en esta tesis doctoral.

En este estudio se completaron y ampliaron los resultados previamente mostrados por el extracto de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. sobre el aparato digestivo. Tras demostrar la capacidad espasmolítica, se evaluó el papel protector del extracto de TR en un modelo *in vivo* de lesión-reparación de colitis inducida por DSS.

Como se ha descrito en material y métodos, los animales fueron divididos en siete grupos en función de su tratamiento. Por un lado, se utilizaron dos grupos a los que no se les indujo colitis. A uno de ellos se le administró el vehículo, agua autoclavada, para usarlo de control y al otro se le administró extracto de TR a la máxima dosis, 50 mg/kg, para comprobar su posible efecto *per se*. Por otro lado, a los cinco grupos restantes se les indujo la colitis mediante la adición de DSS al agua de bebida. De estos cinco, a uno de ellos se le administró el vehículo del extracto de TR para utilizarlo como control del efecto del DSS. Tres de ellos fueron tratados con extracto de TR a tres concentraciones, 5, 25 y 50 mg/kg, para comprobar su efecto protector. El último de los grupos fue tratado con sulfasalazina (SSZ), 100 mg/kg, como antiinflamatorio control, para comparar el efecto del extracto de TR con un tratamiento de elección en una enfermedad inflamatoria intestinal.

Como era de esperar, la administración de DSS en el agua de bebida produjo en los ratones una sintomatología caracterizada por pérdida de peso, presencia de sangre en heces y pérdida de consistencia de estas respecto a los grupos control. Para cuantificar la evolución clínica de los animales se utilizó un score DAI, tal como se ha explicado en material y métodos.

Como puede verse en la **figura 4.10A**, ni el grupo control, ni el grupo tratado únicamente con extracto de TR mostraron ningún síntoma a lo largo del procedimiento (DAI = 0), descartando así alteraciones digestivas provocadas por la administración de TR a la máxima dosis utilizada (50 mg/kg).

En cuanto a los ratones colíticos, el grupo que no recibió ningún tipo de tratamiento comenzó a mostrar síntomas desde el día 1, siguiendo con un aumento progresivo de los síntomas especialmente fuertes a partir del día 4. Al retirar el DSS en la fase de recuperación (días 8-10), se redujo el avance de la enfermedad, mostrando una leve mejora el último día (día 10).

El tratamiento con extracto de TR por su parte, administrado por vía oral a diferentes dosis (5, 25 y 50 mg/kg), retrasó significativamente de manera dosis dependiente la aparición de los síntomas durante la fase de inducción. A partir del cuarto día, el tratamiento con TR no mantuvo este efecto protector, sin llegar a mostrar diferencias con los otros grupos. Sin embargo, en los últimos tres días durante la fase de recuperación, estos grupos tratados con TR mostraron una mejora de la clínica, de manera dosis dependiente, en comparación con los ratones que no habían recibido tratamiento.

Así como muestra la **figura 4.10B**, al comparar el efecto del TR (50 mg/kg) con la sulfasalazina (SSZ) (100 mg/kg), fármaco de referencia en el tratamiento de la colitis, esta también retrasó la aparición de síntomas hasta el cuarto día, aunque sin lograr una diferencia significativa con el grupo sin tratamiento. Durante la fase de recuperación, al contrario que el extracto de TR, la SSZ no produjo ninguna mejora clínica sobre los ratones, mostrando en el día 10 un estado clínico significativamente peor que el grupo tratado con TR. En términos generales, el tratamiento con extracto de TR a máxima dosis mostró una evolución de la sintomatología visiblemente mejor que el resto de los grupos con DSS.

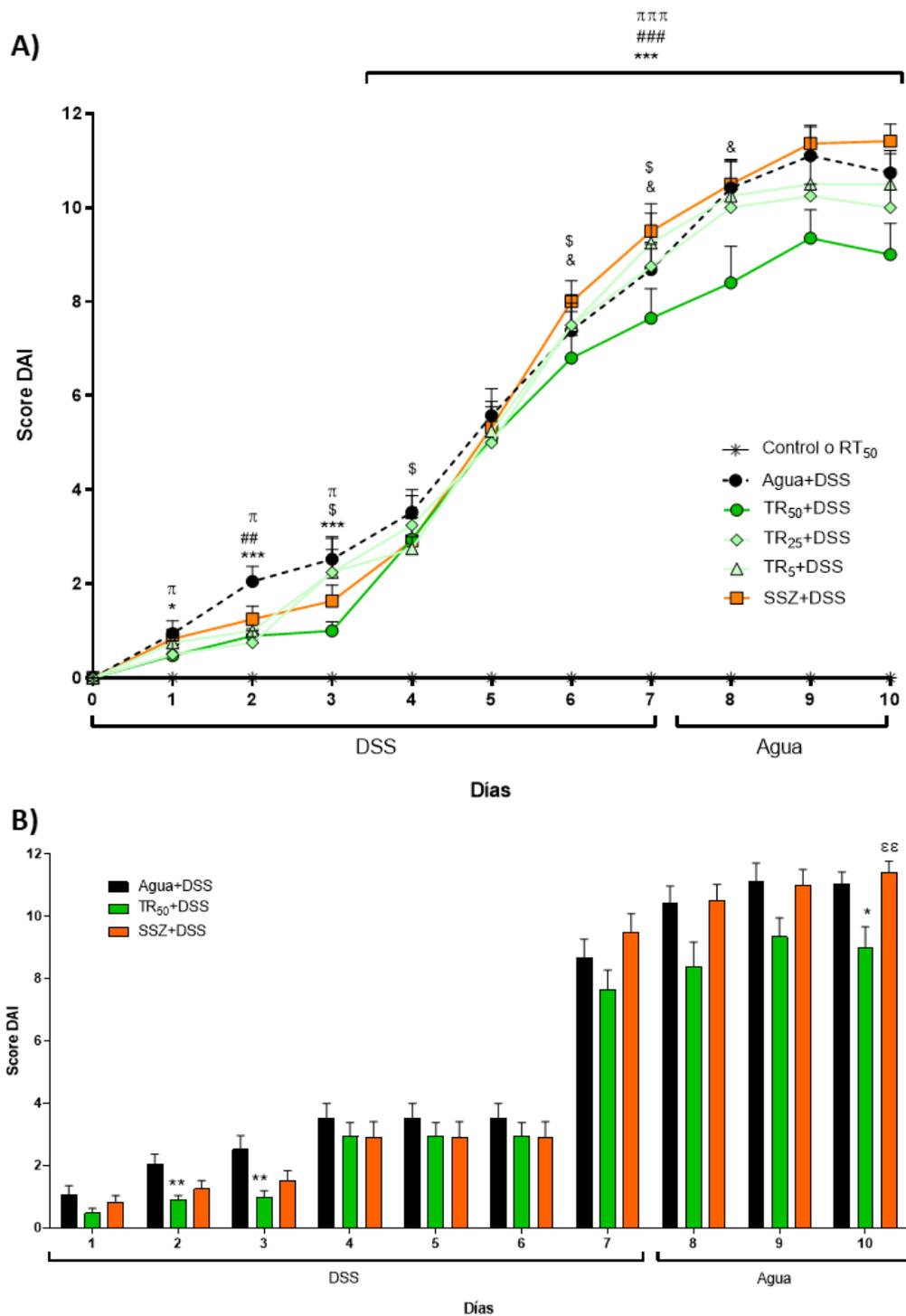


Figura 4.10. **(A)** Score DAI registrado durante los días de tratamiento con DSS 2,5% por los distintos grupos. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n=4-15$. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ grupo agua+DSS vs. grupos control y TR₅₀; & $p<0,05$ grupo TR₅+DSS vs grupos control y TR₅₀; \$ $p<0,05$ grupo TR₂₅+DSS vs grupos control y TR₅₀; ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ grupo TR₅₀+DSS vs grupos control y TR₅₀; π $p<0,05$, $\pi\pi\pi$ $p<0,001$ grupo SSZ+DSS vs. grupos control y TR₅₀. **(B)** Comparativa del efecto protector del extracto de TR 50 mg/kg vs SSZ. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n=8-15$. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ grupo TR₅₀+DSS vs. grupo agua+DSS; $\epsilon\epsilon$ $P<0,01$ TR₅₀ + DSS vs. grupo SSZ+DSS.

Tras el sacrificio, se hizo una valoración del grado de lesión macroscópica del colon. Se analizó la longitud, el grosor a nivel proximal y distal y se realizó un score de lesiones relativas a la mucosa colónica y a las adherencias del paquete intestinal.

Al medir la longitud del colon (**figura 4.11**), los ratones del grupo control obtuvieron una media de $71,7 \pm 1,93$ mm, bastante similar a los ratones sanos tratados con extracto de TR, cuya media fue $73,6 \pm 3$ mm. La administración de DSS produjo un acortamiento en todos los grupos, alcanzando en los ratones sin tratamiento una media de $47,2 \pm 1,6$ mm, estadísticamente significativa comparada con el grupo control. El tratamiento con extracto de TR revertió esta alteración de manera dosis dependiente, logrando para las dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, una longitud media de $52,4 \pm 3,7$, $57,8 \pm 2,2$ y $58,2 \pm 1,6$ mm respectivamente, siendo esta última estadísticamente significativa al compararla con los ratones con DSS sin tratamiento. Por su parte, el tratamiento con SSZ también mitigó el acortamiento, mostrando los ratones de ese grupo una media de $56 \pm 2,3$ mm, aunque sin llegar a ser esta diferencia significativa.

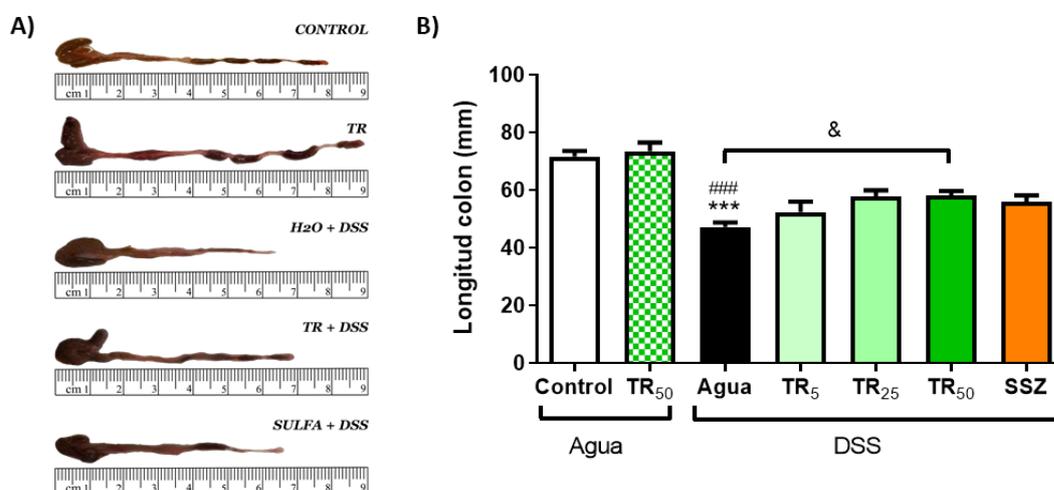


Figura 4.11. Comparativa de la longitud del colon entre los diferentes grupos. (A) Fotografías a escala de secciones de ciego y colon de los distintos grupos de animales. (B) Longitud del colon de los distintos grupos de tratamiento. Datos expresados como la media \pm error estándar ($n=4-15$). *** $p < 0,001$ vs. grupo control; ### $p < 0,001$ vs. grupo TR₅₀; & $p < 0,05$ vs. grupo agua+DSS.

En cuanto al grosor del colon (**figura 4.12**), el grupo control mostró una media de $0,25 \pm 0,04$ y $0,19 \pm 0,04$ cm en la zona proximal y distal respectivamente, frente a los $0,32 \pm 0,07$ y $0,18 \pm 0,01$ cm del grupo sano tratado con extracto de TR, no hallándose diferencias significativas entre ambos. Como se esperaba, el DSS produjo un engrosamiento significativo de ambos tramos, midiendo $0,56 \pm 0,05$ y $0,49 \pm 0,05$ cm de media en las zonas proximal y distal del grupo tratado con el vehículo. El tratamiento con extracto de TR mostró una tendencia a revertir el engrosamiento de manera dosis dependiente, aunque sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas. La SSZ, como fármaco control, mostró una mayor normalización del grosor de la pared, siendo estadísticamente significativa la producida en la pared proximal ($0,23 \pm 0,04$ frente a los $0,56 \pm 0,05$ cm del grupo no tratado $p < 0,01$).

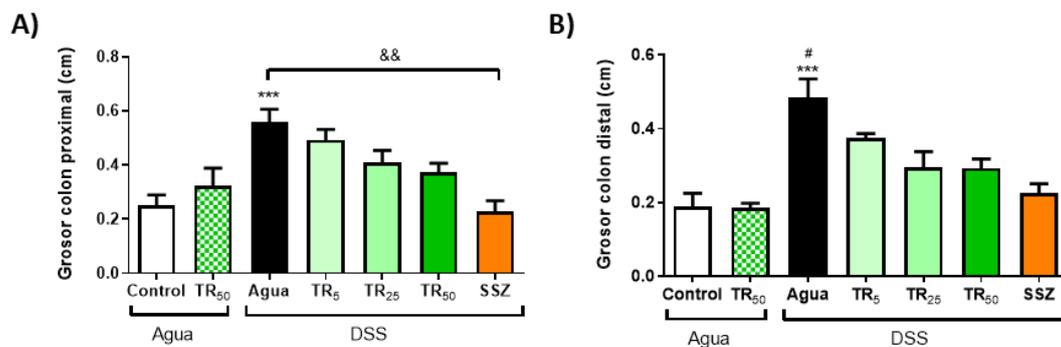


Figura 4.12. Comparativa del grosor de las paredes del colon entre grupos. (A) Zona proximal. (B) Zona distal. Datos expresados como la media \pm error estándar ($n=4-15$). *** $p < 0,001$ vs. grupo control; # $p < 0,05$ vs. grupo TR₅₀; && $p < 0,01$ vs. grupo agua+DSS.

En la evaluación de las lesiones macroscópicas del colon tampoco se encontraron diferencias entre los dos grupos sanos, mostrando ambos un valor muy cercano a 0 debido a la casi total ausencia de éstas. Como muestra la **figura 4.13**, el DSS produjo un aumento significativo del score macroscópico en los ratones, llegando a una media de $6,14 \pm 0,5$ puntos en los ratones que no recibieron tratamiento. El tratamiento con extracto de TR, de manera dosis dependiente, mostró una tendencia a revertirlo, consiguiendo evitar, a las dosis de 25 y 50 mg/kg, una diferencia significativa con los controles. La SSZ también redujo la aparición de lesiones, no mostrando tampoco diferencias significativas con los grupos control.

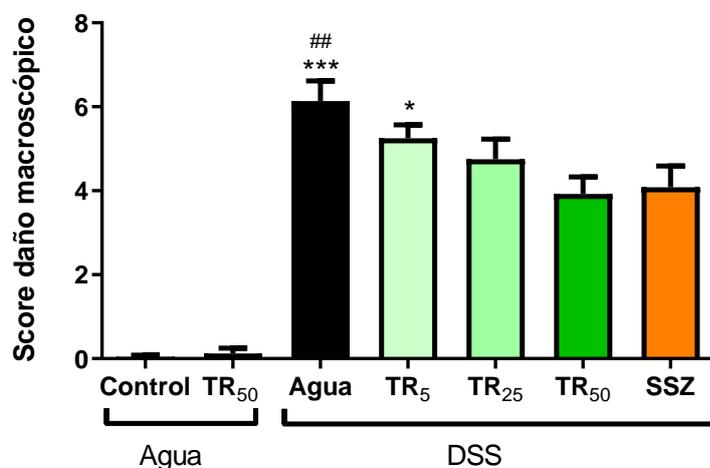


Figura 4.13. Score de daño macroscópico del daño tisular en el colon en los distintos grupos. Datos expresados como la media \pm error estándar ($n=4-15$). * $p<0,05$, *** $p<0,001$ vs. grupo control; ### $p<0,01$, vs. grupo TR₅₀.

Una vez evaluado el daño macroscópico producido por la colitis, se analizaron posibles alteraciones de la contractibilidad de la musculatura lisa del intestino a través de un ensayo de miografía en segmentos aislados del íleon terminal.

La **figura 4.14** muestra los registros de las contracciones espontáneas de los diferentes grupos de animales. El extracto de TR *per se* no alteró el patrón de motilidad, que fue semejante al control. La administración de DSS en cambio produjo en el íleon de los ratones unas contracciones visiblemente más irregulares que en el control, con una marcada reducción de la amplitud. Esta alteración fue revertida por el tratamiento con extracto de TR, de manera dosis dependiente, mostrando una normalización de las contracciones espontáneas.

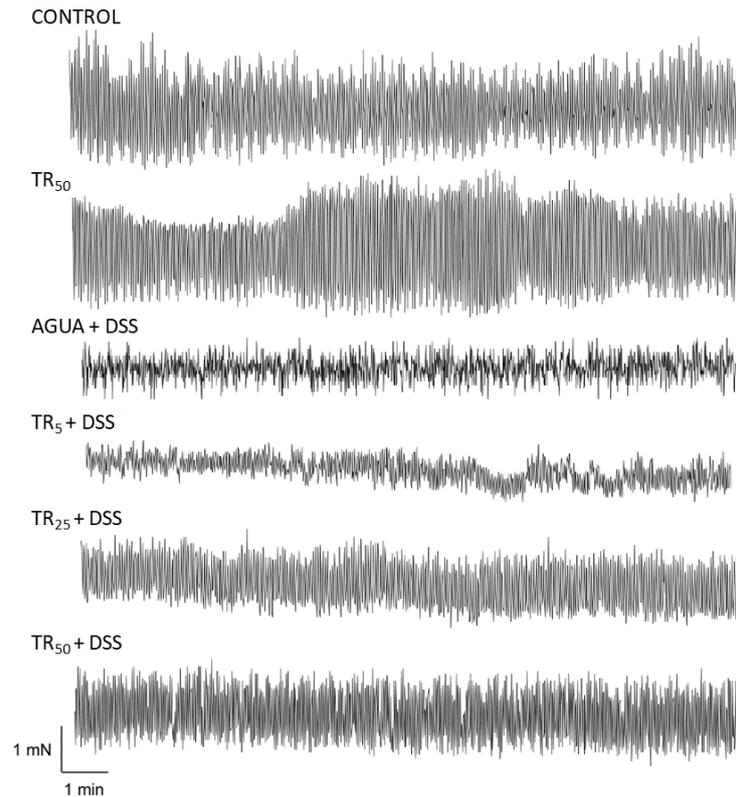


Figura 4.14. Registros representativos de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal de íleon de ratón de los diferentes grupos.

Al analizar los registros, se cuantificó la irregularidad de las contracciones espontáneas mediante el coeficiente de variación (**figura 4.15A**). Tanto el grupo control sin tratamiento como el grupo sano tratado con extracto de TR mostraron un coeficiente de variación muy reducido ($0,14 \pm 0,03$ y $0,1 \pm 0,01$ respectivamente), indicando así la poca variación entre la fuerza de sus contracciones espontáneas. Tal y como se ha indicado, el DSS produjo unas contracciones muy irregulares, elevando el coeficiente de variación entre ellas hasta $0,73 \pm 0,09$ en el grupo sin tratamiento. El extracto de TR normalizó de manera dosis dependiente las contracciones en los grupos que habían recibido DSS, obteniendo para las dosis de 5, 25 y 50 mg/kg un coeficiente de variación de $0,55 \pm 0,15$, $0,32 \pm 0,1$ y $0,22 \pm 0,06$ respectivamente, siendo significativa la mejora producida por la máxima dosis.

Además de alterar el coeficiente de variación, el DSS produjo una disminución significativa de un $48,8 \pm 7\%$ en la amplitud de las contracciones espontáneas de los segmentos de íleon (**figura 4.15B**) y una leve disminución de la frecuencia de estas (**figura**

4.15C), sin llegar esta a ser significativa. El tratamiento con extracto de TR normalizó de manera dosis dependiente ambos parámetros (**figura 4.15B**), de manera que la amplitud de los segmentos de los animales tratados a la dosis de 50 mg/kg no fue significativamente distinta a la de los controles ($92,5 \pm 7\%$ vs. 100%).

Para estudiar la capacidad del tejido para contraerse, se añadió el agonista colinérgico muscarínico ACh (**figura 4.15D**). Tomando la respuesta del control como el 100%, el grupo sano tratado con extracto de TR no mostró apenas diferencias respecto a éste, mientras que el DSS produjo en el tejido una pérdida significativa de la fuerza de contracción muscular, reduciéndola a $78,6 \pm 4,5\%$. El tratamiento con extracto de TR a la dosis de 5 mg/kg mostró una respuesta a la ACh significativamente menor que ambos controles, aunque las dosis de 25 y 50 mg/kg lograron, de manera dosis dependiente, normalizar la funcionalidad del tejido, alcanzando un $85,5 \pm 9\%$ y un $97 \pm 4\%$ de la respuesta del control respectivamente (**figura 4.15D**).

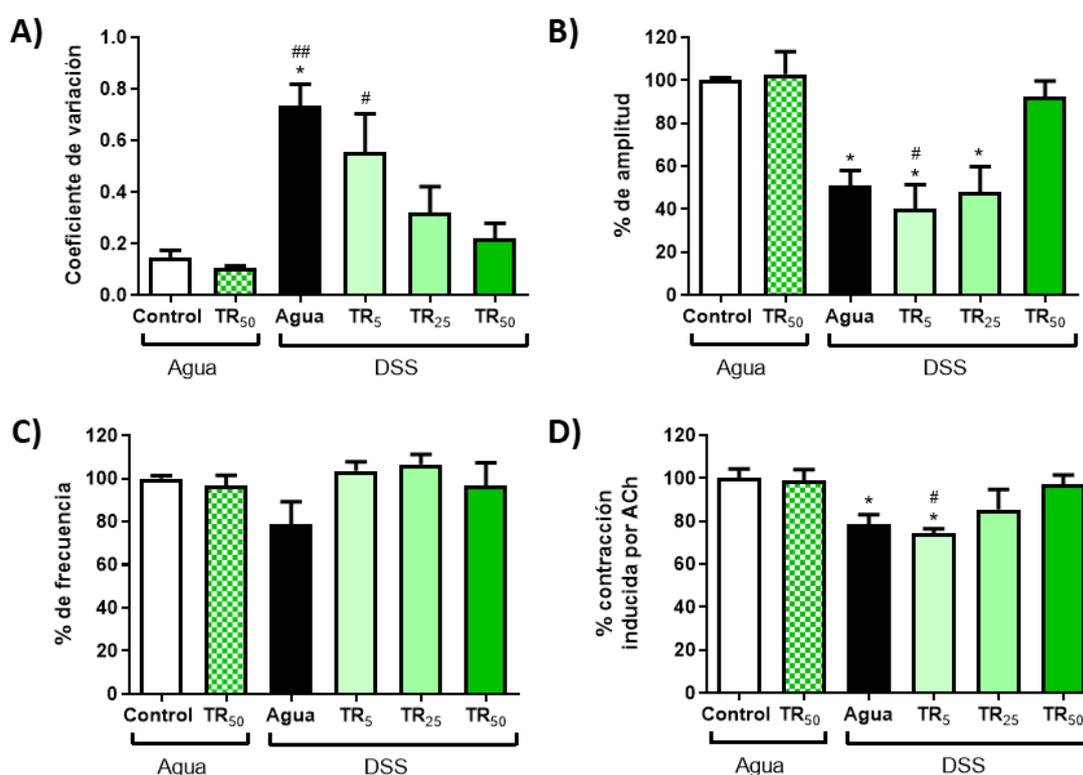


Figura 4.15. Efecto del extracto de TR en la motilidad del íleon. **(A)** Coeficiente de variación de las contracciones de la musculatura lisa longitudinal del íleon murino. **(B)** Amplitud y **(C)** frecuencia de las contracciones registradas por los distintos grupos respecto al grupo control. **(D)** Fuerza de la contracción en respuesta a la adición de ACh respecto al grupo control. Datos expresados como la media \pm error estándar ($n=4-10$). * $p<0,05$ vs. control; # $p<0,05$, ## $p<0,01$ vs. grupo TR₅₀.

Con el objetivo de valorar un posible efecto antiinflamatorio del TR que justificara la protección mostrada por el extracto sobre los efectos del DSS, se midieron diferentes biomarcadores pro y antiinflamatorios en muestras de colon distal, el tejido más dañado por la colitis. La evaluación del efecto del TR se realizó sólo en muestras de ratones tratados con la dosis de 50 mg/kg, ya que había obtenido los mejores resultados en los experimentos previos sin mostrar signos de toxicidad en los animales.

Al evaluar los marcadores proinflamatorios MPO e IL-6, participantes de la respuesta inflamatoria temprana^{5,6}, se observó un incremento significativo producido por el DSS respecto a los niveles del grupo control (**figura 4.16A y 4.16B**), mientras que el tratamiento con extracto de TR redujo significativamente el aumento de la expresión de ambas sustancias provocado por el DSS ($59,9 \pm 9\%$ y un $40,1 \pm 14\%$, respectivamente).

También se analizó la expresión de la IL-10, una interleucina antiinflamatoria que reduce la expresión de citocinas proinflamatorias⁷. La administración de DSS produjo una disminución de sus niveles respecto al grupo control ($p = 0,056$), la cual no fue revertida por el tratamiento con extracto de TR (**figura 4.16C**).

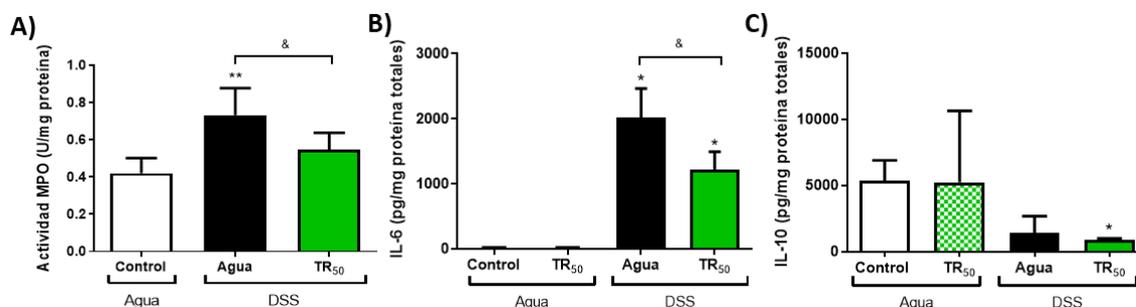


Figura 4.16. Resultados de la actividad antiinflamatoria del extracto de TR sobre el efecto del DSS en el colon murino. (A) Actividad MPO, (B) niveles de IL-6 y (C) IL-10 en las muestras de colon de los ratones de distintos grupos. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n = 6-8$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. grupo control; & $P < 0,05$ vs. grupo agua+DSS.

Además, se evaluó mediante WB la expresión de las enzimas iNOS y COX-2, claves en la cascada inflamatoria y muy utilizadas como dianas terapéuticas por tratamientos antiinflamatorios y marcadores diagnósticos de inflamación^{8,9}. Como podemos ver en la **figura 4.17A y 4.17B**, el tratamiento con extracto de TR no produjo variaciones en su expresión en animales sanos, mientras que el DSS produjo un aumento de la expresión de

las dos enzimas en las muestras de colon distal. Este incremento en la expresión de iNOS y COX-2 fue revertido de manera significativa por el tratamiento con el extracto de TR a 50 mg/kg (**figura 4.17C y 4.17D**).

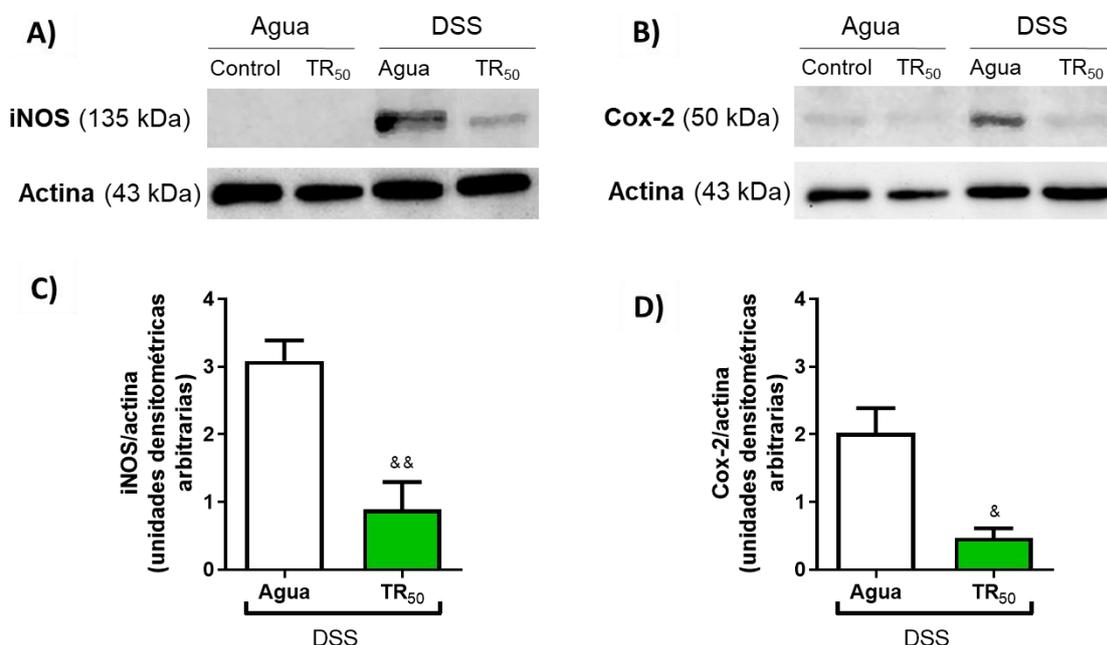


Figura 4.17. Actividad antiinflamatoria del extracto de TR sobre el efecto del DSS en el colon murino, medida en términos de expresión de enzimas proinflamatorias. Imágenes representativas de WB de **(A)** iNOS y **(B)** COX-2. Análisis cuantitativo de la expresión de **(C)** iNOS y **(D)** COX-2. Datos expresados como la media \pm error estándar, $n = 6-8$. &P<0,05, &&P<0,01 vs. grupo agua+DSS.

Dado que una de las consecuencias directas y más graves de la inflamación producida por el DSS es la destrucción de las proteínas de unión o *tight junctions*¹⁰, se analizó la expresión de una de las proteínas constituyentes de estos complejos, la ZO-1, en muestras de colon distal. Para ello se empleó la técnica de inmunofluorescencia y la posterior visualización mediante microscopía confocal. Como muestra la **figura 4.18A**, en los animales sanos (control) la ZO-1 se expresó principalmente en el borde apical del epitelio y de manera más débil, en forma de vesículas, en el interior de la mucosa. El DSS produjo una pérdida de la expresión de la ZO-1 en la parte apical del epitelio, aunque manteniendo su expresión en las vesículas dentro de la mucosa (**figura 4.18B**). Por su parte, el tratamiento con TR mantuvo una expresión de la ZO-1 similar al control en zona apical de la pared epitelial (**figura 4.18C**).

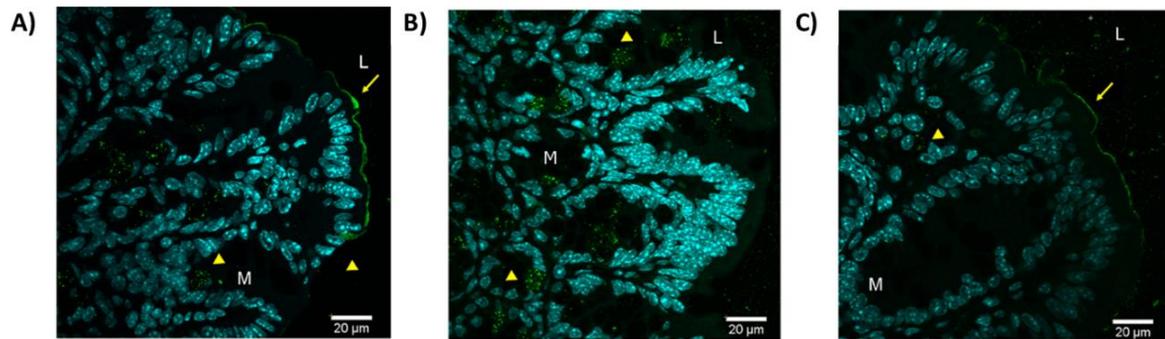


Figura 4.18. Efecto del DSS y el tratamiento con extracto de TR sobre la expresión de la ZO-1. Fotografía de la tinción con inmunofluorescencia de la ZO-1 en los cortes histológicos de los grupos **(A)** control, **(B)** agua+DSS y **(C)** TR₅₀+DSS. Fotografía tomada con microscopio confocal. M: mucosa. L= lumen. (n=3).

4.4 REFERENCIAS

1. Valero MS, Ramón-Gimenez M, Lozano-Gerona J, et al. KCa3.1 Transgene Induction in Murine Intestinal Epithelium Causes Duodenal Chyme Accumulation and Impairs Duodenal Contractility. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1193. doi:10.3390/ijms20051193
2. Sevelsted Møller L, Fialla AD, Schierwagen R, et al. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 is an important modulator of hepatic injury. *Sci Rep.* 2016;6:28770. doi:10.1038/srep28770
3. Paka L, Smith DE, Jung D, et al. Anti-steatotic and anti-fibrotic effects of the KCa3.1 channel inhibitor, Senicapoc, in non-alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2017;23(23):4181-4190. doi:10.3748/wjg.v23.i23.4181
4. Rivera A, Vandorpe DH, Shmukler BE, et al. Erythrocyte ion content and dehydration modulate maximal Gardos channel activity in KCNN4 V282M/+ hereditary xerocytosis red cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;317(2):C287-C302. doi:10.1152/ajpcell.00074.2019
5. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:135625. doi:10.1155/2008/135625
6. Yang R, Han X, Uchiyama T, et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(3 48-3). doi:10.1152/ajpgi.00177.2003
7. Madsen KL, Lewis SA, Tavernini MM, Hibbard J, Fedorak RN. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology.* 1997;113(1):151-159. doi:10.1016/s0016-5085(97)70090-8
8. Złotek U, Szymanowska U, Pecio Ł, Kozachok S, Jakubczyk A. Antioxidative and Potentially Anti-inflammatory Activity of Phenolics from Lovage Leaves *Levisticum officinale* Koch Elicited with Jasmonic Acid and Yeast Extract. *Molecules.*

- 2019;24(7):1441. doi:10.3390/molecules24071441
9. Sorrells DL, Friend C, Koltuksuz U, et al. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg.* 1996;131(11):1155-1163. doi:10.1001/archsurg.1996.01430230037007
 10. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J Surg Res.* 2007;140(1):12-19. doi:10.1016/j.jss.2006.07.050

5. DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO 1: PAPEL DEL CANAL KCa3.1 EN EL APARATO DIGESTIVO

El canal de potasio activado por calcio KCa3.1 tiene una amplia distribución, habiendo sido localizado en placenta, glándulas endo- y exocrinas, próstata, células hematopoyéticas, endoteliales vasculares, fibroblastos, músculo liso vascular o tejido epitelial, entre otros¹⁻³. A nivel epitelial se sitúa en todo el tracto gastrointestinal, pulmón, conductos de las glándulas secretoras (salivares, lacrimales, páncreas, próstata), así como en la piel, córnea, mucosa oral y urotelio⁴⁻⁷. Por otro lado, a pesar de no encontrarse expresado en tejidos excitables, como miocitos cardíacos, músculo esquelético o el sistema nervioso⁸⁻¹⁰, sí se ha observado su presencia en las neuronas entéricas¹¹.

La primera descripción de este canal fue hecha por Gardos en los años 50, cuando observó una salida de potasio del interior de los eritrocitos activada por el aumento de calcio intracelular¹². Estudios posteriores demostraron que el canal KCa3.1, llamado “canal Gardos” en honor a su descubridor, era el responsable de este flujo y que, además, generaba una salida de agua intracelular, provocando la deshidratación del eritrocito, su contracción y, en algunos casos, su apoptosis^{13,14}.

Una de las funciones mejor definidas para el canal KCa3.1 es su contribución a las funciones celulares dependientes de calcio, produciendo una hiperpolarización de la membrana y regulando así su entrada al medio intracelular en células no excitables, como células T, macrófagos y células epiteliales¹⁴. En esas células, la entrada de calcio al citosol por canales tipo TRP, canales activados por liberación de calcio tipo ORAI u otros canales activados por ligando, genera una carga positiva que da lugar a la despolarización, lo que termina cerrando dichos canales, impidiendo así una activación prolongada necesaria para determinadas funciones específicas de estas células. Sin embargo, el aumento de calcio en el medio intracelular activa el canal KCa3.1, que libera potasio al exterior de la célula manteniendo el potencial de membrana lo suficientemente negativo, o incluso causando una hiperpolarización, para prolongar la entrada de calcio o aumentarla¹⁵. Este proceso es necesario para la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de algunas células defensivas o para la proliferación de distintos tipos de células^{14,16,17}.

Otras funciones donde este canal está implicado son la ya nombrada regulación del volumen celular, secreción de líquidos, vasodilatación, producción de citoquinas inflamatorias por parte de las células T, macrófagos o mastocitos^{16,17}, o proliferación de algunas células, como los fibroblastos, las células endoteliales vasculares y de músculo liso o las células T y B^{15,16,18,19}. Es por ello, que su inducción se ha visto involucrada en determinados procesos patológicos caracterizados por la proliferación e inflamación celular excesiva, como la angiogénesis, la aterosclerosis, la reestenosis arterial, la fibrosis, o el desarrollo de algunas neoplasias, convirtiéndolo en una prometedora diana farmacológica¹⁴.

La implicación de los canales de potasio activados por calcio de conductancia pequeña e intermedia, incluido el canal KCa3.1, en la regulación del tono vascular se explica debido a que la activación de estos canales se asocia con la liberación del “factor hiperpolarizante derivado del endotelio” en el endotelio vascular, el cual produce vasodilatación²⁰⁻²². Este efecto es producido a través del aumento de la entrada de calcio en las células endoteliales, la captación de L-arginina y la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno. Mecanismos que pueden incrementar la biodisponibilidad de NO y, por lo tanto, una vasodilatación dependiente del endotelio²³. Esta función ha posicionado al canal KCa3.1 como una posible diana farmacológica novedosa para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares con afectación a las células endoteliales.

Las células epiteliales son la vía principal para el transporte de electrolitos y agua a través de órganos y tejidos. En muchas de ellas, el canal KCa3.1 se expresa en la membrana basolateral, donde además de protegerlas de cambios osmóticos, genera un flujo de potasio que permite la secreción de iones cloruro y bicarbonato y, en consecuencia, el transporte de agua^{4,6}. Debido a su importante papel en la secreción de líquidos y en la regulación del tono vascular, se decidió estudiar si su modulación pudiera tener un efecto directo en la fisiología del sistema gastrointestinal.

Este estudio se llevó a cabo de manera novedosa gracias a dos cepas de ratones transgénicos utilizadas: los animales KCa3.1+, desarrollados con una sobreexpresión inducible por doxiciclina del canal en el epitelio intestinal; y los ratones KCa3.1-, que presentaban un ARNm/proteína disfuncional, es decir, nacieron y se desarrollaron con el canal, para posteriormente perder su expresión en el epitelio. Esta modulación del canal

fue comprobada mediante un estudio de control por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), cuantificando la expresión del gen *Kcnn4* en el intestino. Los resultados corroboraron que, tras recibir la doxiciclina en agua de bebida, los ratones KCa3.1+ tuvieron una mayor expresión del canal en el epitelio del duodeno, en comparación con los animales control, mientras que los ratones KCa3.1- no expresaron un canal funcional en el intestino. Por su parte, los ratones no tratados con doxiciclina, en ambas cepas, se encontró una expresión fisiológica del canal, siendo utilizados como control.

En estudios preliminares a esta tesis se realizaron ensayos de miografía en el intestino de estos ratones para comprobar la posible modulación de la musculatura lisa mediante el uso de agonistas del canal, utilizados previamente en ensayos en el músculo liso vascular, el SKA-31 y SKA-121^{24,25}. Pese a la falta de resultados significativos en estos experimentos, se observaron variaciones en las deposiciones realizadas por los ratones durante la implantación del modelo genético, por lo que se decidió estudiar posibles alteraciones relacionadas en el sistema digestivo.

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión subcrónica del canal produjo dos alteraciones importantes: una acumulación excesiva de quilo y una reducción de las contracciones espontáneas en el duodeno. Además, los animales KCa3.1+ mostraron una pérdida de pelo en algunas regiones, hiperqueratosis y aumento significativo de su ingesta de agua. Tras el sacrificio, se observó una fuerte dilatación de las paredes del intestino delgado y del ciego, aparentemente por un exceso de contenido intestinal. Estas alteraciones fueron revertidas mediante el tratamiento *in vivo* con un antagonista del canal, el Senicapoc® (ICA-17043). En cuanto al efecto proliferativo del canal, en el estudio control realizado por parte del grupo de trabajo, se detectó una menor tasa de apoptosis de las células epiteliales en las criptas intestinales²⁶, sugiriendo una alteración en la homeostasis del tejido. Por el contrario, los animales de la cepa KCa3.1- no expresaron ningún fenotipo intestinal que generara alteraciones significativas.

La hiperqueratosis y pérdida de pelo observada en los animales con sobreexpresión del canal podrían deberse a su efecto sobre la proliferación celular²⁷. En un estudio paralelo llevado a cabo a la vez que esta tesis doctoral se observó que los animales KCa3.1+ sobreexpresaron el canal en la epidermis unas 800 veces más que los animales

control. Esta modulación del canal provocó una espongiosis epidérmica, hiperplasia e hiperqueratosis epidérmica progresiva, prurito y úlceras, observando además un aumento en la expresión de citoquinas proproliferativas y proinflamatorias en la piel. Al igual que en nuestros resultados en el aparato gastrointestinal, el Senicapoc® fue capaz de revertir estos efectos, demostrando así la implicación directa del canal KCa3.1 en la regulación de la homeostasis epidérmica y una posible diana terapéutica para el tratamiento de patologías de la piel²⁸.

El aumento en la ingesta de agua de bebida por parte de los ratones +DOX KCa3.1+ podría explicar el incremento significativo del contenido intestinal encontrado en estos animales. Esta alteración del comportamiento se ha relacionado otras veces con la suplementación con sacarosa en agua de bebida para administrar la doxiciclina. Este glúcido es utilizado de manera habitual en este tipo de ensayos para enmascarar el sabor amargo de la doxiciclina. De hecho, un estudio demostró que la adición de un 5% de sacarosa en el agua de bebida podía aumentar hasta tres veces su ingesta, tanto si esta contenía doxiciclina como si no²⁹. Sin embargo, en nuestro estudio la concentración de sacarosa fue sólo de un 1% y se administró tanto en el grupo +DOX como en el -DOX, lo que no explicaría el aumento del 60% en la ingesta de agua por parte del primer grupo. Nuestra hipótesis sugiere que estos animales podrían mostrar una estimulación del centro de la sed debido a un desequilibrio en el balance hidroelectrolítico, producido por la sobreexpresión del canal y no por la presencia de sacarosa en el agua.

La posible alteración en el equilibrio electrolítico podría relacionarse con el papel fundamental del canal KCa3.1 en el transporte de iones y agua, tanto en el duodeno como en el colon, aunque en este último su papel es menos relevante³⁰. Tal y como se ha comentado, la presencia del canal en la membrana basolateral de las células epiteliales permite la salida de potasio frente a un aumento de la concentración de calcio intracelular, manteniendo así el potencial de membrana negativo necesario para la secreción de cloro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-) a través del CFTR^{31,32}. A su vez, esta secreción de aniones al lumen se compensa por una difusión de iones Na^+ a través de las uniones intersticiales, generando un arrastre osmótico de H_2O ³³. Aunque su presencia en el duodeno no ha sido tan estudiada como en el colon, se ha demostrado el papel específico del canal KCa3.1 en la secreción de iones HCO_3^- y Cl^- a la luz del duodeno¹. En este estudio,

se cuantificó el flujo de HCO_3^- generado en células epiteliales de ratones KO $\text{K}_v7.1^{-/-}$, canal encargado junto con el canal KCa3.1 de generar una corriente de K^+ fuera de la célula para la secreción de iones a la luz del duodeno. En estos animales, pese a no tener un canal $\text{K}_v7.1$ activo, se observó una excreción de HCO_3^- en presencia de carbacol. Sin embargo, la adición de clotrimazol, un antagonista del canal KCa3.1 , bloqueó completamente este transporte, demostrando así la implicación de este canal al menos de manera compensatoria. En el colon se realizó un estudio similar sobre la secreción epitelial, pero utilizando ratones KO para el canal KCa3.1 . En estos animales la ausencia del canal generó una reducción significativa de la secreción de iones Cl^- frente a la adición de carbacol³⁴. Además, otro estudio asoció la secreción de cloro dependiente de calcio en el epitelio intestinal específicamente al canal KCa3.1 ³⁵. La supresión de este canal en el epitelio intestinal provocó una disminución en el flujo de iones cloruro y una deshidratación del contenido intestinal. Por ello, este canal es considerado como una potencial diana farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de diarreas inducidas por virus, en los cuales se ve afectada la homeostasis del calcio en el epitelio intestinal³⁵.

En un primer momento, en nuestro modelo de sobreexpresión se pensó que una mayor presencia del canal podría provocar un incremento en la secreción de iones y un arrastre de agua hacia la luz intestinal por acción osmótica. Esta mayor secreción de líquido explicaría la acumulación de agua en la luz del intestino y la distensión intestinal generada en los animales KCa3.1^+ . Además, según esta hipótesis el aumento de tamaño del ciego en estos ratones estaría justificado por su propia función fisiológica. Este órgano acumula el quilo no absorbido en el intestino delgado, reteniéndolo antes de su paso al intestino grueso y permitiendo la reabsorción de agua e iones en su interior y la digestión de determinadas fibras gracias a su microbiota³⁶. Su correcto funcionamiento habría acumulado el excesivo contenido intestinal de los ratones tratados con doxiciclina, permitiendo la disminución de su volumen en el intestino grueso. Esto explicaría además que las diferencias en la cantidad de heces cuantificadas en ambos grupos de ratones no fueran tan significativas como el contenido del intestino delgado y que su composición hídrica fuera similar.

Para comprobar si el arrastre de agua era debido a una alteración en el balance electrolítico como consecuencia de una mayor expresión del canal, cuantificamos las

concentraciones de Na⁺, K⁻ y Cl⁻ en el contenido intestinal, en las heces y en suero. Aunque no encontramos diferencias significativas en la concentración de iones entre los ratones +DOX y -DOX, no se podría descartar una alteración en los procesos de secreción intestinal en los ratones con sobreexpresión, dado que el aumento de agua intraluminal por arrastre osmótico podría haber diluido las muestras y mantenido una concentración similar al control. Para poder comprobar debidamente los efectos de la sobreexpresión del canal KCa3.1 en el transporte de iones y agua en nuestro modelo, haría falta un estudio celular específico *in vitro* que permitiera evaluar la actividad de los distintos canales involucrados.

La acumulación de quilo y mayor presencia de heces también podrían ser debidas a una alteración en la contractilidad y/o motilidad intestinal. Para valorar el estado funcional de la actividad motora, tanto en intestino delgado como en colon, se realizaron ensayos de miografía en duodeno y colon medio, estudiando las contracciones espontáneas basales, el efecto del TRAM-34 sobre ellas y la respuesta del músculo liso a la ACh.

Como se muestra en el apartado de resultados, el ensayo de miografía del duodeno mostró una contractilidad basal alterada en el grupo con sobreexpresión del canal. El análisis de los registros de las contracciones espontáneas reveló que, en estos animales, las ondas lentas presentaban una menor frecuencia, sin cambios en su amplitud, en comparación con los animales control. En el colon medio también se encontraron alteraciones significativas en la motilidad basal. Aunque las ondas lentas sólo presentaron una ligera disminución en su frecuencia, su amplitud si fue significativamente mayor al compararla con el control.

En un primer momento, se pensó que estas alteraciones en la motilidad basal podrían ser debidas a la sobreexpresión del canal, ya que trabajos anteriores habían estudiado con éxito los efectos de la modulación del canal KCa3.1 en la contractilidad de músculo liso de aorta de rata mediante agonistas y antagonistas del mismo^{24,25,37,38}. Teniendo esto en cuenta, la presencia de musculatura lisa en el intestino llevó a la hipótesis de que una modulación del canal a nivel intestinal podría afectar a su contractilidad, a pesar de que en la bibliografía no se haya descrito hasta la fecha al canal KCa3.1 del epitelio intestinal como regulador de la musculatura lisa.

La mayor expresión del canal, presente en la parte basolateral de las células epiteliales, podría haber aumentado el potasio en el líquido extracelular, generando alteraciones en el potencial de membrana y, por tanto, en la excitabilidad celular. Sin embargo, generalmente un aumento de concentración de potasio en el medio extracelular se asocia a una contracción del músculo liso, debido a la despolarización de la membrana plasmática de las células musculares³⁹, lo que teóricamente no debería provocar una pérdida de la frecuencia de las ondas lentas.

Para ver si el canal era responsable de la alteración de la motilidad basal, se bloqueó selectivamente el canal con el antagonista TRAM-34. Al hacerlo, no se produjeron respuestas diferentes en los grupos de animales, ni en duodeno ni en colon. Estos resultados descartaron la posibilidad de la implicación directa del canal sobre la regulación de la musculatura lisa, ya que, en tal caso, el bloqueo con TRAM-34 la debería haber normalizado o, al menos, generado una respuesta diferente en las contracciones espontáneas entre el grupo +DOX y el -DOX. Del mismo modo, no se observaron diferencias en la respuesta contráctil a la ACh en los diferentes grupos de animales. Por todo ello, estos resultados hacen pensar que la pérdida de contractilidad podría estar provocada por un efecto secundario a los cambios observados en el intestino, como la acumulación del contenido intestinal o la distensión de las paredes del tubo digestivo.

Bayliss y Starring describieron por primera vez, a comienzos del siglo XX, el aumento de la presión en el interior del lumen intestinal como principal impulsor de la motilidad intestinal, al observar la contracción generada por el paso del bolo alimenticio a través del intestino, en lo que ellos llamaron “la primera ley del intestino”⁴⁰. La distensión generada por la tensión luminal estimula mecánicamente los mecanorreceptores de la pared intestinal, los cuales inervan los plexos submucoso y mientérico generando una respuesta nerviosa que causa una contracción del músculo liso longitudinal y un reflejo peristáltico en el intestino⁴¹⁻⁴⁴. Sin embargo, una distensión excesiva puede pasar de generar movimientos peristálticos fisiológicos a un estado patológico de dismotilidad. Este efecto ha sido estudiado, midiendo los cambios contráctiles producidos en duodeno y colon distal frente al aumento de presión en el interior del lumen, tanto *in vivo* como *in vitro*⁴⁵. Los resultados de este trabajo mostraron que un ligero incremento de la presión intraluminal (5 mmHg) produce un aumento de la fuerza de contracción ejercida por la

musculatura lisa, posiblemente generado por la estimulación de los mecanorreceptores. Sin embargo, conforme el incremento de presión aumentó, el músculo liso intestinal perdió fuerza y la respuesta contráctil disminuyó exponencialmente. Además, de manera similar a nuestro estudio, tras la distensión máxima estudiaron *in vitro* la capacidad contráctil de la musculatura frente a un estímulo no mecánico, añadiendo ACh 10^{-6} M. En este caso, sus resultados reflejaron un mantenimiento de la respuesta del músculo, que descartaba un fallo en el mecanismo de contracción, coincidiendo con nuestros hallazgos. Si tenemos esto en cuenta, es lógico pensar que la distensión de la pared del duodeno, que en nuestro estudio produjo un aumento de la luz intestinal de más de un 350%, podría ser lo suficientemente elevada y mantenida en el tiempo para generar una pérdida funcional. A pesar de esto, hay que valorar que el mayor cambio observado en este estudio fue la pérdida de amplitud de las ondas, mientras que nosotros solo observamos cambios en la frecuencia. Respecto a la motilidad del colon, en los animales con sobreexpresión se observó un aumento de su contenido luminal, aunque menos evidente que en el duodeno, lo que podría haber distendido la pared lo suficiente para estimular la motilidad aumentando la amplitud de las ondas lentas, sin llegar a generar disfunción.

Las células intersticiales de Cajal han sido definidas como reguladoras del ritmo de la motilidad basal⁴⁶. Estas células generan el potencial marcapasos del sistema gastrointestinal, el cual se propaga a las células musculares lisas provocando las ondas lentas, sirviendo así de mediadoras para transmitir señales nerviosas al sincitio del músculo liso intestinal⁴⁷. Cambios en su expresión o daños en su estructura han sido relacionados con diversos trastornos y patologías de la motilidad en gran parte del tracto gastrointestinal⁴⁸. En principio, la sobreexpresión del canal KCa3.1 no tendría por qué tener un impacto directo en la regulación de estas células, ya que, aunque las ICC poseen algunos canales de potasio para la regulación de su voltaje y equilibrio iónico, el canal KCa3.1 no se encuentra entre ellos⁴⁹. Sin embargo, la alteración de estas células se ha observado en patologías con una sintomatología similar a la observada en los ratones KCa3.1+, con una alteración en la motilidad basal del intestino, una acumulación de su contenido y una distensión de su pared. Así es el caso de la dilatación intestinal segmentaria idiopática⁵⁰, el megacolon inducido por diferentes etiologías^{51,52} o el estreñimiento por tránsito lento⁵³, donde los diversos autores que han estudiado el

comportamiento de las ICC en ellas han coincidido en una reducción en su actividad y número en los tejidos que presentaban la distensión.

Un estudio en el que generaron una distensión significativa del intestino, mediante una obstrucción, relacionó la pérdida de la función eléctrica y la alteración de la motilidad en el intestino con el descenso del número de ICC producidas por la obstrucción intestinal⁵⁴. Al analizar las muestras de tejido, se observó una hipertrofia de la *tunica muscularis* y una pérdida en la expresión de las ICC directamente proporcional a su distensión, al igual que sucediera con la alteración de las ondas lentas del tejido muscular. El análisis microscópico del intestino distendido, aunque no detectó presencia de inflamación o daño tisular, mostró unas células “intermedias” entre fibroblastos y células musculares lisas donde normalmente se encuentran las ICC, que los autores hipotetizaron que podrían ser ICC re-diferenciadas. Sin embargo, en un estudio posterior con otro modelo de obstrucción intestinal, muy similar al anterior, se observó la presencia de macrófagos ED2 positivos, una mayor expresión del ARNm del FNT- α y monocitos CD14 en las muestras de tejido distendido hipertrofiado, sugiriendo que estas citoquinas proinflamatorias podrían haber contribuido a la hipertrofia encontrada en el tejido y a la pérdida de las ICC⁵⁵. Respecto a la motilidad, también observaron una pérdida en la frecuencia de las ondas lentas, pero además evaluaron la capacidad de respuesta contráctil a la adición de carbacol, siendo esta significativamente menor en el grupo con la obstrucción intestinal⁵⁵.

En nuestro estudio no se ha analizado la expresión de las ICC, por lo que no sabemos si su pérdida es la responsable de la disminución en la frecuencia de las ondas lentas que se observó en el ensayo de miografía. Además, en el examen histológico realizado no observamos cambios en el grosor de las capas musculares, signos de inflamación ni migración de células defensivas, descartando así que la dismotilidad tuviera un origen inflamatorio. La ausencia de inflamación evitaría la migración de células defensivas y la expresión de citoquinas proinflamatorias, que habían sido referidas en otros trabajos como principales culpables de la hipertrofia encontrada en la *tunica muscularis*^{54,56}. El mantenimiento de un tejido muscular sano encajaría con el hecho de que, en el ensayo de miografía realizado, la respuesta frente a la adición de acetilcolina no mostrara diferencias entre el grupo con sobreexpresión del canal y el control.

Los ratones KCa3.1+ tratados con doxiciclina y Senicapoc® permitieron evaluar si era posible prevenir la expresión de este fenotipo intestinal mediante un bloqueo *in vivo* del canal KCa3.1. La ausencia de cambios fisiológicos en estos ratones observada en los resultados respaldaría la hipótesis de que estas alteraciones estuvieran causadas por un efecto secundario a su sobreexpresión.

En cuanto a la cepa KCa3.1-, el desarrollo de un modelo viable de supresión inducible *in vivo* del canal KCa3.1 específico del epitelio es, en sí, completamente novedoso. Al analizar los efectos producidos por la delección del canal no se observaron alteraciones en el tejido epitelial ni las observadas en el aparato gastrointestinal en el modelo de sobreexpresión. Hay que tener en cuenta que en otros experimentos realizados con ratones KO totales del canal KCa3.1, que nacen y se desarrollan sin el canal expresado en el organismo, tampoco se han observado alteraciones epiteliales o intestinales, aunque sí otros efectos secundarios como disfunción endotelial, defectos en la regulación del volumen de los eritrocitos y esplenomegalia, alteraciones del comportamiento o daño cerebral entre otros⁵⁷⁻⁶⁰.

Otra posible justificación de la ausencia de alteraciones en estos ratones podría ser una posible compensación fisiológica. La investigación sobre el papel de distintos canales de K⁺ en la secreción colinérgica de cloro en ratones KO para el canal KCa3.1 demostró que, aunque dicha secreción fue significativamente disminuida, hubo una importante respuesta secretora en el intestino³⁴. Esto fue posible gracias a que otros canales de potasio fueron activados, compensando parcialmente de este modo la función del canal KCa3.1. Además, al bloquear los canales compensadores de manera selectiva la secreción de cloro fue mínima, corroborando así su hipótesis³⁴. Teniendo esto en cuenta, sería posible que en nuestro modelo de supresión del canal KCa3.1 se hubiera dado el mismo mecanismo de compensación, evitando así que se produjeran alteraciones tan significativas como las encontradas en el modelo de sobreexpresión. Para poder confirmar esta teoría haría falta un estudio celular que determinara el comportamiento tanto del canal KCa3.1 como de los otros canales posibles implicados.

Como conclusión, podemos decir que la sobreexpresión del canal KCa3.1 puede producir un incremento del contenido intestinal y una reducción de las contracciones espontáneas, provocando alteraciones notables en la fisiología intestinal. Pese a no poder

definir con seguridad la etiología de estos cambios, la implantación de un modelo *in vivo* de sobreexpresión del canal KCa3.1 es completamente novedosa. Además, la relación establecida de la modulación del canal con la alteración del transporte iónico e hídrico respalda la hipótesis de que este canal podría ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de patologías intestinales que cursen con sintomatologías semejantes. Estos hallazgos podrían ayudar a entender mejor los mecanismos de adaptación frente a alteraciones del intestino que cursen con dismotilidad o pérdida de la homeostasis en el transporte hídrico y electrolítico.

5.2 ESTUDIO 2: EFECTO DE TÉ DE ROCA EN LA MUSCULATURA LISA INTESTINAL

Jasonia glutinosa (L.) DC. (*Compositae*), comúnmente conocida como té de roca, es una planta utilizada de manera tradicional para el tratamiento de diversas patologías en la costa mediterránea occidental. Aunque la cultura popular le adjudica multitud de usos, como antiinflamatorio, cicatrizante, antihipertensivo, antiséptico, estimulante o antidepressivo, el más extendido es en forma de infusión con propiedades digestivas, el cual le dio su calificación popular como “té”^{61,62}. Sin embargo, a pesar de la amplia distribución de *Jasonia glutinosa* y su extendido uso tradicional, apenas hay estudios que avalen científicamente su uso terapéutico. Si bien hay algunos estudios *in vitro* que demuestran que esta planta presenta efectos antioxidantes⁶³, antiinflamatorios⁶⁴, antimicrobianos⁶⁵ o antihipertensivos⁶⁶, hasta el momento no existen estudios sobre su efecto a nivel digestivo.

En la bibliografía se define al té de roca como un “tónico digestivo”, utilizado para mejorar digestiones pesadas caracterizadas por espasmos abdominales y dolor visceral⁶¹. Por ello, el primer estudio de esta tesis doctoral sobre se centró en estudiar su posible efecto sobre la musculatura lisa intestinal. Para determinar el posible efecto espasmolítico del té de roca y conocer su posible mecanismo de acción se realizó un ensayo *ex vivo* en baño de órganos con segmentos aislados de duodeno de rata. En él se evaluó el efecto del extracto de TR sobre la motilidad basal y la contractilidad de la musculatura lisa intestinal, comparando su efecto con el del verapamilo, un agente espasmolítico de referencia, antagonista de los canales de calcio activados por voltaje tipo L.

La motilidad basal del intestino está caracterizada por movimientos espontáneos regulados por ciclos periódicos de despolarización y repolarización. Las fases de despolarización, necesarias para las respuestas contráctiles, se producen por una entrada rápida de calcio al citoplasma a través de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje y la liberación de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares⁶⁷. Por otro lado, la relajación viene dada por la disminución de la concentración de calcio en el citosol⁶⁸. Para ello, los mecanismos principales son bloquear de la entrada del calcio extracelular mediante el cierre de los

canales de Ca^{2+} activados por voltaje, favorecer su salida al medio extracelular o introduciendo el calcio citoplasmático a los almacenes intracelulares⁶⁹.

El extracto de TR, de manera dosis dependiente, produjo una relajación de las contracciones espontáneas de la musculatura lisa longitudinal del duodeno, produciendo una reducción significativa de la amplitud de contracciones, sin modificar su frecuencia. Este efecto fue similar al observado por el verapamilo en la motilidad basal, sugiriendo que el extracto del TR podría tener el mismo mecanismo de acción que este antagonista, bloqueando los canales de calcio activados por voltaje tipo L, evitando así el aumento de la concentración del calcio intracelular.

Para comprobar si el efecto espasmolítico de nuestro extracto era debido al bloqueo de la entrada de calcio desde el medio extracelular, se estudió el efecto del extracto de TR sobre el duodeno precontraído por la adición de potasio al medio. Un aumento de la concentración de potasio extracelular produce una despolarización de la célula y una apertura de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, lo que conduce a una entrada del calcio desde el medio extracelular y a un incremento de su concentración intracelular, que conlleva a una contracción sostenida del tejido muscular^{39,70,71}. De nuevo, la relajación del tejido precontraído con cloruro de potasio producida por el extracto de TR fue muy similar a la producida por el verapamilo, sugiriendo así una relación entre el efecto del extracto de TR con el bloqueo de la entrada de calcio en la célula.

Con el objetivo de confirmar este mecanismo de acción, se incubaron los segmentos de duodeno en una solución nutritiva sin calcio. La ausencia de este ion minimizó las contracciones espontáneas de la musculatura lisa, debido a la imposibilidad de despolarizar las células musculares. La adición de calcio a las copas control del baño de órganos, en forma de CaCl_2 , produjo que los segmentos de duodeno recuperaran su capacidad contráctil, respuesta que fue dosis dependiente. Sin embargo, los segmentos de duodeno incubados, previamente a la adición de CaCl_2 , con diferentes dosis de extracto de TR o de verapamilo, no mostraron la misma capacidad de respuesta al CaCl_2 que los controles. Tanto el extracto de TR como el verapamilo redujeron significativamente la respuesta contráctil del músculo liso duodenal. Este resultado indicaba un efecto del extracto de TR sobre el músculo liso intestinal mediante la inhibición de la entrada de calcio al músculo⁷².

Tras observar este comportamiento, se estudió si el extracto del TR era capaz de antagonizar el efecto producido por un agonista de los canales de calcio activados por voltaje tipo L, el Bay-K8644. Para ello, los segmentos de duodeno fueron incubados con el vehículo del extracto (agua), el extracto del TR, a diferentes dosis, y con el verapamilo durante 15 minutos antes de añadir el Bay-K8644. Este agonista produjo una fuerte contracción en los segmentos de los duodenos control. Sin embargo, en los segmentos incubados previamente con el extracto o el verapamilo, el Bay-K8644 no produjo la misma respuesta, encontrando una disminución de su efecto contráctil de un $94,4 \pm 1,7\%$ en el caso de la máxima dosis probada de TR, 5 mg/ml, respuesta similar a la mostrada por el verapamilo ($91,9 \pm 2,9\%$).

Todos estos resultados sugieren que el extracto de TR disminuye la contractilidad de la musculatura lisa longitudinal del duodeno al inhibir la entrada de calcio a la célula, probablemente por su capacidad para bloquear los canales de calcio activados por voltaje tipo L.

Esta hipótesis concuerda con el estudio realizado por Valero y cols.⁶⁶ sobre el efecto del TR en el músculo liso vascular. En él, realizado con el mismo extracto etanólico de *Jasonia glutinosa*, el TR mostró un efecto vasorelajante en aorta de rata mediante el bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje, evitando de este modo la entrada de calcio al citosol desde el medio extracelular. Además, este mecanismo de acción fue confirmado mediante ensayos de *patch-clamp* en células musculares lisas vasculares de aorta de rata (A7r5), las cuales expresan canales de calcio tipo L activados por voltaje⁶⁶.

En este estudio también se investigó el papel del extracto de TR sobre la musculatura lisa vascular precontraída con fenilefrina (1 μ M). El TR bloqueó la contracción producida por este agonista del receptor adrenérgico α_1 , el cual, aparte de activar los canales de calcio activados por voltaje tipo L dependiente de la despolarización celular, activa canales operados por ligando permeables al calcio y la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico. Este efecto inhibitorio fue observado también al eliminar el calcio del medio de incubación, sugiriendo que el extracto de TR podría producir una disminución de calcio en los almacenes intracelulares, o bien evitar la salida de calcio de estos almacenes al citosol. Por último, relacionaron al extracto del TR con la vía Rho A/Rho-quinasa o de sensibilización al calcio, que produce una contracción de la musculatura lisa

independiente del calcio. El inhibidor de la Rho-quinasa Y-27632 (10^{-6} M) y el extracto de té de roca (5 mg/ml) produjeron una inhibición similar sobre la contracción producida por el KCl (80 mM) en aorta de rata, mientras que su incubación conjunta no produjo ningún efecto sumatorio. Sin embargo, para confirmar este mecanismo de acción serían necesarios estudios más específicos, ya que esta ruta podría haber sido inhibida por el bloqueo inicial de la entrada del calcio a través de los canales activados por voltaje⁶⁶.

Numerosos estudios han demostrado que las propiedades biológicas de diferentes extractos vegetales y de frutas vienen dadas por su composición fitoquímica^{73,74}. Los metabolitos secundarios de las plantas, como polifenoles, alcaloides y terpenos, pueden presentar actividad espasmolítica y pueden usarse como agentes antiespasmódicos y antidiarreicos⁷⁵⁻⁷⁸.

Estudios sobre la composición fitoquímica del extracto o aceite de *Jasonia glutinosa* han demostrado que posee una gran cantidad de compuestos farmacológicamente activos. En ellos se han identificado la presencia de polifenoles, específicamente flavonoides glicosilados como la quercetina y derivados de kaempferol en un extracto metanólico de las partes aéreas de la planta⁷⁹, y numerosos terpenoides, siendo los más significativos el alcanfor, el nerolidol y el alfa-pineno en el aceite esencial y un extracto de pentano⁸⁰. En cuanto a este estudio, el extracto etanólico obtenido mostró, mediante espectrometría de masas, la presencia de diversos flavonoides, destacando entre ellos la quercetina, el kaempferol o la patuletina.

Los polifenoles son un extenso grupo de sustancias químicas de origen vegetal con numerosas propiedades antioxidantes⁸¹⁻⁸³, antiinflamatorias⁸⁴, prebióticas^{85,86}, protectores del epitelio intestinal^{87,88} o moduladoras de las contracciones de la musculatura lisa⁸⁹⁻⁹¹, además de presentar capacidad para aumentar la reabsorción de agua e iones en el colon⁹². Dentro de este grupo destacan los flavonoides como unos de los compuestos con mayor evidencia espasmolítica. Su efecto inhibitorio sobre el músculo liso ha sido ampliamente estudiado, observándose distintos mecanismos de acción. Ya en 1978, Beret y cols.⁹³, y más tarde en 1983, Petkov y cols.⁹⁴, postularon que el efecto relajante de los flavonoides sobre la musculatura lisa era debido a un aumento en los niveles de los nucleótidos cíclicos inducido por una inhibición de la fosfodiesterasa (PDE). Teniendo en cuenta que la PDE, como otras muchas enzimas, es regulada por la CaM, se

sugirió que el efecto de los flavonoides era por su unión a esta proteína, antagonizándola e inhibiendo así los procesos que regula⁹⁵. Estudios posteriores demostraron una relación directamente proporcional entre la capacidad de algunos flavonoides de inhibir la PDE con su capacidad para relajar la musculatura lisa en íleon aislado de rata. Esto hizo posible concluir que este era, al menos, uno de los mecanismo de acción espasmolíticos de los flavonoides, aunque dejaba la puerta abierta a otros mecanismos de acción complementarios que podrían ser estudiados más adelante⁹⁶. Más tarde se demostró que la relajación de la musculatura lisa por parte de los flavonoides incluye la modulación de canales iónicos, como la activación de canales de potasio sensibles a ATP o el bloqueo de canales de calcio activados por voltaje, tal y como se refleja en nuestros resultados^{78,97-99}. En conjunto, en base a los múltiples estudios realizados, la teoría más aceptada es que el efecto espasmolítico de los flavonoides sería debido a una combinación de estos mecanismos.

La quercetina ha demostrado su capacidad para inhibir la contracción muscular lisa a través del bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje¹⁰⁰ y de relajar las fibras musculares lisas precontraídas mediante la activación de la PKA y el AMPc⁹⁸. Además, a nivel clínico ha demostrado reducir la motilidad gastrointestinal, hecho relacionado con la inhibición de la actividad marcapasos de las células intersticiales de Cajal gracias a su capacidad para bloquear los canales de cloro activados por calcio, disminuyendo además el tiempo de tránsito intestinal^{98,101,102}, el peristaltismo y modulando la excitación muscular⁹⁷.

En un estudio realizado en íleon de rata con 11 flavonoides, como la quercetina, la rutina o la galangina entre otros, la quercetina fue el que presentó mayor capacidad relajante sobre las contracciones tónicas y fásicas de la musculatura lisa, relacionándose este efecto con un grupo hidroxilo diferencial presente en su estructura química⁹⁶. La quercetina, aislada de un extracto acuoso de *Tagetes erecta* L. rico en flavonoides, produjo un efecto espasmolítico sobre las contracciones generadas por un aumento de potasio extracelular. Este trabajo concluyó que el efecto era debido a un bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje, descartando a su vez la implicación de receptores nicotínicos o la vía del óxido nítrico¹⁰⁰. En un estudio sobre el mecanismo de acción inhibitorio de la genisteína y la quercetina sobre las contracciones espontáneas en la

musculatura lisa de duodeno de conejo, se demostró que estos dos flavonoides actuaban por vías distintas. Mientras que la genisteína produjo la relajación de las ondas lentas mediante el bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje tipo L, canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de pequeña, intermedia y alta conductancia, y canales de potasio no específicos, la quercetina lo realizó mediante el bloqueo de la AMPc y la PKA⁹⁸.

El kaempferol también ha demostrado presentar capacidad para modular la motilidad intestinal. Un estudio *in vivo* sobre el efecto de diversos flavonoides sobre el sistema gastrointestinal, en condiciones basales y en un proceso de diarrea aguda, determinó que varios de los flavonoides ensayados, pero especialmente el kaempferol, la rutina, la morina y la miricetina, fueron capaces de retrasar el tiempo de tránsito gastrointestinal en condiciones fisiológicas, tanto en el intestino delgado como en el intestino grueso¹⁰³. En el mismo estudio, al provocar una diarrea con aceite de ricino, estos flavonoides redujeron la acumulación de líquido intraluminal, la secreción de ion sodio y el score de actividad de la enfermedad. Estos efectos fueron potenciados por la administración concomitante de verapamilo y antagonizados al añadir yohimbina, un alcaloide antagonista de los receptores adrenérgicos α_2 . De esta manera, teniendo en cuenta los efectos producidos por los flavonoides aislados y su reacción frente a la administración de verapamilo y yohimbina, los autores sugirieron que estos flavonoides producen un efecto inhibitorio de las funciones intestinales mediante el bloqueo de la entrada de calcio y la estimulación del sistema adrenérgico α_2 .

Por otro lado, la patuletina posee diferentes actividades biológicas, entre las que se incluyen la eliminación de radicales libres, propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, analgésicas, antiespasmódicas, hipotensoras, nematocidas y colagógicas, estimulando la producción de bilis y su expulsión por parte de la vesícula biliar favoreciendo los procesos digestivos¹⁰⁴.

A pesar de los estudios sobre los efectos de diferentes compuestos aislados, hay que tener en cuenta que la mayoría de los efectos observados en los extractos no son debido a un único compuesto, sino a la interacción entre ellos¹⁰⁵. Un trabajo reciente estudió la capacidad del extracto del arbusto *Catha edulis* para inhibir la contracción de la musculatura lisa intestinal, identificando el potencial espasmolítico del extracto y de cada uno de los componentes del extracto de manera aislada, incluidos la quercetina y el

kaempferol. Los resultados mostraron que el efecto espasmolítico del extracto era mayor que el observado por los compuestos de manera individual, incluso si estos se ensayaban al doble de la concentración encontrada en el extracto, demostrando así que la sinergia entre las distintas sustancias es lo que facilita las propiedades terapéuticas de los extractos¹⁰⁶.

En conclusión, podemos decir que el extracto etanólico de *Jasonia glutinosa* ha demostrado, *in vitro*, tener un efecto espasmolítico sobre el músculo liso longitudinal duodenal, a través del bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje tipo L. Este efecto seguramente sea debido a su composición fitoquímica, destacando la presencia de polifenoles, y la sinergia entre sus componentes. Estos resultados avalan científicamente la posible utilización de este extracto para el tratamiento de patologías intestinales que requieran del tratamiento con un agente espasmolítico.

5.3 ESTUDIO 3: EFECTO PROTECTOR DEL TÉ DE ROCA EN UN MODELO DE COLITIS

Tras demostrar que el extracto de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. tenía efecto espasmolítico a nivel digestivo y presentaba una composición rica en compuestos bioactivos, se decidió realizar un estudio para caracterizar mejor el extracto del té de roca e investigar su papel como protector en un modelo de lesión-reparación de colitis inducida por DSS, utilizando técnicas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

El modelo de colitis empleado en esta tesis es uno de los más utilizados para el estudio de cuadros inflamatorios agudos intestinales, ya que, además de ser un ensayo rápido, sencillo y fácilmente reproducible, presenta una sintomatología muy similar a la colitis ulcerosa humana¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Aunque el sistema que utiliza el DSS para penetrar en la mucosa intestinal no está completamente definido, un estudio reciente sugiere que lo hace mediante la formación de nano-lipocomplejos con ácidos grasos de cadena media a nivel del colon¹¹⁰. Una vez dentro, se ha observado que el DSS tiene una carga altamente negativa aportada por los grupos sulfatos que es tóxica para los epitelios colónicos y produce una rápida rotura de la barrera intestinal, generando un aumento de la permeabilidad epitelial del intestino. Esta alteración del efecto barrera da lugar a una penetración masiva de bacterias en la lámina propia, provocando una fuerte respuesta inmune en la zona, la infiltración de células defensivas y una liberación de mediadores proinflamatorios¹⁰⁸. De hecho, el desequilibrio entre la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias se considera como uno de los desencadenantes de las EII¹¹¹, habiéndose observado en estos pacientes un incremento de enzimas o citoquinas proinflamatorias como la COX-2, la iNOS, el TNF- α y las IL-1 β , IL-12 e IL-23¹¹², de manera similar a lo que ocurre en ratones tratados experimentalmente con DSS^{113,114}.

Además, algunas de estas citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α o la IL-6, son reguladoras de las proteínas de unión estrecha. Un aumento de sus niveles afecta a la expresión de dichas proteínas, interrumpiendo la continuidad de la barrera epitelial y endotelial y favoreciendo el incremento en la permeabilidad del tejido¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Los daños estructurales y la presencia de estos marcadores proinflamatorios también producen alteraciones funcionales. En concreto, se ha observado que el aumento en la

producción de NO y otras citoquinas proinflamatorias como el IFN- γ , la IL-1 β o el TNF- α tiene un efecto sobre la musculatura lisa y la motilidad, pudiendo afectar a su capacidad contráctil o su regulación nerviosa y hormonal^{119–122}.

Aunque el DSS actúa principalmente en el colon, donde produce una mayor inflamación, cada vez hay más estudios que revelan que otros tramos del intestino también se ven afectados. Matsuyoshi y cols.¹²⁰ describieron cómo la administración de DSS, aunque sólo indujo un proceso inflamatorio en el colon, fue capaz de alterar la motilidad en el íleon, produciendo contracciones espontáneas irregulares similares a las observadas en nuestro trabajo. Este efecto fue parcialmente revertido tras tratamiento con NG-nitro-L-arginina metil éster, más conocido como L-NAME, un inhibidor no específico de las NOS, sugiriendo un papel de estas enzimas en los efectos del DSS. En este trabajo, a pesar de no hallar inflamación en el estudio anatomopatológico del íleon, observaron un aumento de la expresión de la iNOS en el plexo mientérico de este en los ratones afectados por la colitis. Existe otro trabajo que ha demostrado que la administración de DSS inducía cambios morfológicos y bioquímicos en el intestino delgado, esta vez específicamente en el yeyuno¹²³. En sus experimentos, cuantificaron un aumento significativo en la expresión de la MPO y observaron un incremento en el tamaño de las vellosidades en los animales tratados con DSS, sugiriendo que estos cambios podrían estar asociados a una activación de la respuesta inmune innata provocada por el daño en el colon. Sin embargo, no hallaron ningún signo de daño en el íleon de los animales sometidos al modelo de colitis¹²³.

En nuestro estudio, la administración del DSS produjo en los animales una sintomatología caracterizada por pérdida de peso, presencia de sangre en heces y diarrea. El análisis macroscópico del colon reveló un acortamiento en su longitud y un aumento en el grosor de sus paredes, síntomas característicos de este modelo, indicando un proceso inflamatorio en el tejido¹²⁴. También se observó un daño directo en el tejido como adherencias, estenosis, edema o sangre en la luz intestinal principalmente. El daño en el tejido fue corroborado a través de un estudio histológico del colon, donde se observó una inflamación severa con destrucción masiva de la mucosa intestinal y gran cantidad de células inflamatorias infiltradas en la lámina propia, especialmente en el colon distal. Por otro lado, el estudio inmunohistológico confirmó una alteración de la barrera intestinal

debida a una pérdida en la expresión apical de la proteína de unión estrecha ZO-1. El análisis de muestras de colon distal mostró además un incremento en la concentración de determinados marcadores y enzimas proinflamatorias, como la MPO, la IL-6, la iNOS y la COX-2, y una disminución de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Respecto a la funcionalidad del tejido, el DSS produjo una alteración en el patrón motor del íleon y en su capacidad contráctil.

El tratamiento de la colitis con nuestro extracto de TR mostró un papel protector, dosis dependiente, frente al daño producido por DSS al mejorar la sintomatología clínica, la inflamación, el daño en el tejido y preservar la barrera epitelial intestinal. Además, el extracto consiguió normalizar la motilidad alterada en este modelo. El efecto antiinflamatorio y antioxidante mostrado por el extracto podría explicar estos efectos beneficiosos *in vivo* y estaría relacionado con su composición fitoquímica.

Para conocer el perfil fitoquímico de nuestro extracto se realizó una caracterización fitoquímica mediante un análisis de HPLC-DAD. Este análisis mostró un alto contenido en compuestos fenólicos (134.4 mg/g de extracto seco), incluyendo 10 ácidos fenólicos y 5 flavonoides, confirmando la presencia de compuestos bioactivos en este extracto de TR. De los compuestos fenólicos identificados, los más representativos fueron los ácidos hidroxicinámicos derivados del ácido cafeoilquínico (más de un 70% del extracto) dentro de los cuales los dos compuestos dominantes fueron los ácidos 3,4-di-*O*-cafeoilquínio y el 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (40,95 mg/g de extracto seco). El flavonoide más significativo fue la quercetina-3-*O*-galactósido, el cuarto de los compuestos del extracto, con una concentración de 15,16 mg/g de extracto seco. Además, se determinaron por primera vez pigmentos en el extracto, destacando la presencia de carotenoides y clorofilas, siendo la luteína la más representativa, con un contenido superior al 55% del total¹²⁵.

La administración vía oral de flavonoides aislados en altas concentraciones ha demostrado efectos beneficiosos en la colitis inducida por DSS en ratones. En general, consiguen disminuir la pérdida de peso y el daño en el tejido, demostrando una alta capacidad antiinflamatoria relacionada, según los autores, con la inhibición de la actividad del NF-κB como mecanismo principal^{126–128}.

El efecto protector de la quercitrina (1 mg/kg) ha sido demostrado *in vivo* gracias a su capacidad para disminuir el avance del daño ocasionado por el DSS y mejorar la recuperación de los animales. Este flavonoide ha mostrado una conservación de la estructura del intestino, mitigando la ulceración y la infiltración de células inflamatorias. Además, ha sido capaz de reducir la actividad de la MPO y la fosfatasa alcalina, ambas utilizadas como marcadores de inflamación, atribuyendo estos efectos a la inhibición del NF- κ B¹²⁶. Este trabajo se complementó con otro a posteriori, donde los autores descubrieron que este efecto protector era debido a la hidrolización de la quercitrina en quercetina por parte de la microbiota intestinal. Esta hipótesis coincidió con el hecho de que la quercetina hubiera obtenido mejores resultados antiinflamatorios *in vitro* y confirmó la implicación de la inhibición de la actividad del NF- κ B como uno de los mecanismos de acción principales¹²⁷.

Respecto al kaempferol, un estudio sobre el efecto de su administración aislada en la dieta en ratones tratados con DSS demostró cómo redujo los aumentos del ARNm de alguna de las principales citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6, la MPO y los niveles plasmáticos de mediadores proinflamatorios como la PGE2 en el colon¹²⁸. Estos resultados concuerdan con los resultados mostrados *in vitro*, donde se este efecto antiinflamatorio se atribuyó a su capacidad para inhibir el NF- κ B y STAT3¹²⁹.

Otro ejemplo lo encontramos en el galato de epigallocatequina, flavonol que representa aproximadamente un 30% del peso de las hojas de té verde secas¹³⁰. En un modelo de colitis, la administración vía oral de este flavonol junto con piperina, para mejorar su biodisponibilidad, redujo la aparición y gravedad de la sintomatología de la colitis y aumentó la supervivencia de los animales¹³¹. Al justificar su efecto, aunque se centraron más en su potencial antioxidante, también observaron cómo redujo la expresión de la IL-8, asociándolo de nuevo a la inhibición documentada *in vitro* de vías proinflamatorias como el NF- κ B, la IL-6 o el TNF- α ¹³¹.

Debido al carácter inflamatorio de la colitis ulcerosa, el efecto antiinflamatorio de los flavonoides es considerado su mecanismo de acción principal frente a las EII. Sin embargo, como ya se adelantó en la introducción de la fisiopatología de la colitis ulcerosa, la integridad de la barrera intestinal es otro de los factores clave en su desarrollo. Para mantener su estructura, las proteínas de unión estrecha desarrollan un papel crucial,

evitando su destrucción y el aumento de su permeabilidad¹³². De hecho, un estudio evidenció que, al menos en el modelo de colitis inducida por DSS, la pérdida de la expresión de la ZO-1 es un requisito del aumento de la permeabilidad que termina desencadenando la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los autores se muestran cautos a la hora de extrapolar estos resultados a la colitis ulcerosa humana, debido al mayor número de factores implicados en su desarrollo¹³³.

Esta relevancia de las TJ sobre el desarrollo de la colitis hace de la capacidad protectora de los flavonoides sobre ellas es uno de los factores fundamentales de su efecto beneficioso en las EII. Un estudio realizado en células Caco-2 demostró como la quercetina, el galato de epigallocatequina y el resveratrol evitaron la redistribución de la ZO-1 frente a la indometacina, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo, y previnieron la disminución de la expresión de la ZO-1 y la ocludina⁸⁸. Además, hay que tener en cuenta el efecto protector indirecto a través de la reducción de marcadores proinflamatorios que afectan a su regulación, como las citoquinas TNF- α e IL-6^{116,134} o el NF- κ B¹³⁵.

Otras propiedades beneficiosas descritas de los flavonoides, que justifican su papel protector en las enfermedades inflamatorias intestinales, son el incremento en la producción de moco o su acción prebiótica sobre la microbiota intestinal. A pesar de que no hayamos realizado un estudio al respecto en el té de roca, la presencia de estos compuestos bioactivos en su composición hace que no podamos obviar la posibilidad de que produzca estos efectos, aunque serían necesarios estudios complementarios que los justificaran.

El incremento en la producción de moco tendría una importante función al evitar el contacto directo del epitelio intestinal con los posibles agentes proinflamatorios que pudiera contener la luz del intestino. Estudios en modelos de enfermedades inflamatorias han investigado la modulación de su secreción, concluyendo que determinados polifenoles tienen un efecto directo incrementando su producción o mejorando su viscosidad, aunque sugieren estudios en mayor profundidad sobre este tema¹³⁶⁻¹³⁹.

Algunas revisiones describen los efectos resultantes de la interacción de los polifenoles con la microbiota intestinal sugiriendo un efecto sinérgico: estos modularían

la población microbiana hacia una más saludable, y a su vez la microbiota intervendría en su metabolismo y en el aumento de sus funciones beneficiosas para la salud^{85,86}. Este efecto ha sido observado por ejemplo tras la administración de quercetina, presente en el té de roca, el cual produjo una variación en el ratio de poblaciones de bacterias relacionadas con acciones beneficiosas sobre problemas metabólicos. En concreto, su administración *in vivo* durante 6-8 semanas fue capaz de aumentar la población de aquellas inversamente relacionadas con la obesidad (*Bacteroides vulgatus* y *Akkermansia muciniphila*) y reducir aquellas más abundantes en pacientes obesos (*Eubacterium cylindroides* y *Bilophila wadsworthia*)¹⁴⁰. Además, el incremento de la población de algunas cepas de microbiota pueden tener efectos directos saludables, como la producción por parte de los bacteroidetes o la *Akkermansia muciniphila* de ácidos grasos de cadena corta, que tienen un efecto antiinflamatorio y favorecen la degradación de compuestos xenobióticos, o la mejora en la estabilidad de las propiedades de la barrera intestinal, con efectos sobre las proteínas de unión estrecha y la mucosa¹⁴¹.

Respecto a los ácidos cafeoilquínicos, abundantes en nuestro extracto, representan un grupo de polifenoles vegetales presentes en distintas bebidas como cafés, tés o zumos, y son conocidos por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria¹⁴². Además de en distintos estudios *in vitro*, su papel protector *in vivo* también ha sido demostrado frente a la colitis ulcerosa. En un modelo de inducción de colitis por DSS, la administración oral del ácido 5-*O*-cafeoilquínico redujo los cambios morfológicos y el impacto de la enfermedad, supuestamente debido al bloqueo de la cascada inflamatoria y de la infiltración de neutrófilos gracias a la inhibición de la expresión de la IL-8 o la IL-1 β . Estos efectos fueron justificados por los autores debido a un posible bloqueo directo o indirecto de la vía NF- κ B, aunque expresaron la necesidad de estudios a nivel molecular para esclarecer el mecanismo de acción exacto¹⁴³. Zhang y sus colaboradores coincidirían con este trabajo en su estudio de 2017¹⁴⁴, donde, además de observar la reducción en la expresión de marcadores inflamatorios y la infiltración de células defensivas, notificaron un efecto prebiótico sobre la microbiota del intestino. La administración oral de este ácido cafeoilquínico disminuyó el ratio de *firmicutes* / *bacteroidetes*, menor en personas con un índice de masa corporal bajo¹⁴⁵, y aumentó la presencia de *Akkermansia muciniphila*, la cual tiene efectos positivos sobre el metabolismo de lípidos y la sintomatología de la colitis

inducidos por DSS¹⁴⁶. Finalmente, otra propiedad destacable en los procesos inflamatorios intestinales atribuida a los ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, 3,4-di-*O*-cafeoilquínico y 3,5-di-*O*-cafeoilquínico es su capacidad antiulcerogénica, a través del bloqueo de radicales libres, como el peroxinitrito, implicados en procesos de daño epitelial¹⁴⁷.

Respecto al último grupo de compuestos identificados en nuestro extracto, los carotenoides, han demostrado tener importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y su consumo se ha relacionado con la prevención de algunas enfermedades del colon, como las EII o el cáncer. Su efecto viene dado principalmente por su capacidad antioxidante, bloqueando radicales libres, a la vez que protegen de situaciones altamente oxidantes como la penetración de la radiación UV. Se conoce que el estrés oxidativo es capaz de activar procesos proinflamatorios como la vía del NF- κ B o el Nrf2, lo que confiere a los carotenoides una actividad antiinflamatoria indirecta, al ser capaces de inhibir radicales libres así como la expresión de marcadores inflamatorios, como la iNOS, la COX-2, el NO o la PGE2¹⁴⁸.

A pesar de ser unos candidatos idóneos para prevenir estas enfermedades, se ha observado que el nivel basal de carotenoides en sangre en pacientes con EII están disminuidos, posiblemente por problemas en su digestión y absorción debido a su carácter lipídico, lo que podría generar una disminución o retraso de sus efectos cuando se administran vía oral^{149,150}. Así, esta reducción en su concentración final en sangre puede llegar a afectar a la defensa antioxidante del organismo, favoreciendo un daño oxidativo tisular y reduciendo la capacidad para mantener la integridad de la barrera epitelial¹⁵¹.

En nuestro extracto destacan dos carotenoides biológicamente importantes, la luteína y el β -caroteno. En 2016, Głąbska y cols.¹⁵² estudiaron el efecto de la ingesta diaria de altas dosis de luteína junto con zeaxantina en un modelo de colitis ulcerosa en fase de remisión, demostrando que la administración de estos carotenoides era capaz de reducir la presencia de sangre, moco y pus en heces, aunque sin efecto sobre el dolor visceral. Tiempo después, en 2019, publicaron otro estudio complementario, analizando el impacto de los mismos retinoides sobre otros síntomas gastrointestinales de la colitis en fase de remisión¹⁵³. En este trabajo destacaron el efecto positivo de la combinación de luteína y la zeaxantina sobre la incidencia del estreñimiento. A pesar de estos resultados,

Głąbska y su equipo se mostraron cautos a la hora de hacer conclusiones, ya que este tipo de compuestos en la dieta están presentes en dosis menores a la suplementación dada y se encuentran junto con otras sustancias, como los flavonoides, advirtiendo que harían falta más estudios de su efecto conjunto.

Respecto al β -caroteno, aunque en el primer estudio de Głąbska y cols. no mostró efectos positivos aumentando incluso la presencia de moco fecal, otros autores han evidenciado su papel protector en un modelo murino de colitis aguda, reduciendo el daño local y sistémico a través de distintos mecanismos¹⁵⁴. En concreto, la administración de β -caroteno demostró presentar un papel protector en los ratones, al mejorar la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis y el daño al ADN localizado en el colon. Al estudiar su mecanismo de acción quedó demostrada la modulación de varios marcadores proinflamatorios, como el NF- κ B, la COX-2, el STAT3 o el Nrf2, y la protección del daño sobre la mucosa colónica, evitando la disminución en la expresión de proteínas de unión como la ocludina. Esto hizo posible que, además de reducir la clínica local al evitar la penetración de bacterias a la circulación sistémica e inhibir distintas vías proinflamatorias, mejorara la inflamación sistémica y la genotoxicidad¹⁵⁴.

A pesar de que el potencial terapéutico mostrado por estos compuestos ha sido observado de manera aislada y la dosis contenida en los 50 mg/kg administrados de nuestro extracto (7.4 μ g y 1ng de luteína y β -caroteno respectivamente) es menor a la utilizada en los estudios que evidencian su efecto^{148,152-154}, no se puede ignorar la contribución de estos compuestos bioactivos al efecto mostrado por el té de roca. Además, hay que tener en cuenta la posible sinergia entre todos los componentes, la cual ha demostrado en numerosas ocasiones tener una mayor importancia que los efectos de los compuestos aislados.

Uno de los posibles factores limitantes valorados en esta tesis doctoral ha sido la metabolización o degradación de los compuestos vegetales y sus componentes al administrarlos vía oral, lo que podría disminuir su efecto. De hecho, algunos autores ya han evidenciado cómo determinados polifenoles no eran capaces de llegar al colon debido a su absorción o degradación, o algunos carotenoides han mostrado malabsorción o la disminución de su efecto en procesos inflamatorios intestinales por la alteración de la pared intestinal^{127,128,150}. La respuesta a qué le podría pasar a nuestro extracto una vez en

el sistema digestivo se ha encontrado en un trabajo reciente. En este estudio, realizado con un extracto acuoso y otro metanólico de *Jasonia glutinosa*, analizaron las diferencias en su composición y su efecto antioxidante antes y después de someterlos a una digestión *in vitro*. Los resultados mostraron que los procesos digestivos modificaron en parte la composición de los extractos, reduciendo la concentración de compuestos fenólicos y ácidos cafeoilquínicos, aunque conservando una fracción significativa remanente. Además, aunque en menor medida, la actividad antioxidante también se mantuvo¹⁵⁵. Aplicando estos resultados a nuestro estudio y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos, se podría sugerir que el extracto de *Jasonia glutinosa* ha sido capaz de mantener una composición activa suficiente, a pesar de los procesos digestivos, para demostrar un efecto protector a nivel del sistema digestivo.

Sobre los mecanismos por los cuales nuestro extracto de TR ha ejercido una eficacia terapéutica en la colitis inducida por DSS, en vista de los resultados mostrados sobre los ratones y los efectos descritos de sus componentes sobre modelos similares, es probable que sea debida a una combinación de efectos antiinflamatorios, antioxidantes y protectores del epitelio.

Respecto a la actividad antiinflamatoria, nuestro extracto de *Jasonia glutinosa* ha mostrado actuar a través de distintos mecanismos. Al analizar la expresión de distintos biomarcadores de inflamación en las muestras de tejido colónico extraídas a los ratones, el extracto de TR anuló parte del efecto del DSS, disminuyendo el aumento en la actividad de la MPO y la expresión de la IL-6, y las enzimas COX-2 e iNOS. Sin embargo, no mostró efectos a nivel de la IL-10. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en algunos estudios ya nombrados, realizados con algunos compuestos presentes en el extracto, donde los autores relacionaron dicha actividad con la inhibición de la vía del NF- κ B^{126,128,148}.

El estudio del efecto antiinflamatorio fue completado a través de unos estudios *in vitro* recogidos en la tercera publicación de la tesis doctoral¹²⁵. Por un lado, el extracto de TR inhibió la actividad de la enzima 5-LOX, necesaria para la síntesis de moléculas proinflamatorias, concretamente los leucotrienos¹⁵⁶, lo que explicaría parte de la disminución del grado de inflamación en los ratones. Inhibidores de esta enzima se han encontrado en diferentes extractos de plantas con semejanzas en la composición al

extracto de té de roca, como el *Hypericum perforatum* L. o el *Citrus reticulata*, ricos en flavonoides y en ácidos cafeoilquínicos respectivamente. Por otro lado, nuestro extracto consiguió disminuir de manera significativa la producción de NO y TFN- α inducida por LPS en un modelo de macrófagos J774.2 murinos. La inhibición de estos marcadores no sólo produce una acción antiinflamatoria directa^{157,158}, sino que se ha establecido una relación de estas con la regulación de la contractilidad y motilidad intestinal¹²¹, la cual discutiremos más adelante. El conjunto de estos hallazgos sugiere un potente efecto antiinflamatorio del extracto de *Jasonia glutinosa*, involucrando diferentes vías de señalización.

Este perfil antiinflamatorio comparte similitudes con otros extractos de plantas con composiciones parecidas a *Jasonia glutinosa*. Así, el extracto metanólico de kudingcha, un té tradicional chino extraído de las hojas del *Ilex kudingcha* CJ. Tseng¹¹⁴, ha demostrado efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, diabetes, obesidad, inflamación o daño cardiovascular, hepático o neurológico. En su composición se encuentran numerosos polifenoles, donde destacan los ácidos cafeoilquínicos y derivados, presentes en nuestro extracto. Respecto a su mecanismo de acción, este extracto ha demostrado ser antioxidante, aumentando los niveles colónicos de glutatión y reduciendo la generación de malondialdehído, inmunomodulador, disminuyendo la infiltración de neutrófilos y macrófagos y los niveles de MPO, y antiinflamatorio, reduciendo la actividad del TNF- α , y las IL-1 β e IL-6, así como la disminución en la expresión de ARNm de la iNOS y la COX-2 en el tejido colónico, vitales en el proceso de inflamación de la CU. El extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera*, una planta endémica de México utilizada de manera tradicional para el tratamiento de desórdenes digestivos y con una composición similar al extracto de TR, demostró un papel protector parecido frente a la colitis, al reducir la sintomatología y el daño en el tejido colónico. Este efecto se asoció a su capacidad antiinflamatoria, evidenciado por la menor expresión de citoquinas proinflamatorias en el colon como el TNF- α y una disminución de la actividad de la MPO¹⁵⁹. Además de este efecto antiinflamatorio, los autores destacaron el efecto antioxidante del extracto, relacionando ambas propiedades con su composición.

Aunque esta tesis se ha centrado más en el papel antiinflamatorio del té de roca, su actividad antioxidante también ha sido estudiada. El extracto de TR mostró un efecto antioxidante al inhibir, de manera dosis dependiente, la producción de radicales de

oxígeno generados en el paso de xantina a xantina oxidasa, en la inhibición de la propia xantina oxidasa y en la eliminación de radicales superóxidos generados por el sistema NADH/PMS (la oxidación de nicotin adenin dinucleótido reducida (NADH) por metosulfato de fenazina (PMS)). Aunque en estos ensayos las CI_{50} no fueron especialmente significativas en comparación con las observadas en otros compuestos ricos en polifenoles, se debe tener en cuenta la posible contribución a su efecto global¹⁶⁰.

Además de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes, nuestro extracto ha demostrado un efecto protector sobre el epitelio intestinal, al conservar la expresión de ZO-1 en los enterocitos y mantener una barrera intestinal íntegra. Las proteínas de unión estrecha son esenciales para que el epitelio intestinal mantenga su función de barrera y su pérdida es uno de los síntomas más graves en las patologías inflamatorias intestinales. Además de permitir la penetración de antígenos luminales, la inflamación indirecta que provocan, ya explicada en la fisiopatología de la colitis ulcerosa, puede provocar una pérdida de la homeostasis del epitelio intestinal, alterando los procesos de absorción y secreción intestinal^{133,161}.

La capacidad del extracto para proteger la estructura de la barrera intestinal podría estar relacionada con su papel antiinflamatorio. Se ha observado que algunas citoquinas proinflamatorias aumentan la permeabilidad paracelular, posiblemente debido a cambios en la expresión, localización y/o composición de las proteínas de unión estrecha¹¹⁸. Un estudio demostró cómo la IL-6 produjo alteraciones en la permeabilidad funcional en un modelo de células endoteliales, posiblemente causadas por los cambios observados como la contracción celular, una distribución irregular de la ZO-1 y una desorganización de la actina intracelular¹¹⁶. Del mismo modo, se ha demostrado cómo el TNF- α es capaz de aumentar la permeabilidad de las TJ en células Caco-2 a través de la activación del NF-kB, asociando estos resultados con una alteración en la expresión y localización de la ZO-1¹³⁴.

Algunos autores han encontrado esta relación entre el efecto antiinflamatorio y la protección de las TJ en otros extractos vegetales, relacionándolo con su efecto protector sobre la colitis. El extracto de hojas de *Acer palmatum thumb.* previno el daño causado por la IL-6 en las proteínas de unión estrecha ZO-1 y ocludina y la disfunción de la barrera intestinal de las células epiteliales Caco-2. Además, en un modelo de colitis, de manera similar a nuestros resultados, el extracto previno la sintomatología y los cambios

morfológicos típicos del DSS, como la pérdida de peso o el acortamiento del colon. También conservó la expresión de la ZO-1 y la ocludina en el tejido colónico a niveles incluso superiores a los basales, redujo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α y la infiltración de macrófagos en las criptas, seguramente debido a la reducción de la actividad de la MPO¹⁶². Resultados similares fueron observados en el extracto de corteza de *Alnus japonica*, cuya composición cuenta con la presencia de triterpenos y flavonoides. Los autores destacaron su efecto protector frente al efecto del DSS sobre la expresión de ZO-1 y ocludina y la reducción en la expresión de citoquinas proinflamatorias¹⁶³. En base a la bibliografía, cabe pensar que la reducción de dichas citoquinas por parte del extracto de TR podría ser clave para proteger las proteínas de unión de estrecha del epitelio intestinal.

En cuanto a la mejora en la sintomatología clínica observada en los animales durante el desarrollo de la colitis, el extracto de TR fue eficaz durante los primeros 3 días del tratamiento con DSS, pero no durante los siguientes 4 días. Además, el extracto de TR mejoró esta sintomatología significativamente durante el periodo de recuperación, es decir, después del cese del estímulo inflamatorio. Al comparar el efecto del extracto con la sulfasalazina, un antiinflamatorio estándar en el tratamiento de la colitis ulcerosa, nuestro extracto mostró una eficacia similar o incluso mejor, teniendo en cuenta que la SSZ no fue capaz de mejorar la sintomatología clínica de los animales durante el periodo de recuperación. Al valorar el daño en el tejido, tanto a nivel macroscópico como microscópico, el extracto de TR evitó en gran medida, de manera dosis dependiente, la reducción de la longitud del colon y el engrosamiento de su pared. Estos efectos fueron similares a los producidos por la SSZ.

Es bastante habitual encontrar la SSZ, medicamento referente en modelos de colitis, como fármaco control para comparar el efecto terapéutico producido por los compuestos naturales en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal. Al igual que en este trabajo, la administración de un concentrado de polifenoles del té verde redujo, de manera similar a la SSZ, la pérdida de peso y la expresión de citoquinas proinflamatorias, mostrando incluso mejores resultados respecto a la pérdida de peso que este fármaco de referencia¹⁶⁴. Resultados similares se han encontrado también al estudiar algunos alimentos, como la granada (*Punica granatum*)¹⁶⁵, o extractos de plantas, como el de las

hojas de *Sasa queipaertensis*¹²⁴, ambos ricos en polifenoles, los cuales mostraron una eficacia terapéutica similar a la SSZ.

Para finalizar, el extracto de TR demostró, de manera dosis dependiente, ser capaz de regular la función motora del íleon, alterada por el DSS. El extracto de TR coordinó las contracciones espontáneas del íleon y mantuvo la amplitud de las ondas lentas y su capacidad contráctil ante agentes externos. Estos resultados están en línea con el trabajo del TR anteriormente nombrado, donde se demostró que el extracto de *Jasonia glutinosa*, a una dosis de 50 mg/kg, normalizó el tránsito gastrointestinal total alterado por el DSS¹⁶⁶.

La alteración de la motilidad gastrointestinal es un síntoma característico de la colitis ulcerosa, reproducido en los modelos de inflamación por DSS. El daño epitelial provoca un aumento en la permeabilidad de la barrera intestinal, generando una infiltración de sustancias exógenas irritantes que desencadena una fuerte respuesta inmune con liberación de citoquinas y células inmunológicas en la zona. Esta reacción, ya comentada, produce alteraciones directas e indirectas sobre la contractibilidad intestinal^{123,167}. Es por ello por lo que el efecto protector mostrado por el té de roca sobre la función motora podría deberse a la disminución de los mediadores inflamatorios locales producida por el extracto, tal y como se ha demostrado con otros extractos vegetales. Un ejemplo lo encontramos en un extracto de *Curcuma longa*, rico en compuestos fenólicos donde destaca la curcumina. El estudio del efecto de dicho extracto sobre la contractibilidad intestinal en segmentos aislados de íleon y colon mediante baño de órganos tras un modelo experimental de colitis inducida por DSS reveló cómo, al igual que el TR, la administración oral del extracto de cúrcuma normalizó la contractibilidad de los segmentos intestinales a un patrón casi fisiológico en aquellos animales que habían experimentado la colitis. Este efecto beneficioso sobre la contractibilidad fue atribuido al efecto antiinflamatorio conocido de la cúrcuma, a través de la inhibición de la vía de activación del NF- κ B¹⁶⁸. En un modelo de estreñimiento, la administración oral de un extracto acuoso de *Ficus carica* demostró tener un efecto beneficioso sobre la conservación de la función motora intestinal¹⁶⁹. Este extracto, rico en flavonoides y ácidos fenólicos, mejoró la velocidad del tránsito intestinal y de vaciado gástrico frente a un estreñimiento forzado por loperamida, gracias a un efecto protector del epitelio y acciones antiinflamatorias y antioxidantes. Aunque este último modelo no es tan parecido

al nuestro como los anteriores, igualmente evidencia la capacidad de los compuestos bioactivos presentes en el TR para modular la contractibilidad y la motilidad intestinal, relacionándola de nuevo con los efectos demostrados en nuestros experimentos.

En conclusión, la administración oral de un extracto de *Jasonia glutinosa* ha demostrado tener un efecto protector en un modelo murino de colitis inducido por DSS. La actividad antiinflamatoria y el efecto antioxidante mostrados por el extracto de TR serían los responsables de retrasar y mejorar la sintomatología característica de la colitis, reducir el daño en el colon, preservar la integridad de la barrera intestinal y normalizar las alteraciones sobre la contractilidad de la musculatura lisa del íleon. Este potencial farmacológico, que podría estar relacionado con la composición fitoquímica del extracto, hacen del TR una potencial terapia alternativa o coadyuvante en la prevención y/o tratamiento de la colitis ulcerosa u otros procesos inflamatorias intestinales.

5.4 REFERENCIAS

1. Du C, Chen S, Wan H, et al. Different functional roles for K⁺ channel subtypes in regulating small intestinal glucose and ion transport. *Biol Open*. 2019;8(7). doi:10.1242/bio.042200
2. Wulff H, Köhler R. Endothelial Small-Conductance and Intermediate-Conductance K_{Ca} Channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;61(2):102-112. doi:10.1097/FJC.0b013e318279ba20
3. Hamilton KL, Devor DC. *Ion Channels and Transporters of Epithelia in Health and Disease*. Springer New York; 2016. doi:10.1007/978-1-4939-3366-2
4. Rufo PA, Jiang L, Moe SJ, Brugnara C, Alper SL, Lencer WI. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits Cl⁻ secretion by polarized monolayers of human colonic epithelial cells. *J Clin Invest*. 1996;98(9):2066-2075. doi:10.1172/JCI119012
5. Devor DC, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca⁽²⁺⁾-dependent K⁺ channel. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 1996;271(5):L775-L784. doi:10.1152/ajplung.1996.271.5.L775
6. Devor DC, Singh AK, Lambert LC, DeLuca A, Frizzell RA, Bridges RJ. Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelia cells. 1999;113(5):743-760. doi:10.1085/jgp.113.5.743
7. Warth R, Hamm K, Bleich M, et al. Molecular and functional characterization of the small Ca²⁺-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 1999;438(4):437-444. doi:10.1007/s004249900059
8. Joiner WJ, Wang LUY, Tang MD, Kaczmarek LK. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):11013-11018. doi:10.1073/pnas.94.20.11013
9. Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad*

- Sci.* 1997;94(21):11651-11656. doi:10.1073/pnas.94.21.11651
10. Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(52):32723-32726. doi:10.1074/jbc.272.52.32723
 11. Furness JB, Kearney K, Robbins HL, et al. Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2004;112(1-2):93-97. doi:10.1016/j.autneu.2004.02.003
 12. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1958;30(3):653-654. doi:10.1016/0006-3002(58)90124-0
 13. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2003;285(6 54-6). doi:10.1152/ajpcell.00186.2003
 14. Wulff H, Castle NA. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: Recent advances and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010;3(3):385-396. doi:10.1586/ecp.10.11
 15. Köhler R, Wulff H, Eichler I, et al. Blockade of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel as a New Therapeutic Strategy for Restenosis. *Circulation.* 2003;108(9):1119-1125. doi:10.1161/01.CIR.0000086464.04719.DD
 16. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem.* 2000;275(47):37137-37149. doi:10.1074/jbc.M003941200
 17. Cruse G, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P. Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax.* 2006;61(10):880-885. doi:10.1136/thx.2006.060319
 18. Peña TL, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK up-regulation of the

- fibroblast K(Ca) channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β suppression of myogenesis. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13677-13682. doi:10.1074/jbc.275.18.13677
19. Wulff H, Knaus H-G, Pennington M, Chandy KG. K⁺ Channel Expression during B Cell Differentiation: Implications for Immunomodulation and Autoimmunity . *J Immunol*. 2004;173(2):776-786. doi:10.4049/jimmunol.173.2.776
 20. Eichler I, Wibawa J, Grgic I, et al. Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol*. 2003;138(4):594-601. doi:10.1038/sj.bjp.0705075
 21. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(8):374-380. doi:10.1016/s0165-6147(02)02050-3
 22. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses - relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2009;157(4):509-526. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x
 23. Dalsgaard T, Kroigaard C, Simonsen U. Calcium-activated potassium channels a therapeutic target for modulating nitric oxide in cardiovascular disease? *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14(8):825-837. doi:10.1517/14728222.2010.500616
 24. Coleman N, Brown BM, Oliván-Viguera A, et al. New Positive Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Gating Modulators with Selectivity for KCa3.1. *Mol Pharmacol*. 2014;86:342-357. doi:10.1165/rcmb.2006-0358OC
 25. Oliván-Viguera A, Valero MS, Murillo MD, et al. Novel Phenolic Inhibitors of Small/Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels, KCa3.1 and KCa2.3. *PLoS One*. 2013;8(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0058614
 26. Valero MS, Ramón-Gimenez M, Lozano-Gerona J, et al. KCa3.1 Transgene Induction in Murine Intestinal Epithelium Causes Duodenal Chyme Accumulation and Impairs Duodenal Contractility. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1193. doi:10.3390/ijms20051193

27. Mohr CJ, Steudel FA, Gross D, et al. Cancer-Associated Intermediate Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel KCa3.1. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1). doi:10.3390/cancers11010109
28. Lozano-Gerona J, Oliván-Viguera A, Delgado-Wicke P, et al. Conditional KCa3.1-transgene induction in murine skin produces pruritic eczematous dermatitis with severe epidermal hyperplasia and hyperkeratosis. *PLoS One*. 2020;15(3). doi:10.1371/journal.pone.0222619
29. Hojman P, Eriksen J, Gehl J. Tet-on induction with doxycycline after gene transfer in mice: Sweetening of drinking water is not a good idea. *Anim Biotechnol*. 2007;18(3):183-188. doi:10.1080/10495390601105055
30. Halm ST, Liao T, Halm DR. Distinct K⁺ conductive pathways are required for Cl⁻ and K⁺ secretion across distal colonic epithelium. *Am J Physiol Physiol*. 2006;291(4):C636-C648. doi:10.1152/ajpcell.00557.2005
31. He J, Yang X, Guo Y, et al. Ca²⁺ signaling in HCO₃⁻ secretion and protection of upper GI tract. *Oncotarget*. 2017;8(60):102681-102689. doi:10.18632/oncotarget.21840
32. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*. 2002;82(1):245-289. doi:10.1152/physrev.00026.2001
33. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, et al. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47681-47687. doi:10.1074/jbc.M409627200
34. Matos JE, Sausbier M, Beranek G, Sausbier U, Ruth P, Leipziger J. Role of cholinergic-activated K Ca 1.1 (BK), K Ca 3.1 (SK4) and K V 7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl⁻ secretion. *Acta Physiol*. 2007;189(3):251-258. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01646.x
35. Flores CA, Melvin JE, Figueroa CD, Sepúlveda F V. Abolition of Ca²⁺-mediated intestinal anion secretion and increased stool dehydration in mice lacking the intermediate conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channel Kcnn4. *J Physiol*. 2007;583(2):705-717. doi:10.1113/jphysiol.2007.134387

36. Snell GD. *Biology of the Laboratory Mouse*. (Snell GD, ed.). Oxford, England: Blakiston; 1941.
37. Oliván-Viguera A, Valero MS, Coleman N, et al. A novel pan-negative-gating modulator of KCa_{2/3} channels, fluoro-di-benzoate, RA-2, inhibits endothelium-derived hyperpolarization-type relaxation in coronary artery and produces bradycardia in vivo. *Mol Pharmacol*. 2015;87(2):338-348. doi:10.1124/mol.114.095745
38. Laría C. Estudio de las moléculas SKA-111 , TRAM-34 y arterias coronarias porcinas. Proyecto de Fin de Grado. 2013.
39. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(4):C769-83. doi:10.1152/ajpcell.00529.2004
40. Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol*. 1899;24(2):99-143. doi:10.1113/jphysiol.1899.sp000752
41. Lynn P, Zagorodnyuk V, Hennig G, Costa M, Brookes S. Mechanical activation of rectal intraganglionic laminar endings in the guinea pig distal gut. *J Physiol*. 2005;564(2):589-601. doi:10.1113/jphysiol.2004.080879
42. Larsson M, Arvidsson S, Ekman C, Bayati A. A model for chronic quantitative studies of colorectal sensitivity using balloon distension in conscious mice - Effects of opioid receptor agonists. *Neurogastroenterol Motil*. 2003;15(4):371-381. doi:10.1046/j.1365-2982.2003.00418.x
43. Brierley SM, Jones RCW, Gebhart GF, Blackshaw LA. Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology*. 2004;127(1):166-178. doi:10.1053/j.gastro.2004.04.008
44. Booth CE, Shaw J, Hicks GA, Kirkup AJ, Winchester W, Grundy D. Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20(2):149-158. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.01003.x

45. Lu X, Zhang Z, Choy JS, Kassab GS. Role of distension on duodenal and colonic contractility in mice: a novel myograph for intestines. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24(5):487-493. doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01883.x
46. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68(1):307-343. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094718
47. Hirst GDS, Edwards FR. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(1):1-10. doi:10.1254/jphs.crj04002x
48. Al-Shboul O. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi J Gastroenterol.* 2013;19(1):3-15. doi:10.4103/1319-3767.105909
49. Lyford GL, Farrugia G. Ion channels in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(6):583-587. doi:10.1016/J.COPH.2003.06.010
50. Okada T, Sasaki F, Honda S, et al. Disorders of interstitial cells of Cajal in a neonate with segmental dilatation of the intestine. *J Pediatr Surg.* 2010;45(6). doi:10.1016/j.jpedsurg.2010.03.024
51. Jabari S, da Silveira ABM, de Oliveira EC, et al. Interstitial cells of Cajal: crucial for the development of megacolon in human Chagas' disease? *Color Dis.* 2013;15(10):e592-e598. doi:10.1111/codi.12331
52. Adachi Y, Ishii Y, Yoshimoto M, et al. Phenotypic alteration of interstitial cells of Cajal in idiopathic sigmoid megacolon. *J Gastroenterol.* 2008;43:626-631. doi:10.1007/s00535-008-2207-4
53. He CL, Burgart L, Wang L, et al. Decreased interstitial cell of Cajal volume in patients with slow- transit constipation. *Gastroenterology.* 2000;118(1):14-21. doi:10.1016/S0016-5085(00)70409-4
54. Chang IY, Glasgow NJ, Takayama I, Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction. *J Physiol.* 2001;536(2):555-568. doi:10.1111/j.1469-

- 7793.2001.0555c.xd
55. Won K-J, Suzuki T, Hori M, Ozaki H. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol Motil.* 2006;18(1):53-61. doi:10.1111/j.1365-2982.2005.00718.x
 56. Haldar S, Dru C, Choudhury D, et al. Inflammation and pyroptosis mediate muscle expansion in an interleukin-1 β (IL-1 β)-dependent manner. *J Biol Chem.* 2015;290(10):6574-6583. doi:10.1074/jbc.M114.617886
 57. Grgic I, Kaistha BP, Paschen S, et al. Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2009;458(2):291-302. doi:10.1007/s00424-008-0619-x
 58. Si H, Heyken W-T, Wölfle SE, et al. Impaired Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Dilations and Increased Blood Pressure in Mice Deficient of the Intermediate-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel. *Circ Res.* 2006;99(5):537-544. doi:10.1161/01.RES.0000238377.08219.0c
 59. Lambertsen KL, Gramsbergen JB, Sivasaravanaparan M, et al. Genetic KCa3.1-Deficiency Produces Locomotor Hyperactivity and Alterations in Cerebral Monoamine Levels. Dryer SE, ed. *PLoS One.* 2012;7(10):e47744. doi:10.1371/journal.pone.0047744
 60. Chen Y-J, Nguyen HM, Maezawa I, et al. The potassium channel KCa3.1 constitutes a pharmacological target for neuroinflammation associated with ischemia/reperfusion stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(12):2146-2161. doi:10.1177/0271678X15611434
 61. Pardo de Santayana M, Morales R. Consideraciones sobre el género Jasonia (Compositae, Inuleae). Sistemática y usos. *Acta Bot Malacit.* 2004;29:221-232. doi:10.24310/abm.v29i0.7232
 62. Pardo de Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: An ethnopharmaco-botanical review. *J Ethnopharmacol.* 2005;98(1-2):1-19.

doi:10.1016/j.jep.2004.11.003

63. López V, Akerreta S, Casanova E, García-Mina J, Cavero R, Calvo M. Screening of Spanish Medicinal Plants for Antioxidant and Antifungal Activities. *Pharm Biol.* 2008;46(9):602-609. doi:10.1080/13880200802179634
64. Bermejo BP, Abad MJ, Díaz AM, Villaescusa L, González MA, Silván AM. Sesquiterpenes from *Jasonia glutinosa*: in vitro anti-inflammatory activity. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(1):1-4. doi:10.1248/bpb.25.1
65. Villaescusa-Castillo L, Díaz-Lanza AM, Gasquet M, et al. Antiprotozoal Activity of Sesquiterpenes from *Jasonia Glutinosa*. *Pharm Biol.* 2000;38(3):176-180. doi:10.1076/1388-0209(200007)3831-SFT176
66. Valero MS, Oliván-Viguera A, Garrido I, et al. Rock Tea extract (*Jasonia glutinosa*) relaxes rat aortic smooth muscle by inhibition of L-type Ca²⁺ channels. *J Physiol Biochem.* 2015;71(4):785-793. doi:10.1007/s13105-015-0442-8
67. Brozovich F V, Nicholson CJ, Degen C V, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):476-532. doi:10.1124/pr.115.010652
68. Murthy KS. SIGNALING FOR CONTRACTION AND RELAXATION IN SMOOTH MUSCLE OF THE GUT. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:345-374. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707
69. Hall JE, Guyton AC. *Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica.* 13th ed. (Casanova DXG, ed.). Barcelona: Elsevier; 2016. www.meddics.com. Accessed November 7, 2019.
70. Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Japanese J Smooth Muscle Res.* 1984;20(6):427-444. doi:10.1540/jsmr1965.20.427
71. Valero MS, Fagundes DS, Grasa L, Arruebo MP, Plaza MÁ, Murillo MD. Contractile effect of tachykinins on rabbit small intestine. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(4):487-494. doi:10.1038/aps.2010.227

72. White EJ, Bradford HF. Participation of intracellular sites in the action of Ca²⁺ channel blockers. *Eur J Pharmacol.* 1986;130(3):243-248. doi:10.1016/0014-2999(86)90274-8
73. Barbieri R, Coppo E, Marchese A, et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res.* 2017;196:44-68. doi:10.1016/j.micres.2016.12.003
74. Phan MAT, Paterson J, Bucknall M, Arcot J. Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(8):1310-1329. doi:10.1080/10408398.2016.1254595
75. Yarnell E, Abascal K. Spasmolytic Botanicals: Relaxing Smooth Muscle with Herbs. *Altern Complement Ther.* 2011;17(3):169-174. doi:10.1089/act.2011.17305
76. Annaházi A, Róka R, Rosztóczy A, Wittmann T. Role of antispasmodics in the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(20):6031-6043. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6031
77. Martínez-Pérez EF, Juárez ZN, Hernández LR, Bach H. Natural Antispasmodics: Source, Stereochemical Configuration, and Biological Activity. *Biomed Res Int.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/3819714
78. Gálvez J, Sánchez De Medina F, Jiménez J, Zarzuelo A. Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders. *Stud Nat Prod Chem.* 2001;25(PART F):607-649. doi:10.1016/S1572-5995(01)80019-3
79. Rubio B, Villaescusa L, Diaz A, Fernandez L, Martin T. Flavonol Glycosides from *Scolymus hispanicus* and *Jasonia glutinosa*. *Planta Med.* 1995;61(06):583-583. doi:10.1055/s-2006-959386
80. Guillén MD, Ibargoitia ML. Volatile components obtained from the leaves of *Jasonia glutinosa*. *Food Chem.* 1996;56(2):155-158. doi:10.1016/0308-8146(95)00156-5
81. Bors W, Michel C. Chemistry of the Antioxidant Effect of Polyphenols. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957(1):57-69. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02905.x
82. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among

- dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18(9):567-579. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.10.007
83. Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menéndez JA, for the Bioactive Food Components P. Polyphenols and the Modulation of Gene Expression Pathways: Can We Eat Our Way Out of the Danger of Chronic Disease? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(8):985-1001. doi:10.1080/10408398.2011.621772
84. Barnett MPG, Cooney JM, Dommels YEM, et al. Modulation of colonic inflammation in Mdr1a^{-/-} mice by green tea polyphenols and their effects on the colon transcriptome and proteome. *J Nutr Biochem*. 2013;24(10):1678-1690. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.02.007
85. Dueñas M, Muñoz-González I, Cueva C, et al. A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-15. doi:10.1155/2015/850902
86. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *Eur J Nutr*. 2015;54(3):325-341. doi:10.1007/s00394-015-0852-y
87. Bergmann H, Rogoll D, Scheppach W, Melcher R, Richling E. The Ussing type chamber model to study the intestinal transport and modulation of specific tight-junction genes using a colonic cell line. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(10):1211-1225. doi:10.1002/mnfr.200800498
88. Carrasco-Pozo C, Morales P, Gotteland M. Polyphenols Protect the Epithelial Barrier Function of Caco-2 Cells Exposed to Indomethacin through the Modulation of Occludin and Zonula Occludens-1 Expression. *J Agric Food Chem*. 2013;61(22):5291-5297. doi:10.1021/jf400150p
89. Chen YA, Tsai JC, Cheng KC, Liu KF, Chang CK, Hsieh CW. Extracts of black garlic exhibits gastrointestinal motility effect. *Food Res Int*. 2018;107:102-109. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.003
90. Chandra P, Sachan N, Pal D. Protective effect of *Dalbergia sissoo* Roxb. ex DC. (family: Fabaceae) leaves against experimentally induced diarrhoea and peristalsis

- in mice. *Toxicol Ind Health*. 2015;31(12):1229-1235. doi:10.1177/0748233713491815
91. Formica J V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995;33(12):1061-1080. doi:10.1016/0278-6915(95)00077-1
 92. Palombo EA. Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. *Phyther Res*. 2006;20(9):717-724. doi:10.1002/ptr.1907
 93. Beretz A, Anton R, Stoclet JC. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia*. 1978;34(8):1054-1055. doi:10.1007/BF01915343
 94. Petkov E, Uzunov P, Kostova I, Somleva T, Ognyanov I. Inhibition of rat heart phosphodiesterase by some rotenoids and isoflavonoids. *Planta Med*. 1983;47(4):237-239. doi:10.1055/s-2007-969996
 95. Abdalla S, Zarga MA, Afifi F, Al-Khalil S, Mahasneh A, Sabri S. Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J Pharm Pharmacol*. 1989;41(2):138-141. doi:10.1111/j.2042-7158.1989.tb06413.x
 96. Hammad HM, Abdalla SS. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmacol*. 1997;28(5):767-771. doi:10.1016/s0306-3623(96)00299-6
 97. Gharzouli K, Holzer P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology*. 2004;70(1):5-14. doi:10.1159/000074237
 98. Santos-Fagundes D, Grasa L, Gonzalo S, et al. Different mechanisms of actions of genistein and quercetin on spontaneous contractions of rabbit duodenum. *Rev esp enfeRm dig*. 2015;107:413-416. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023
 99. Imtiaz SM, Aleem A, Saqib F, Ormenisan AN, Neculau AE, Anastasiu CV. The potential involvement of an ATP-dependent potassium channel-opening

- mechanism in the smooth muscle relaxant properties of *Tamarix dioica roxb.* *Biomolecules*. 2019;9(11). doi:10.3390/biom9110722
100. Ventura-Martínez R, Ángeles-López GE, Rodríguez R, González-Trujano ME, Déciga-Campos M. Spasmolytic effect of aqueous extract of *Tagetes erecta* L. flowers is mediated through calcium channel blockade on the guinea-pig ileum. *Biomed Pharmacother*. 2018;103:1552-1556. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.166
101. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F, Autore G. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phyther Res*. 1994;8(1):42-45. doi:10.1002/ptr.2650080110
102. Gim H, Nam JH, Lee S, et al. Quercetin inhibits pacemaker potentials via nitric oxide/cGMP-dependent activation and TRPM7/ANO1 channels in cultured interstitial cells of cajal from mouse small intestine. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2422-2436. doi:10.1159/000374043
103. Di Carlo G, Autore G, Izzo AA, et al. Inhibition of Intestinal Motility and Secretion by Flavonoids in Mice and Rats: Structure-activity Relationships. *J Pharm Pharmacol*. 1993;45(12):1054-1059. doi:10.1111/j.2042-7158.1993.tb07180.x
104. Jabeen A, Mesaik MA, Simjee SU, Lubna, Bano S, Faizi S. Anti-TNF- α and anti-arthritic effect of patuletin: A rare flavonoid from *Tagetes patula*. *Int Immunopharmacol*. 2016;36:232-240. doi:10.1016/j.intimp.2016.04.034
105. Yuan H, Ma Q, Cui H, et al. How can synergism of traditional medicines benefit from network pharmacology? *Molecules*. 2017;22(7). doi:10.3390/molecules22071135
106. Nigusse T, Zhang L, Wang R, Wang X, Li J, Liu C. Flavonoids in a crude extract of *Catha edulis* inhibit rat intestinal contraction via blocking Ca²⁺ channels. *Neurogastroenterol Motil*. 2019;31(7):e13602. doi:10.1111/nmo.13602
107. Whitem CG, Williams AD, Williams CS. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp*. 2010;(35):e1652. doi:10.3791/1652
108. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014;(SUPPL.104).

- doi:10.1002/0471142735.im1525s104
109. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*. 2009;4(6). doi:10.1371/journal.pone.0006073
 110. Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, et al. Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0032084
 111. Ardizzone S, Porro GB. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2005;65(16):2253-2286. doi:10.2165/00003495-200565160-00002
 112. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2007;149(4):173-186. doi:10.1016/j.trsl.2006.11.009
 113. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):428-435. doi:10.1016/j.jep.2010.04.047
 114. Song J Le, Qian Y, Li GJ, Zhao X. Anti-inflammatory effects of kudingcha methanol extract (*Ilex kudingcha* C.J. Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Mol Med Rep*. 2013;8(4):1256-1262. doi:10.3892/mmr.2013.1635
 115. Fransen L, Ruyschaert MR, Van der Heyden J, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: Species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol*. 1986;100(1):260-267. doi:10.1016/0008-8749(86)90025-0
 116. Desai TR, Leeper NJ, Hynes KL, Gewertz BL. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. *J Surg Res*. 2002;104(2):118-123. doi:10.1006/jsre.2002.6415
 117. Yang R, Han X, Uchiyama T, et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(3 48-3). doi:10.1152/ajpgi.00177.2003
 118. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2009;1788(4):864-871. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.027

119. Bassotti G, Antonelli E, Villanacci V, Baldoni M, Dore MP. Colonic motility in ulcerative colitis. *United Eur Gastroenterol J*. 2014;2(6):457-462. doi:10.1177/2050640614548096
120. Matsuyoshi H, Nakagawa T, Zhang GX, et al. Changes in contractile and electrical activity in the ileum of DSS-induced colitis model W/Wv mutant mice. *J Smooth Muscle Res*. 2010;46(3):143-156. doi:10.1540/jsmr.46.143
121. Ford CL, Wang Y, Morgan K, et al. Interferon-gamma depresses human intestinal smooth muscle cell contractility: Relevance to inflammatory gut motility disturbances. *Life Sci*. 2019;222:69-77. doi:10.1016/J.LFS.2019.01.059
122. Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, et al. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: Clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci*. 1999;44(7):1458-1475. doi:10.1023/A:1026620322859
123. Yazbeck R, Howarth GS, Butler RN, Geier MS, Abbott CA. Biochemical and histological changes in the small intestine of mice with dextran sulfate sodium colitis. *J Cell Physiol*. 2011;226(12):3219-3224. doi:10.1002/jcp.22682
124. Kim K-MM, Kim Y-SYYS, Lim JY, et al. Sasa quelpaertensis leaf extract suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting the proinflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Nutr Res*. 2014;34(10):894-905. doi:10.1016/j.nutres.2014.09.002
125. Valero MS, González M, Ramón-Gimenez M, et al. Jasonia glutinosa (L.) DC., a traditional herbal medicine, reduces inflammation, oxidative stress and protects the intestinal barrier in a murine model of colitis. *Inflammopharmacology*. 2019. doi:10.1007/s10787-019-00626-0
126. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol*. 2004;143(7):908-918. doi:10.1038/sj.bjp.0705941
127. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35(2):584-592.

- doi:10.1002/eji.200425778
128. Park MY, Ji GE, Sung MK. Dietary Kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):355-363. doi:10.1007/s10620-011-1883-8
 129. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-κB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on i. *Mediators Inflamm.* 2007;2007. doi:10.1155/2007/45673
 130. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med (Baltim).* 1992;21(3):334-350. doi:10.1016/0091-7435(92)90041-F
 131. Brückner M, Westphal S, Domschke W, Kucharzik T, Lügering A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. *J Crohn's Colitis.* 2012;6(2):226-235. doi:10.1016/j.crohns.2011.08.012
 132. Gassler N, Rohr C, Schneider A, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1 44-1). doi:10.1152/ajpgi.2001.281.1.g216
 133. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J Surg Res.* 2007;140(1):12-19. doi:10.1016/j.jss.2006.07.050
 134. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, et al. TNF-α-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-κB activation. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(3 49-3). doi:10.1152/ajpgi.00173.2003
 135. Tang Y, Clayburgh DR, Mittal N, et al. Epithelial NF-κB enhances transmucosal fluid movement by altering tight junction protein composition after T cell activation. *Am J Pathol.* 2010;176(1):158-167. doi:10.2353/ajpath.2010.090548
 136. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Protective effect

- of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(7):737-745. doi:10.1016/j.bcp.2011.06.043
137. Guglielmetti S, Fracassetti D, Taverniti V, et al. Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*vaccinium angustifolium*) drink. *J Agric Food Chem.* 2013;61(34):8134-8140. doi:10.1021/jf402495k
138. Guri A, Li Y, Corredig M. Interfacial dilational properties of tea polyphenols and milk proteins with gut epithelia and the role of mucus in nutrient adsorption. *Food Funct.* 2015;6(12):3642-3651. doi:10.1039/c5fo00654f
139. Georgiades P, Pudney PDA, Rogers S, Thornton DJ, Waigh TA. Tea derived galloylated polyphenols cross-link purified gastrointestinal mucins. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0105302
140. Etxeberria U, Arias N, Boqué N, et al. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J Nutr Biochem.* 2015;26(6):651-660. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.01.002
141. Kaulmann A, Bohn T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9346470. doi:10.1155/2016/9346470
142. Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients.* 2015;8(1):16. doi:10.3390/nu8010016
143. Shin HS, Satsu H, Bae MJ, et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chem.* 2015;168:167-175. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.100
144. Zhang Z, Wu X, Cao S, et al. Chlorogenic Acid Ameliorates Experimental Colitis by Promoting Growth of *Akkermansia* in Mice. *Nutrients.* 2017;9(7):677. doi:10.3390/nu9070677
145. John GK, Mullin GE. The Gut Microbiome and Obesity. *Curr Oncol Rep.* 2016;18(7).

- doi:10.1007/s11912-016-0528-7
146. Kang C sung, Ban M, Choi EJ, et al. Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially Akkermansia muciniphila, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLoS One*. 2013;8(10). doi:10.1371/journal.pone.0076520
 147. Lee B Il, Nugroho A, Bachri MS, et al. Anti-ulcerogenic effect and HPLC analysis of the caffeoylquinic acid-rich extract from *Ligularia stenocephala*. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(3):493-497. doi:10.1248/bpb.33.493
 148. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res*. 2014;34(11):907-929. doi:10.1016/j.nutres.2014.07.010
 149. Bousvaros A, Zurakowski D, Duggan C, et al. Vitamins A and E serum levels in children and young adults with inflammatory bowel disease: Effect of disease activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998;26(2):129-135. doi:10.1097/00005176-199802000-00002
 150. Slattery ML, Benson J, Curtin K, Ma K-N, Schaeffer D, Potter JD. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(2):575-582. doi:https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.575
 151. Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):911-918. doi:10.1016/0891-5849(95)94362-H
 152. Głąbska D, Guzek D, Zakrzewska P, Włodarek D, Lech G. Lycopene, Lutein and Zeaxanthin May Reduce Faecal Blood, Mucus and Pus but not Abdominal Pain in Individuals with Ulcerative Colitis. *Nutrients*. 2016;8(10):613. doi:10.3390/nu8100613
 153. Głąbska D, Guzek D, Zakrzewska P, Lech G. Intake of Lutein and Zeaxanthin as a Possible Factor Influencing Gastrointestinal Symptoms in Caucasian Individuals with Ulcerative Colitis in Remission Phase. *J Clin Med*. 2019;8(1):77. doi:10.3390/jcm8010077

154. Trivedi PP, Jena GB. Mechanistic insight into beta-carotene-mediated protection against ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice. *Eur J Nutr.* 2015;54(4):639-652. doi:10.1007/s00394-014-0745-5
155. Ortega-Vidal J, Ruiz-Riaguas A, Fernández-de Córdoba ML, Ortega-Barrales P, Llorent-Martínez EJ. Phenolic profile and antioxidant activity of Jasonia glutinosa herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal in vitro digestion. *Food Chem.* 2019;287:258-264. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.101
156. Bose B, Tripathy D, Chatterjee A, Tandon P, Kumaria S. Secondary metabolite profiling, cytotoxicity, anti-inflammatory potential and in vitro inhibitory activities of Nardostachys jatamansi on key enzymes linked to hyperglycemia, hypertension and cognitive disorders. *Phytomedicine.* 2019;55:58-69. doi:10.1016/j.phymed.2018.08.010
157. Saadatdoust Z, Pandurangan AK, Ananda Sadagopan SK, Mohd. Esa N, Ismail A, Mustafa MR. Dietary cocoa inhibits colitis associated cancer: a crucial involvement of the IL-6/STAT3 pathway. *J Nutr Biochem.* 2015;26(12):1547-1558. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.07.024
158. Varilek GW, Yang F, Lee EY, et al. Green Tea Polyphenol Extract Attenuates Inflammation in Interleukin-2–Deficient Mice, a Model of Autoimmunity. *J Nutr.* 2001;131(7):2034-2039. doi:10.1093/jn/131.7.2034
159. Rodriguez-Canales M, Martinez-Galero E, Nava-Torres AD, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanolic Extract of Cyrtocarpa procera Bark Reduces the Severity of Ulcerative Colitis in a Chemically Induced Colitis Model. *Mediators Inflamm.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/5062506
160. Tristan P. Dew, Andrea J. Day and, Morgan* MRA. Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components. 2005. doi:10.1021/JF050716J
161. Mankertz J, Schulzke J-D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(4):379-383. doi:10.1097/MOG.0b013e32816aa392
162. Kim KY, Oh TW, Do HJ, et al. Acer palmatum thumb. Ethanol extract alleviates

- Interleukin-6-induced barrier dysfunction and dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation. *J Immunol Res.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/5718396
163. Chi JH, Kim YH, Sohn DH, Seo GS, Lee SH. Ameliorative effect of *Alnus japonica* ethanol extract on colitis through the inhibition of inflammatory responses and attenuation of intestinal barrier disruption in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1767-1774. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.050
164. Oz HS, Chen T, de Villiers WJSS. Green tea polyphenols and sulfasalazine have parallel anti-inflammatory properties in colitis models. *Front Immunol.* 2013;4(JUN):1-10. doi:10.3389/fimmu.2013.00132
165. Singh K, Jaggi AS, Singh N. Exploring the ameliorative potential of *Punica granatum* in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phyther Res.* 2009;23(11):1565-1574. doi:10.1002/ptr.2822
166. Castro M, Ramón-Giménez M, Les Pereda F, et al. Spasmolytic effect of *Jasonia glutinosa* on rodent intestine. *Rev Española Enfermedades Dig.* 2016;108. doi:10.17235/reed.2016.4327/2016
167. Lykov AP, Poveshchenko O V., Bondarenko NA, Surovtseva MA, Kim II, Bgatova NP. Therapeutic Potential of Biomedical Cell Product in DSS-Induced Inflammation in the Small Intestine of C57Bl/6J Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2018;165(4):576-580. doi:10.1007/s10517-018-4216-5
168. Aldini R, Budriesi R, Roda G, et al. Curcuma longa Extract Exerts a Myorelaxant Effect on the Ileum and Colon in a Mouse Experimental Colitis Model, Independent of the Anti-Inflammatory Effect. *PLoS One.* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0044650
169. Rtibi K, Grami D, Wannas D, et al. *Ficus carica* aqueous extract alleviates delayed gastric emptying and recovers ulcerative colitis-enhanced acute functional gastrointestinal disorders in rats. *J Ethnopharmacol.* 2018;224:242-249. doi:10.1016/j.jep.2018.06.001

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos, las conclusiones de esta tesis doctoral son:

1. El canal de potasio activado por calcio de conductancia intermedia 3.1 localizado en el epitelio intestinal tiene una función directa sobre el mantenimiento de la homeostasis del intestino. Su sobreexpresión genera alteraciones morfológicas y funcionales en el aparato digestivo, como un incremento de quimo, una reducción en las contracciones espontáneas y apoptosis epitelial, mientras que su bloqueo farmacológico es capaz de revertir estos cambios. Este canal podría ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de patologías intestinales que cursen con sintomatologías semejantes.
2. El extracto etanólico de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. produce un efecto espasmolítico *ex vivo* sobre la musculatura lisa longitudinal de duodeno de rata mediante el bloqueo de los canales de calcio activados por voltaje tipo L. Este mecanismo de acción justifica su uso como terapia alternativa en la prevención y/o tratamiento de patologías intestinales que cursen con alteraciones en la motilidad digestiva.
3. La administración oral de un extracto etanólico de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. tiene un efecto beneficioso sobre un modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS. Sus propiedades terapéuticas, además de mejorar la sintomatología clínica y el daño tisular, también producen una mejora sobre la alteración de la función motora del intestino. Estos efectos posiblemente sean debidos a su capacidad antiinflamatoria y protectora de la barrera intestinal. En vista de estos resultados, el té de roca podría tener potencial terapéutico en la prevención y/o tratamiento de la colitis ulcerosa y otras enfermedades inflamatorias intestinales.
4. Esta tesis doctoral proporciona evidencia científica al uso tradicional de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. como tratamiento de trastornos digestivos. El efecto terapéutico mostrado por *Jasonia glutinosa* (L.) DC. seguramente sea debido al efecto sinérgico de su composición fitoquímica, donde destaca la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides.

7. ANEXOS

7.1 PUBLICACIONES APORTADAS

- Valero MS, Ramón-Gimenez M, Lozano-Gerona J, et al. KCa3.1 Transgene Induction in Murine Intestinal Epithelium Causes Duodenal Chyme Accumulation and Impairs Duodenal Contractility. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1193. doi:10.3390/ijms20051193
- Castro M, Ramón-Giménez M, Les Pereda F, et al. Spasmolytic effect of Jasonia glutinosa on rodent intestine. *Rev Española Enfermedades Dig.* 2016;108. doi:10.17235/reed.2016.4327/2016
- Valero MS, González M, Ramón-Gimenez M, et al. Jasonia glutinosa (L.) DC., a traditional herbal medicine, reduces inflammation, oxidative stress and protects the intestinal barrier in a murine model of colitis. *Inflammopharmacology.* 2019. doi:10.1007/s10787-019-00626-0



Article

KCa3.1 Transgene Induction in Murine Intestinal Epithelium Causes Duodenal Chyme Accumulation and Impairs Duodenal Contractility

Marta Sofía Valero ^{1,2,*} , Mariano Ramón-Gimenez ³ , Javier Lozano-Gerona ^{4,5} , Pablo Delgado-Wicke ⁶, Pilar Calmarza ⁷, Aida Oliván-Viguera ^{8,9}, Víctor López ^{2,3} , Ángel-Luis García-Otín ^{4,5}, Salvador Valero ¹⁰, Esther Pueyo ^{8,9}, Kirk L. Hamilton ¹¹ , Hiroto Miura ¹² and Ralf Köhler ^{4,5,13,*}

¹ Department of Pharmacology and Physiology, Universidad de Zaragoza, 22002 Huesca, Spain

² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), 50013 Zaragoza, Spain; ilopez@usj.es

³ Universidad San Jorge, 50830 Villanueva de Gállego, Spain; m.monxo@gmail.com

⁴ Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), 50009 Zaragoza, Spain; jlozanog.iacs@aragon.es (J.L.-G.); algarcia.iacs@aragon.es (A.-L.G.-O.)

⁵ Unidad de Investigación Traslacional, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) Aragón, 50009 Zaragoza, Spain;

⁶ Department of Biology, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28049 Madrid, Spain; pablo.delgado@uam.es

⁷ Clinical Biochemistry Service, Hospital Universitario Miguel Servet, 50009 Zaragoza, Spain; mpcalmarza@salud.aragon.es

⁸ BSICoS, Aragón Institute of Engineering Research (IA3), IIS-Aragón, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; aidaolivanviguera@gmail.com (A.O.-V.); epueyo@unizar.es (E.P.)

⁹ Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicina (CIBER-BBN), 50018 Zaragoza, Spain

¹⁰ Valero Analítica, S.L. 50011, Zaragoza, Spain; salvador.valero@valeroanalitica.com

¹¹ Department of Physiology, School of Biomedical Sciences, University of Otago, 9054 Dunedin, New Zealand; kirk.hamilton@otago.ac.nz

¹² Department of Physiology and Cell Biology, University of Nevada School of Medicine, Reno, NV 89557, USA; renomiura@gmail.com

¹³ Aragón Agency for Research and Development (ARAID), 50009 Zaragoza, Spain

* Correspondence: msvalero@unizar.es (M.S.V.); kohler@araid.es (R.K.)

Received: 30 January 2019; Accepted: 4 March 2019; Published: 8 March 2019



Abstract: The epithelial intermediate-conductance calcium/calmodulin-regulated KCa3.1 channel is considered to be a regulator of intestine function by controlling chloride secretion and water/salt balance. Yet, little is known about the functional importance of KCa3.1 in the intestinal epithelium *in vivo*. Our objective was to determine the impact of epithelial-specific inducible overexpression of a KCa3.1 transgene (KCa3.1+) and of inducible suppression (KCa3.1−) on intestinal homeostasis and function in mice. KCa3.1 overexpression in the duodenal epithelium of doxycycline (DOX)-treated KCa3.1+ mice was 40-fold above the control levels. Overexpression caused an inflated duodenum and doubling of the chyme content. Histology showed conserved architecture of crypts, villi, and smooth muscle. Unaltered proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immune reactivity and reduced amounts of terminal deoxynucleotide transferase mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL)-positive apoptotic cells in villi indicated lower epithelial turnover. Myography showed a reduction in the frequency of spontaneous propulsive muscle contractions with no change in amplitude. The amount of stool in the colon was increased and the frequency of colonic contractions was reduced in KCa3.1+ animals. Senicapoc treatment prevented the phenotype. Suppression of KCa3.1 in DOX-treated KCa3.1− mice caused no overt intestinal phenotype. In conclusion, inducible KCa3.1 overexpression

alters intestinal functions by increasing the chyme content and reducing spontaneous contractions and epithelial apoptosis. Induction of epithelial KCa3.1 can play a mechanistic role in the process of adaptation of the intestine.

Keywords: intermediate-conductance calcium-activated potassium channel; KCa3.1; epithelium; duodenum; contractility; transgenic mice

1. Introduction

The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel (KCa3.1, encoded by the *KCNN4* gene) is constitutively expressed in the intestinal epithelium [1–3]. Concerning its physiological role, it is well established that KCa3.1 activation produces membrane hyperpolarization that is needed for the secretion of chloride anions and concomitantly of water into the lumen [3]. From the pharmacological perspective, blockers of KCa3.1 have been proposed to have anti-diarrheic properties, because the classical, molecule blocker of KCa3.1, clotrimazole, mitigated experimental cholera-toxin-induced diarrhea in mice [4]. There is also early evidence that KCa3.1 may be mechanistically important in inflammatory bowel disease, because a lower epithelial KCa3.1 expression has been found in patients with ulcerative colitis (UC) [5], pointing to a disturbed regulation of chloride secretion/absorption in this disease state. Yet, causality remains elusive. KCa3.1 is also upregulated in activated T cells, where it drives T cell proliferation and synthesis of cytokines during the immune response. Alterations of KCa3.1 have been found in experimental acute and chronic inflammatory processes and autoimmune ulcerative colitis [6–8].

However, besides the abovementioned classical physiological functions and pathomechanistic roles in inflammation, there is growing evidence that KCa3.1 promotes excessive cell proliferation, contributing to pathological organ remodeling, such as organ fibrosis of the kidney, transplants, lung, trachea, heart, and liver [9–14]. Moreover, KCa3.1 is upregulated in several cancers, such as glioblastoma [15], lung cancer [16], and renal cancer [17], suggesting an oncogenic potential of this channel. Therefore, KCa3.1 can be considered to be a regulator of tissue homeostasis and a driver of pathological cell proliferation.

To elucidate physiological or potential pathological roles of KCa3.1 in the intestinal epithelium, we developed two transgenic mouse models, in which channel expression can be manipulated by a doxycycline (DOX)-sensitive genetic switch, which, when turned on by dietary DOX, causes either epithelial-specific transgene KCa3.1 overexpression (KCa3.1+) or gene deletion (KCa3.1–). We hypothesized that the corresponding genetic manipulations of KCa3.1 alter epithelial homeostasis and proliferation and intestine function.

2. Results

2.1. Murine Model of KCa3.1-Transgene Induction in the Intestinal Epithelium

The DOX treatment of KCa3.1+ mice (for details, see Section 4) for 2 weeks produced a 22-fold overexpression of KCa3.1 above basal expression levels in the duodenum (Figure 1A). In isolated duodenal epithelium, this overexpression was 40-fold above the levels in the untreated controls (Figure 1B). Epithelial overexpression was fourfold higher than the overexpression found at the duodenal level, demonstrating the strong induction of the KCa3.1-transgene in, particularly, the intestinal epithelium of KCa3.1+ mice (Figure 1C,D).

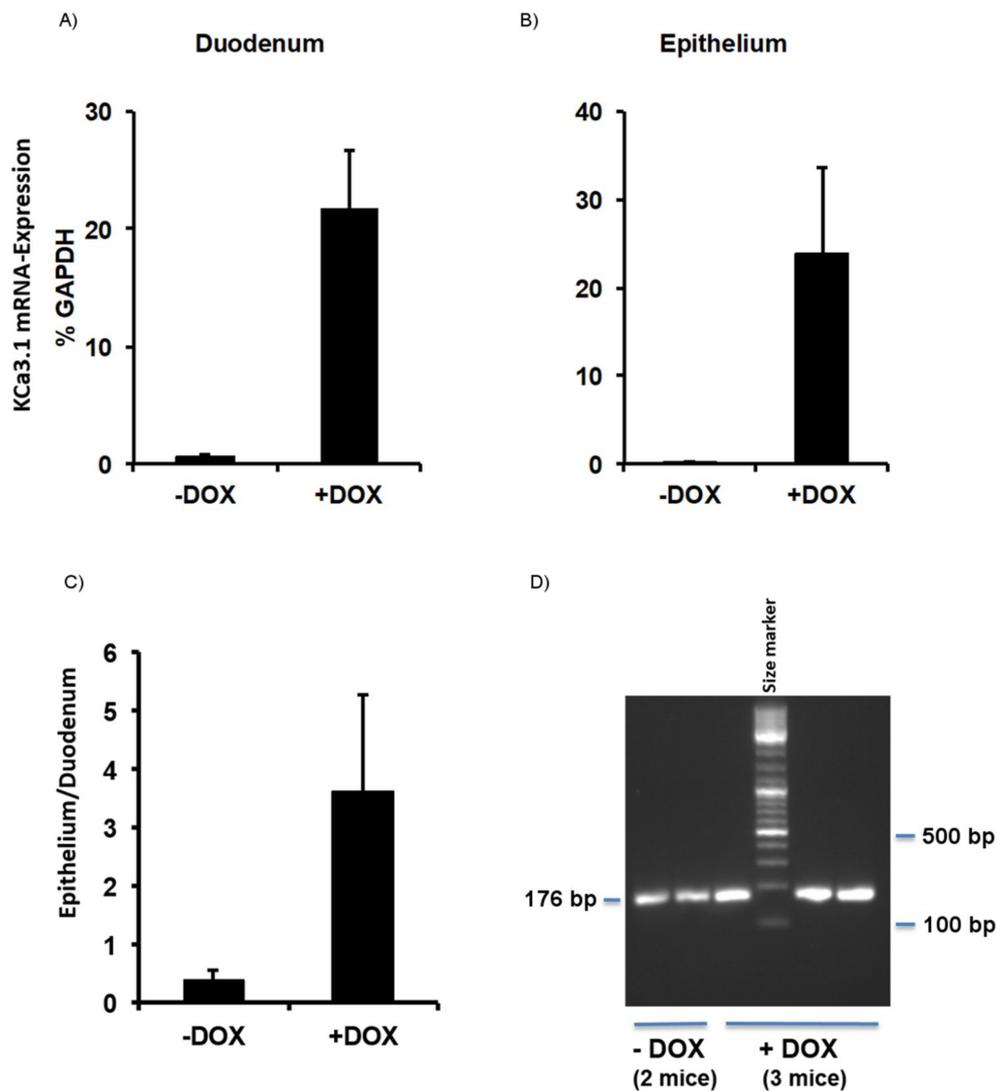


Figure 1. KCa3.1 overexpression in inducible KCa3.1+ mice. Induction of KCa3.1 transgene expression by 2-weeks in doxycycline (DOX)-treated KCa3.1+ mice (+DOX) and untreated KCa3.1+ (–DOX) in (A) the duodenum and (B) duodenal epithelium measured by qRT-PCR. Expression was normalized to GAPDH expression (% GAPDH). (C) The ratio (epithelium/duodenum) of induction of transgene expression. (D) Gel electrophoresis showing qRT-PCR. Note the more intense bands in the DOX-treated mice. GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; – DOX, untreated KCa3.1+ mice; + DOX, DOX-treated KCa3.1+ mice. The data are means \pm SEM, $n = 2$ –14 (mice).

2.1.1. Phenotype of KCa3.1 Overexpression Mice

DOX-treated KCa3.1+ mice showed a 60% higher water intake during the second week of the DOX treatment when compared with the untreated KCa3.1+ mice (Table 1). The food intake was not significantly different between the groups.

Table 1. Changes in water and food consumption and amounts and water content of stools. – DOX, untreated KCa3.1+ mice. + DOX, doxycycline-treated KCa3.1+ mice.

	–DOX		+DOX		<i>p</i> vs. – DOX
	Mean ± SEM	<i>n</i> (mice)	Mean ± SEM	<i>n</i> (mice)	
Water intake 1st week (mL/day)	4.7 ± 0.3	33	4.1 ± 0.4	34	ns
Water intake 2nd week (mL/day)	4.2 ± 0.3	33	6.8 ± 0.6	34	0.0005
Food intake (g)	1.4 ± 0.2	11	1.7 ± 0.2	9	ns
Stool pellets:					
Wet weight (mg)	97 ± 10	11	140 ± 11	14	0.009
Dry weight (mg)	27 ± 3	11	40 ± 3	14	0.009
Water content (%)	72 ± 1	11	71 ± 1	14	ns

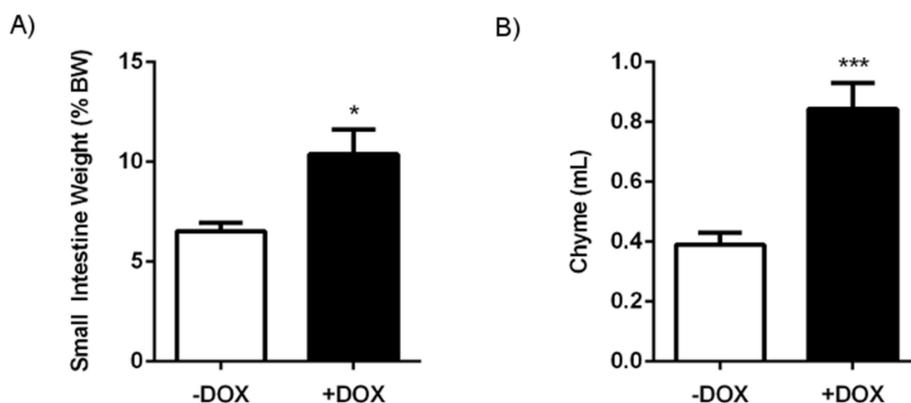
ns: not significant.

Necropsy and histology at sacrifice did not reveal overt alterations of the abdominal organs, with the exception of a visible inflation and higher weight of the small intestine and caecum (Table 2) (Figure 2A). Histology on the DOX-treated and untreated KCa3.1+ mice did not reveal any overt alterations of the epithelium or smooth muscle in the duodenum, such as ulcers, necrosis, rupture of the muscularis, malignancies, villi overgrowth, or loss. Yet, we found a significantly larger duodenal lumen area in the DOX-treated KCa3.1+ mice than in the controls (Figure 2C). There was no difference in the thickness of the muscle layers between the groups (Figure 2C).

Table 2. Effects of overexpression of KCa3.1 on the weight of the gastrointestinal package, small intestine, stomach, caecum, and colon. Organ weights were normalized to body weight and expressed as a percentage of body weight ((g organ/g BW) × 100). – DOX, untreated KCa3.1+ mice. + DOX, doxycycline-treated KCa3.1+ mice.

	– DOX		+ DOX		<i>p</i> vs. – DOX
	Mean ± SEM (g organ/g BW) × 100	<i>n</i> (mice)	Mean ± SEM	<i>n</i> (mice)	
Organography					
GI package	12.7 ± 0.6	12	17.5 ± 1.8	8	0.0328
Small intestine	6.5 ± 0.4	12	10.4 ± 1.2	8	0.0120
Stomach	1.7 ± 0.2	10	2.1 ± 0.3	8	ns
Caecum	1.6 ± 0.1	12	4.9 ± 0.6	8	<0.0001
Colon	1.6 ± 0.2	12	1.5 ± 0.1	8	ns

GI: gastrointestinal, BW: body weight.

**Figure 2.** Cont.

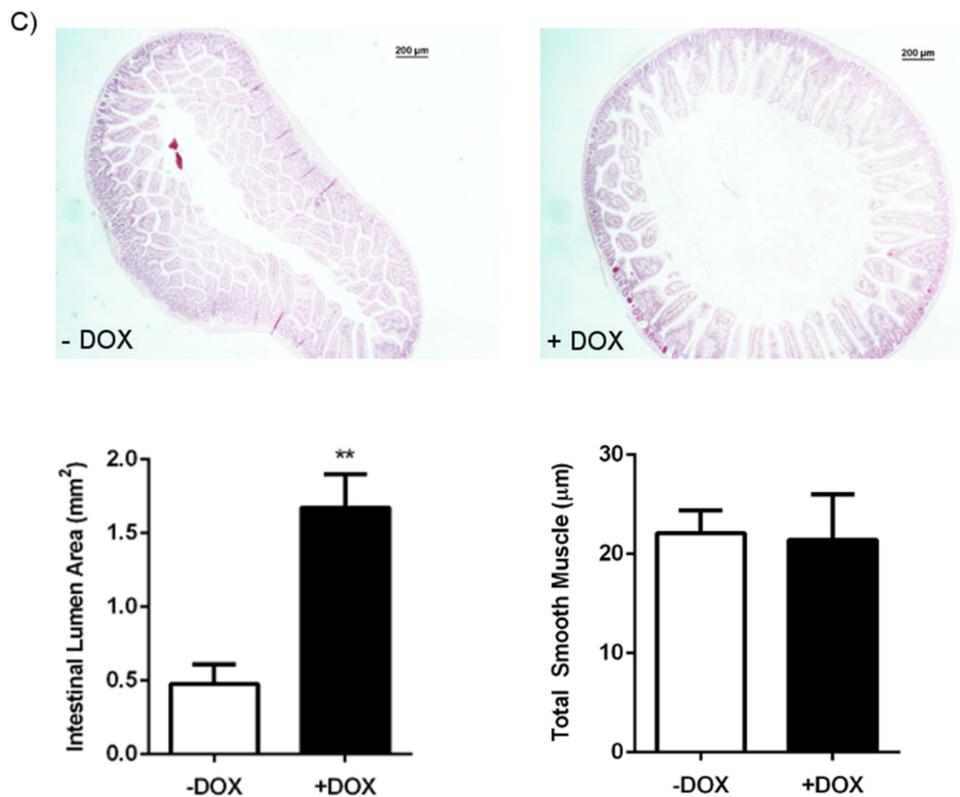


Figure 2. Intestinal content and morphology of the duodenum in DOX-treated (+ DOX) and untreated KCa3.1+ mice (– DOX). (A) Small intestine weight. (B) Chyme content. (C) Hematoxylin–eosin-stained cross-section of the duodenum of the untreated and DOX-treated KCa3.1+ mice, duodenal lumen area and thickness of the longitudinal and circular smooth muscle layers. The data are means \pm SEM; $n = 6–15$ (mice). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The total duodenal chyme content at sacrifice was twice as much as in the controls (Figure 2B), thus explaining the difference in diameter and weight. The stool pellets present in the colon of DOX-treated KCa3.1+ mice were of normal shape and had water content similar to those in the controls. Yet, the number of pellets was higher in the DOX-treated KCa3.1+ mice (Table 1). We did not find blood in the chyme and stool samples. The electrolyte composition of chyme, stool, and blood was similar to that in the controls (Figure 3).

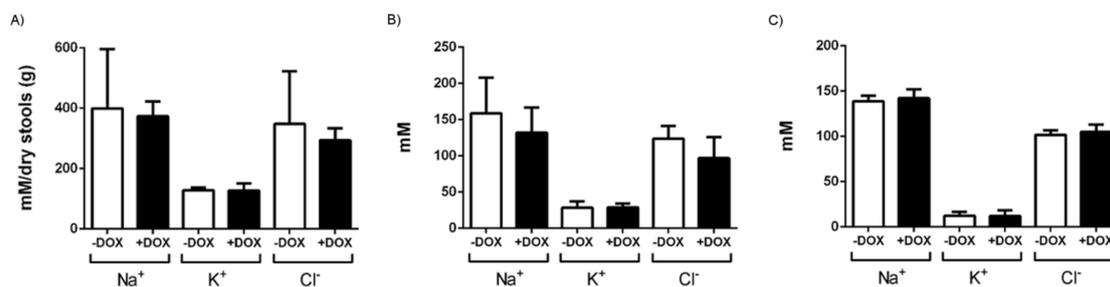


Figure 3. Electrolytic content of stool, chyme, and plasma. Na⁺, K⁺, and Cl⁻ concentrations in (A) dried stools, (B) chyme, and (C) serum of untreated (– DOX) and DOX-treated KCa3.1+ mice (+ DOX). The data are mean \pm SEM, $n = 3–8$ (mice).

2.1.2. Epithelial Homeostasis of the Duodenum

The intestinal epithelium is constantly renewed—a process that involves the proliferation of the basal epithelium forming the villi and a loss of the epithelial cells of the more distal villi segments and

a process that involves apoptosis [18]. Our immune histological examination revealed a similar protein expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a DNA-clamp essential for replication and thus an indicator of mitotic activity in the basal epithelial layer (Figure 4A).

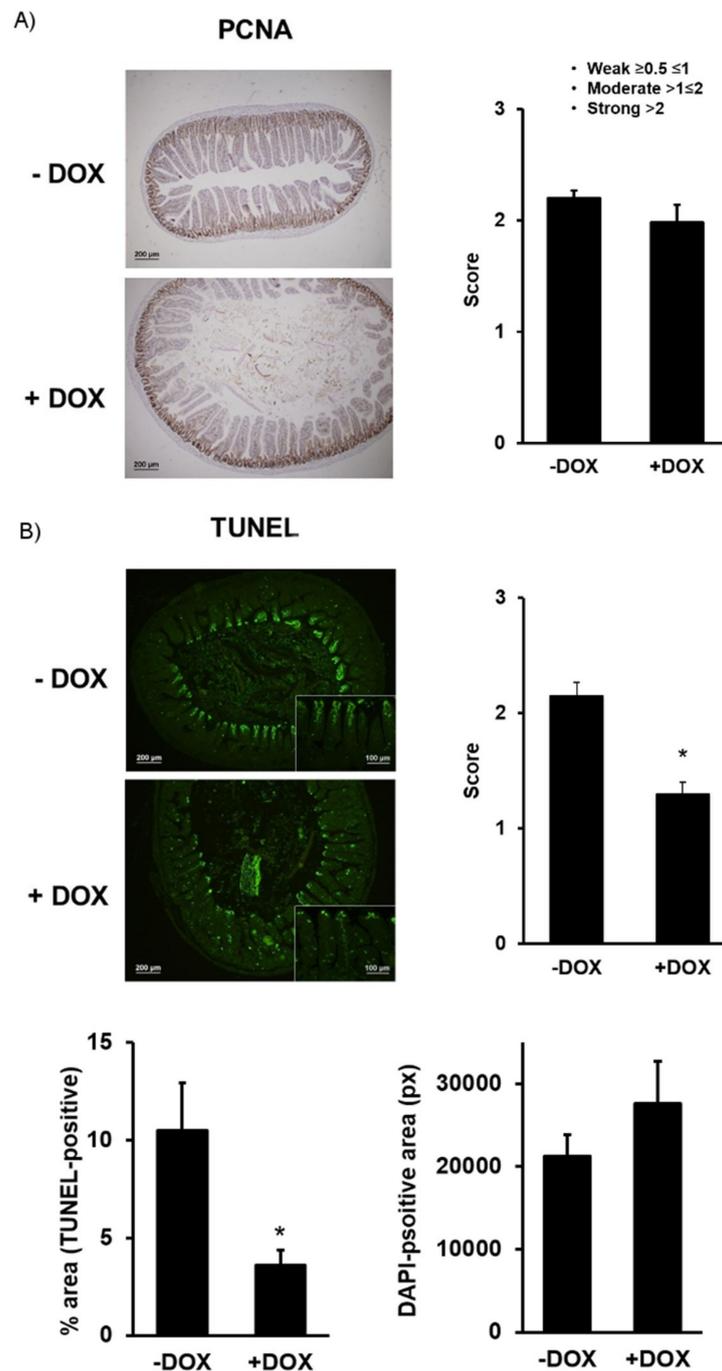


Figure 4. Immune histological examination of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expression and terminal deoxynucleotide transferase mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) in KCa3.1+ mice. (A) PCNA-stained and hematoxylin–eosin-counterstained epithelium of untreated (– DOX) and DOX-treated (+ DOX) mice and qualitative scores of intensity. (B) Apoptosis in treated and untreated KCa3.1+ mice determined by TUNEL, qualitative scores (panel on right), and quantitative evaluation (lower panels) of signal intensity (% TUNEL-positive; on left) normalized to epithelial area and total 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)-positive area (pixel (px); on right). The data are means \pm SEM, $n = 5$ (mice). * $p < 0.05$.

Concerning the rates of apoptosis as measured by TUNEL, we found that the distal epithelial cells of villi of the DOX-treated KCa3.1+ showed a significantly lower degree (−40%) of apoptosis (Figure 4B, left panel). The total epithelial area was not different between the groups (Figure 4B, right panel). Together, these results suggest normal duodenal architecture with the exception of a larger lumen area, normal epithelial proliferation rate, and a lower apoptotic activity in the DOX-treated KCa3.1+, suggesting a decreased epithelial turnover.

2.1.3. Alterations of Intestinal Contractility in KCa3.1+ Mice

The larger duodenal diameter and the larger amount of chyme and stool found in DOX-treated KCa3.1+ mice suggested alterations of intestinal contractility. We, therefore, performed isometric force measurements and determined spontaneous contractions from the longitudinal smooth muscle of the duodenum, as well as acetylcholine (ACh)-induced contractions. As shown in Figure 5A, the spontaneous contractions of the duodenal segments were significantly reduced in the DOX-treated KCa3.1+ mice as compared with the untreated controls. This reduction was due to a lower frequency of contractions (Figure 5B) but not to a reduction of the amplitude of the contractions (Figure 5C).

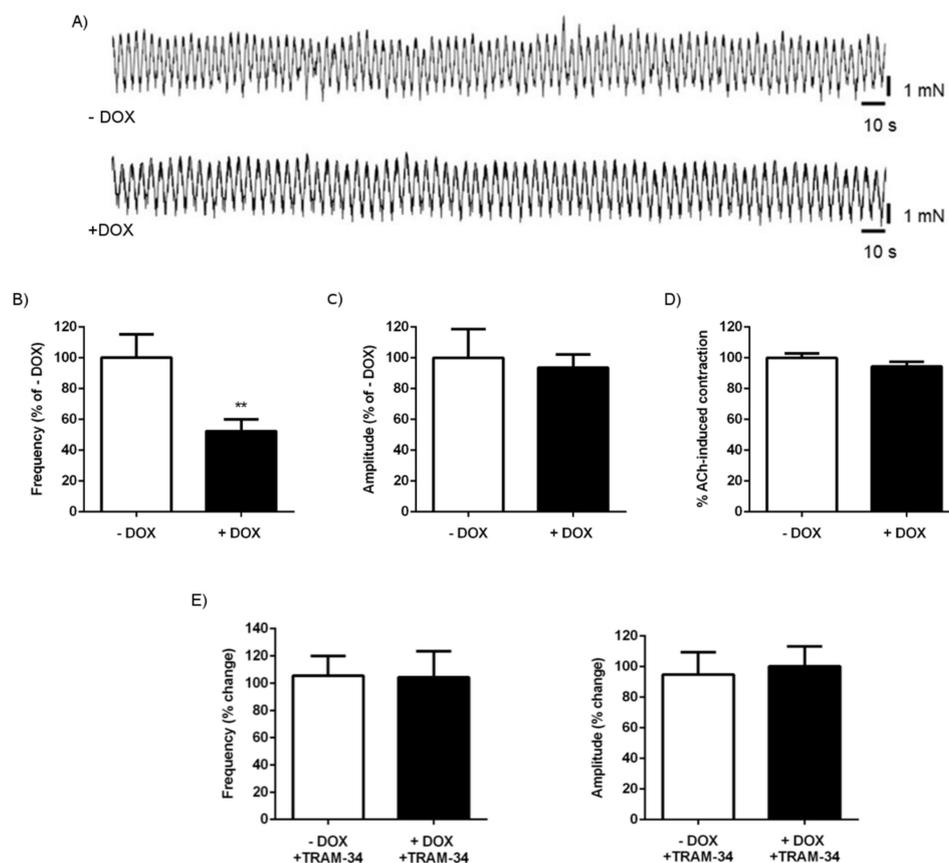


Figure 5. Impact of KCa3.1 transgene induction on duodenal contractility. (A) Recording of spontaneous contractions from the longitudinal smooth muscle of untreated (− DOX) and DOX-treated KCa3.1+ mice (+ DOX). (B) Frequency and (C) amplitude of spontaneous contractions. (D) Contractile response to acetylcholine (ACh, at 100 μ M). The data are means (% of − DOX) \pm SEM. (E) There was no impact of TRAM-34 (1 μ M) on the frequency and amplitude of the contractions. The data are means (% of − TRAM-34 (before addition TRAM-34) \pm SEM.; $n = 12$ –16 (mice). ** $p < 0.01$.

The magnitude of ACh-induced contractions was similar in the DOX-treated and untreated KCa3.1+ mice (Figure 5D). The KCa3.1 blocker [19] TRAM-34 at 1 μ M had no effect on the frequency and amplitude in either group (Figure 5E), suggesting that the transgene function has no direct effect on contractility.

We also tested spontaneous and ACh-induced contractions in colon segments (Figure 6). Overall, the contractions were less synchronized than in the duodenum (Figure 6A). Similar to that observed in the duodenal segments, the frequency of the contractions was significantly lower in DOX-treated KCa3.1+ mice than in the untreated controls, although the difference was less pronounced (Figure 6B). Unlike in the duodenum, we found a slightly but significantly larger amplitude of contractions in the colon of the DOX-treated KCa3.1+ mice (Figure 6C). ACh-induced contractions were alike in both groups (Figure 6D). TRAM-34 had no effect on the spontaneous frequency and magnitude of the contractions in either group (Figure 6E).

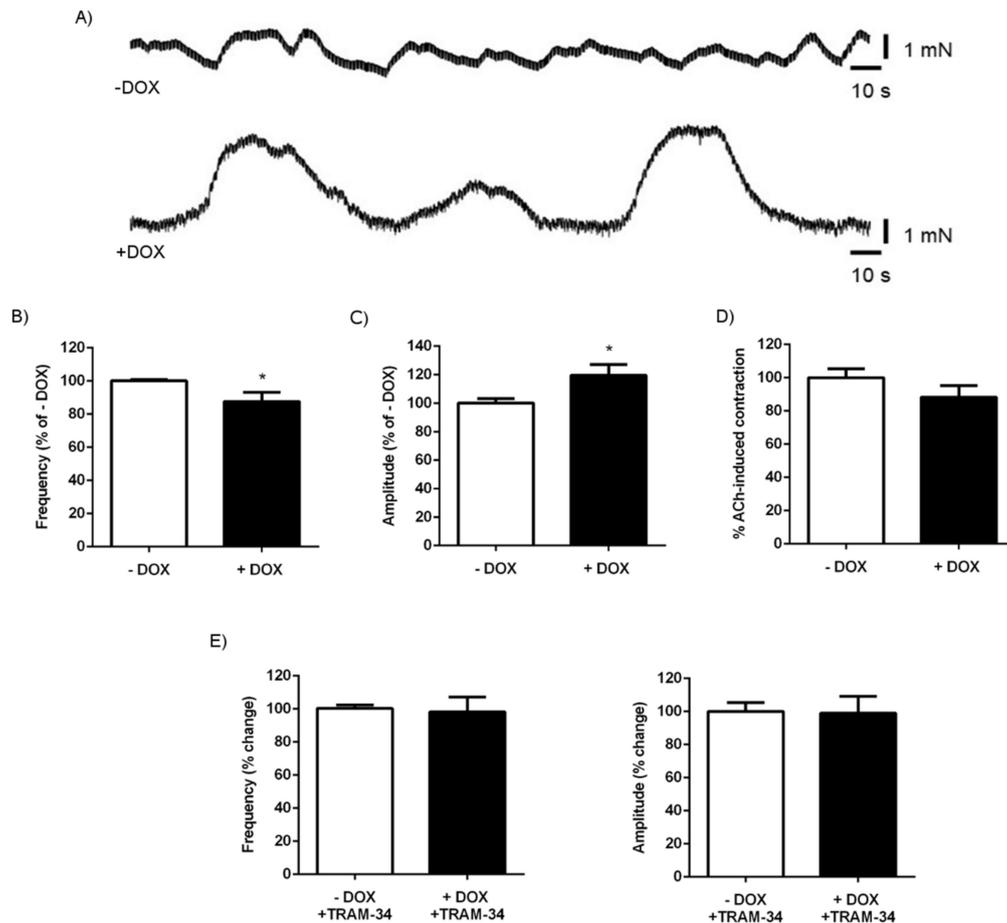


Figure 6. Impact of KCa3.1 induction on colon contractility. (A) Recordings of spontaneous contractions in the colonic longitudinal smooth muscle segments of the untreated (– DOX) and DOX-treated KCa3.1+ mice (+ DOX). (B) Frequency and (C) amplitude of the spontaneous contractions. (D) Contractions to acetylcholine (ACh, at 100 μ M). The data are given as % of untreated KCa3.1+ mice (– DOX) \pm SEM. (E) There was no impact of TRAM-34 (1 μ M) on the frequency and amplitude of the contractions. The data are means (% of – TRAM-34 (before addition TRAM-34) \pm SEM; $n = 12$ –16 (mice). * $p < 0.05$.

2.1.4. Senicapoc Treatment

To test whether this intestinal phenotype can be prevented by *in vivo* KCa3.1 blockade and thus by blocking KCa3.1 transgene function, we treated the mice with DOX and the KCa3.1-blocker, Senicapoc (30 mg/day in chow) because of the proven bioavailability in mice when administered in chow [20]. The treatment prevented changes in water intake and all the morpho-histological and functional alterations in duodenal contractility seen in the DOX-treated KCa3.1+ mice (Table 3), suggesting that the alterations observed in the KCa3.1-overexpressing mice were indeed caused by transgene function.

Table 3. In vivo Senicapoc treatment prevents the intestinal phenotype in DOX-treated KCa3.1+ mice. The data are expressed as % of untreated KCa3.1+ mice (– DOX) ± SEM.

	+ DOX + Senicapoc (% of –DOX)	n (mice)	p vs. – DOX
Water intake 1st week	79 ± 27	4	ns
Water intake 2nd week	98 ± 17	5	ns
Food intake	147 ± 22	5	ns
Organography			
GI package	121 ± 9	6	ns
Small intestine	123 ± 17	6	ns
Stomach	120 ± 17	6	ns
Caecum	125 ± 12	6	ns
Colon	100 ± 20	6	ns
Chyme	74 ± 9	6	ns
ILA	105 ± 30	6	ns
Duodenum contractility			
Frequency	102 ± 23	6	ns
Amplitude	90 ± 13	6	ns
Colon contractility			
Frequency	96 ± 4	6	ns
Amplitude	105 ± 3	6	ns

GI: gastrointestinal, ILA: small intestine lumen area, ns: not significant.

2.1.5. KCa3.1 Suppression in Intestinal Epithelium

We also tested the impact of the loss of epithelial KCa3.1 in conditional KCa3.1–. The treatment of conditional KCa3.1– (for details, see Section 4.1) with DOX for 2 weeks caused CRE-mediated excision of the channel pore-encoding exon 4 of the *Kcnn4* gene and the appearance of a shorter mRNA lacking exon 4 as determined by qRT-PCR on the duodenum and isolated epithelium (Figure 7).

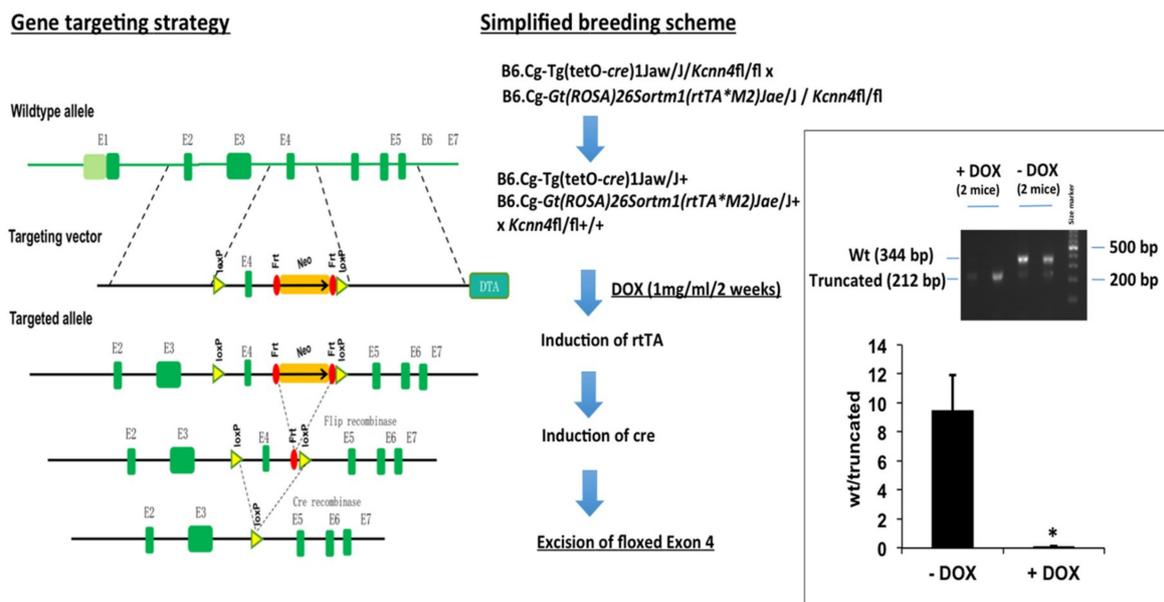


Figure 7. Gene targeting strategy and generation of epithelium-specific inducible KCa3.1– mice.

In contrast to the DOX-treated conditional KCa3.1+, loss of the channel did not produce any overt phenotype whatsoever. Moreover, all the morphological and histological parameters, chyme and feces amounts, and duodenal and colonic contractility were alike in the DOX-treated and untreated

groups (Table 4). Also, the immune histological examination of PCNA expression (Figure 8A) and the TUNEL assay did not reveal differences in the proliferative activity or rates of apoptosis or size of the epithelial tissue (Figure 8B). These data show that, in contrast to KCa3.1 overexpression, genetically encoded short-term loss of expression of a functional epithelial KCa3.1 in this model has no impact on intestinal function.

Table 4. Suppression of KCa3.1 in KCa3.1[−] mice causes no overt intestinal phenotype. Organ weights were normalized to body weight (BW) and expressed as a percentage of BW ((g organ/g BW) × 100). The intestinal contractility data are given as % of control (untreated KCa3.1[−] mice (− DOX)).

	− DOX		+ DOX		<i>p</i> vs. − DOX
	Mean ± SEM	<i>n</i> (mice)	Mean ± SEM	<i>n</i> (mice)	
Water intake 1st week (mL/d)	1.8 ± 0.1	9	1.9 ± 1.0	12	ns
Water intake 2nd week (mL/d)	0.9 ± 0.1	9	0.9 ± 0.1	12	ns
Food intake (g/d)	1.4 ± 0.2	9	1.7 ± 0.2	12	ns
Stool pellets:					
Wet weight (mg)	236 ± 31	9	213 ± 29	15	ns
Dry weight (mg)	40.7 ± 6.3	9	36.0 ± 5.2	15	ns
Water content (%)	81.3 ± 0.5	9	81.5 ± 1.3	15	ns
Organography					
GI package	19.8 ± 1.0	9	21.8 ± 0.3	15	ns
Small intestine	6.3 ± 0.3	9	7.2 ± 0.4	15	ns
Stomach	1.8 ± 0.1	9	2.1 ± 0.1	15	ns
Caecum	2.6 ± 0.1	9	3.1 ± 0.2	15	ns
Colon	1.9 ± 0.1	9	2.0 ± 0.1	15	ns
Chyme (mL)	0.3 ± 0.0	9	0.4 ± 0.0	15	ns
ILA (mm ²)	0.1 ± 0.0	9	0.2 ± 0.0	15	ns
Duodenum contractility					
Frequency (% of − DOX)	100 ± 2	8	99 ± 2	8	ns
Amplitude (% of − DOX)	100 ± 16	8	99 ± 13	8	ns
Frequency (% change-TRAM-34)	103 ± 1	8	100 ± 3	8	ns
Amplitude (% change-TRAM-34)	99 ± 18	8	98 ± 24	8	ns
Colon contractility					
Frequency (% of − DOX)	100 ± 6	8	116 ± 7	8	ns
Amplitude (% of − DOX)	100 ± 17	8	96 ± 19	8	ns
Frequency (% change-TRAM-34)	99 ± 4	8	98 ± 4	8	ns
Amplitude (% change-TRAM-34)	105 ± 20	8	96 ± 12	8	ns

d: day. GI, gastrointestinal. ILA: Small intestine lumen area. ns: not significant.

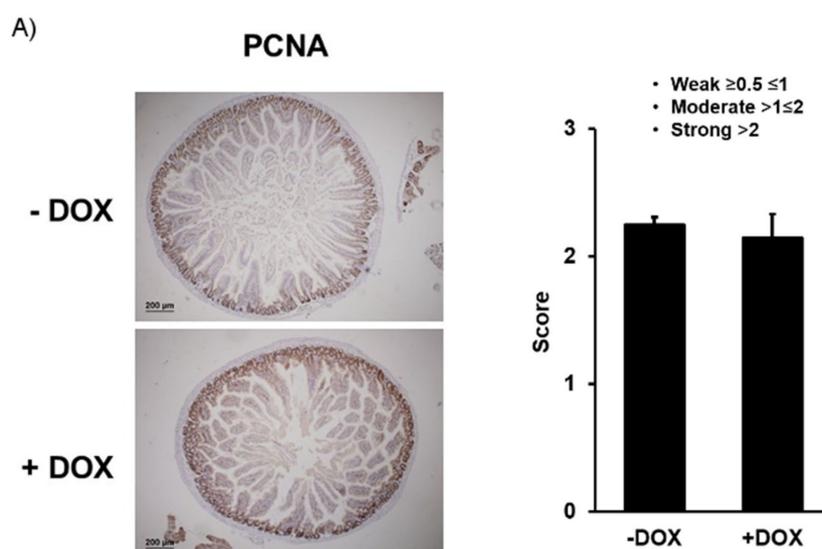


Figure 8. Cont.

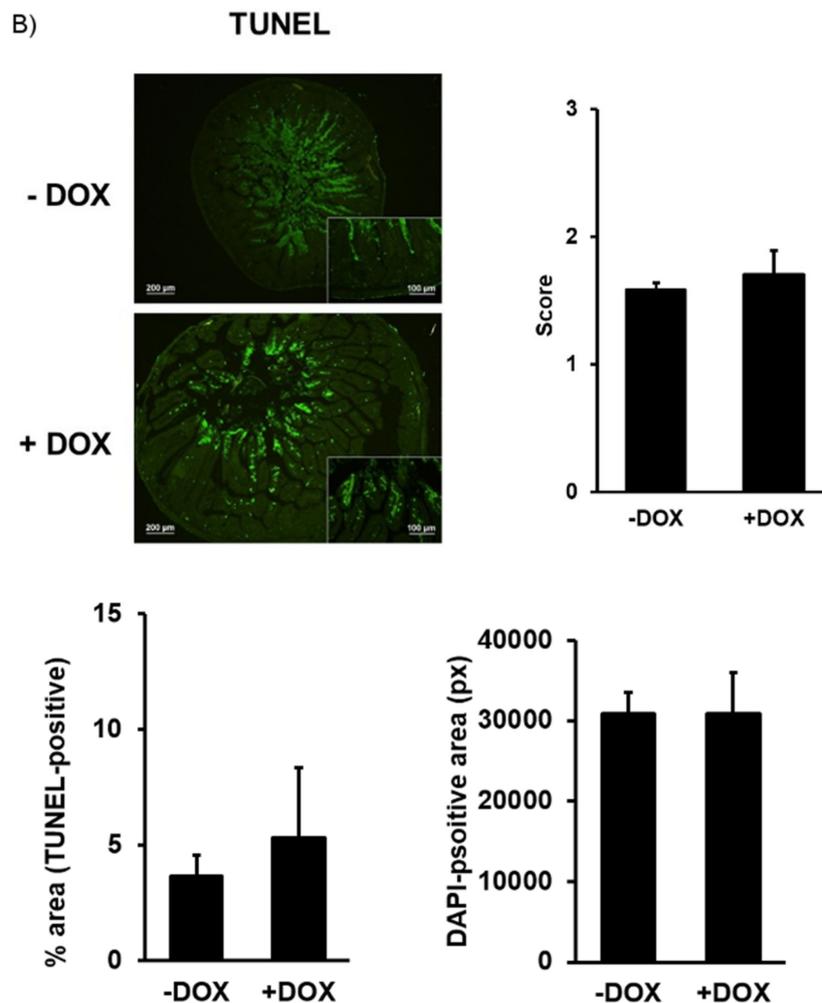


Figure 8. Immune histological examination of PCNA protein expression and TUNEL in KCa3.1– mice. (A) PCNA-stained and hematoxylin–eosin-counterstained epithelium of the untreated (– DOX) and DOX-treated KCa3.1– (+ DOX) mice and qualitative scores of intensity. (B) Apoptosis in the treated and untreated KCa3.1– mice determined by TUNEL, qualitative scores (panel on right), and quantitative evaluation (lower panels of signal intensity (% TUNEL-positive; on left) normalized to epithelial area and total DAPI-positive area (pixel (px); on right)). The data are means \pm SEM., $n = 4$ (mice).

3. Discussion

Epithelial KCa3.1 channels are thought to play physiological roles in water and chloride transport in the intestine [3] and pathological roles in organ remodeling, inflammation, and cancer as a pro-proliferative and potentially oncogenic channel [15,21,22]. Concerning physiological and pathophysiological roles in the intestinal epithelium *in vivo*, insight is still limited, perhaps with the exception of an efficacy of KCa3.1 inhibition to treat cholera-toxin-induced diarrhea in mice [4]. We, therefore, developed a novel *in vivo* approach of genetically encoded and inducible overexpression or suppression of KCa3.1 in the intestinal epithelium. Our main findings are that sub-chronic two-week overexpression of KCa3.1 in the intestinal epithelium caused duodenal chyme accumulation and reduced spontaneous contractions of duodenum. This can be suppressed by pharmacological channel blockade *in vivo*. Concerning KCa3.1 as a potential pro-proliferative mediator, KCa3.1 overexpression did not change epithelial proliferation but lowered the rates of apoptosis, suggesting decreased turnover, and thereby, an impact of sub-chronic KCa3.1 overexpression on intestinal tissue homeostasis. In contrast to overexpression, sub-chronic suppression of functional KCa3.1 expression had no impact on duodenal and colonic functions. Together, by testing two new genetic models of experimental

manipulation of KCa3.1 expression levels, we suggest that sub-chronic KCa3.1-overexpression is capable of altering intestinal homeostasis and transport functions.

Until now, a genetic model of inducible and epithelium-specific KCa3.1 overexpression did not exist. Our genetic KCa3.1+ model consisting of a murine *Kcnn4* transgene under the control of the epithelium-specific DOX-sensitive transactivator (TET-on system) proved to be functional, as we found a solid 22-fold overexpression at the duodenal level and a 40-fold overexpression in the isolated epithelium, fostering tissue specificity of transgene expression in the epithelium (Figure 1B). Overexpression in non-epithelial tissues, such as smooth muscle, skeletal muscle, or nerve and endocrine systems, does not occur in this inducer strain [23].

The first major finding of the present study was that overexpression of epithelium-specific KCa3.1 caused an overt intestinal phenotype with a visibly inflated and heavier duodenum, caused by a substantial accumulation of chyme (Figure 2C). The caecum was also heavier, and the amount of stool pellets present in the colon was increased, suggesting alterations, either of absorption, water/salt imbalance, tissue homeostasis, or intestinal contractility.

In relation to water/salt balance, we did not observe alterations of the electrolyte concentrations in the chyme, stool, or blood, and the water content of the stool was normal (Figure 3), suggesting no overt electrolyte imbalance and dehydration as a result of higher K channel functions, related chloride secretion, and corresponding water movements. However, alterations of chyme electrolytes may have been masked by higher water consumption and the larger chyme content. Still, future cell biological studies focusing on electrolyte transport *in vitro* may provide deeper insight into the cellular consequences of KCa3.1 overexpression that are beyond the scope of the present *in vivo* study.

Concerning KCa3.1 as a channel with tissue homeostasis regulating pro-proliferative function, our histological and immune histological studies excluded tissue hyperplasia, villi overgrowth, or other alterations in the tissue architecture that could explain the visible morpho-anatomical phenotype. Yet, we revealed a decreased rate of apoptotic cells in the distal villi that may represent a trend towards a slower cell turnover and thus points to the role of KCa3.1 in the regulation of intestinal tissue homeostasis.

The second major finding of our study was the reduced frequency of spontaneous duodenal and colonic contractions in KCa3.1-overexpressing mice (Figure 5) that may be the likely cause of chyme and stool accumulation. Yet, when thinking on the underlying cellular mechanisms, this was at first glance surprising, because epithelial KCa3.1 has not been related to control of muscle contractility so far. However, this may still be possible if one speculates that higher K secretion from strongly and perhaps non-polarized KCa3.1-overexpressing epithelium increases the local interstitial K concentrations. One would, thus, expect larger or smaller contractions or contractions with increased frequency, because elevations of extracellular K concentration can have, at first sight, a paradoxical relaxing effect (via stimulation of hyperpolarizing inward-rectifying K channels) or if large, a depolarizing and pro-contractile effect on the duodenal smooth muscle layer. One may also speculate that the higher interstitial K concentration may also affect the activity of enteric neurons and thus the frequency of the contraction. To determine which possibility was more likely, we tested the effects of a KCa3.1-blocker and found that the inhibition of KCa3.1 did not alter the frequency or amplitude of a spontaneous contraction in either KCa3.1-overexpressing mice or untreated mice. This suggests that the lower frequency is not a result of a direct impact of epithelial KCa3.1 transgene function on smooth muscle contractility. Instead, it may reflect a secondary, adaptive phenomenon, perhaps similar to epithelial disturbance, because the lower frequency would slow down propulsion and transit (leading to the observed chyme and stool accumulation) and, thereby, increase absorption time. This possible scenario is further supported by the results of the Senicapoc trial, which demonstrate that channel inhibition *in vivo* prevents the complete intestinal phenotype, i.e., the lower frequency of spontaneous contractions, the duodenal lumen enlargement, chyme accumulation, and increased stool amounts and water intake. Again, future cell biological studies will help to characterize the nature of the epithelial

disturbance causing these alterations. Yet, we can exclude epithelial cell destruction, depletion or rupture, inflammation, and major electrolyte imbalances as primary causes.

Concerning the inducible epithelium-specific deletion model, we indeed found that the model was functional as DOX-induced CRE-mediated excision of the pore-encoding exon 4 occurred at the epithelial levels. However, the DOX-treated mice did not develop any intestinal or other overt phenotype. This was perhaps also to be expected, because life-long loss of KCa3.1 in complete KCa3.1-KO [24] does not show an overt phenotype at the intestinal level or epithelial level but shows endothelial dysfunction [25], defects in erythrocyte volume regulation and adaptive and slowly progressing splenomegaly [24], behavioral alterations [26] and the development of less experimental fibrosis [9], brain damage post experimental mean cerebral artery occlusion [27], and tracheal transplant obstruction [13].

In conclusion, our in vivo study on novel genetic models of inducible KCa3.1 overexpression or suppression identifies epithelial KCa3.1 overexpression as a trigger for chyme accumulation and the reduction of spontaneous contractility. Our findings can benefit the understanding of the cellular mechanisms of small intestine adaptation [28] to surgery and mechanisms to increase nutrient and water absorption in general.

4. Materials and Methods

4.1. Epithelium-Specific Inducible KCa3.1+ and Inducible KCa3.1 – Mice

Overexpressors: Our TRE-Tg *Kcnn4* mice were generated at Unitech Co., Ltd. (Chiba, Japan). Briefly, we constructed a tetracycline-regulated *Kcnn4* expression construct by subcloning PCR-amplified cDNA encoding the open reading frame of *Kcnn4* (gene ID16534) into the pTRE-Tight expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). The construct was then injected into the pronuclei of fertilized mouse oocytes of the C57BL/6J strain. The putative TRE-Tg *Kcnn4* founders obtained were genotyped by PCR with primers specific for the murine *kcnk4* sequence (*Kcnn4*: F-CAAGCACACTCGAAGGAAGGACTC; R-GGAGATGTCCACCATGGAATTCAC). Then, 2 founders were crossed with wild-type C57BL/6J mice to generate the F1 generation. Furthermore 1 line was inbred over 2–3 generations and subsequently crossed with B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm1(rfTA*M2)Jae/J+. Routine genotyping was performed by using DNA from tail tips, PCR primers (for *Kcnn4*: see above; for ROSA as provided by the supplier (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME USA), and SuperHotTaq Master mix (BIORON GMBH, Ludwigshafen, Germany). The cycle program was as follows: 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 20 s, 56 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and cooling to 10 °C. PCR products for wt (330 bp) and *kcnk4* (139 bp) were analyzed by gel electrophoresis (1.5% agarose, not shown).

For transgene induction, double hemizygous male and female offspring (8–20 weeks old) received doxycycline (DOX, 1 mg/mL water) for 2 weeks. Duodenum segments were fixated in neutral-buffered formaldehyde (4%) or stored at –80 °C for later quantitative PCR analysis. A group of mice received DOX together with Senicapoc-containing chow, giving a dose of 30 mg/kg/day, which is known to produce pharmacologically relevant plasma levels above 100 nM at sacrifice. The expression levels were determined by quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated with TriReagent (MCR, Cincinnati, OH, USA) and purified using a RNA Clean-up and Concentration-Micro-Elute kit (Norgen Biotek, Thorold, ON, Canada). Digestion of genomic DNA was done by using the Ambion DNA-free kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The quality and quantity of extracted RNA were determined using the NanoDrop1000 spectrometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). A total of 600 ng of total RNA were reverse-transcribed with Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers. Then, 10 ng cDNA was amplified using SYBR Select Master Mix and a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the following primers for *Kcnn4*: F-GTCTGCTGCACAGCTCTCTCT; R-TCCTTCCTTCGAGTGTGCTT; expected product size 176 bp). The cycle protocol was as follows: 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s repeated

for 40 cycles. The expression levels were normalized to the expression of *Gapdh* as the reference gene (primer: F-AGGGAGATGCTCAGTGTGG; R-CAATGAATACGGCTACAGCAAC) using the following formula: % of *Gapdh* = $\text{Efficiency}(\text{Gapdh})^{Cq(\text{Gapdh})} / \text{Efficiency}(\text{Kcnn4})^{Cq(\text{Kcnn4})} \times 100$.

Conditional knockout: *Kcnn4*-floxed mice were generated by Biocytogen, LCC (Worcester, MA USA). Briefly, the *Kcnn4* gene was modified by the insertion of two synthetic loxP sites placed in such a way as to leave the *Kcnn4* gene fully functional (Figure 7). To achieve this, loxP and FRT sites were introduced into the targeting vector: two FRT sites flanking the neo selection cassette were placed 239 bp downstream of exon 4. The *SspI*-tagged loxP site was inserted into the third intron and the *HindIII*-tagged loxP site downstream of the second FRT site. The 7.4 kb 5' homologous arm and the 4.3 kb 3' homologous arm were introduced into the targeting vector by bacterial artificial chromosomes (BAC) recombination. The *Asc I* linearized targeting vector was electroporated into C57BL/6J ES cells. Homologous recombinant clones were identified by the hybridization of *Ssp I*-digested genomic DNA with probe 1 and *HindIII*0 digested genomic DNA with probe 2. The wild-type *SspI* fragment was 11.2 kb, and the mutant fragment was expected to be 9.5 kb. The wild-type *HindIII* fragment was 6.6 kb, and the mutant fragment was expected to be 5.5 kb. The mice were produced by standard blastocyst injection procedure. The mice were genotyped by standard PCR on tail tips using the primers *Kcnn4*-A1 LoxP-F TCATCCTCCATAATGCTGCGATCT and *Kcnn4*-A2 LoxP-R CAAGTTTAGGTCTGGTCAAGCCTG, giving products for the wt allele (247 bp (wt) and *Kcnn4*-flox allele (311 bp). Homogenous *Kcnn4*-floxed mice were then crossed with conditional cre-recombinase expressing B6. Cg-Tg(tetO-cre)1Jaw/J (Jackson Laboratory) or Cg-Gt(ROSA)26Sortm1(rtTA*M2)Jae/J+ (Jackson Laboratory). Cre and ROSA strains were genotyped according to the supplier's protocol. Offspring homogenous for both gene modifications were inbred until mice homogenous for all three modifications (in the following referred to as conditional KCa3.1–) were obtained.

For epithelial specific suppression, KCa3.1– mice received DOX (1 mg/mL) for 2 weeks. To demonstrate successful deletion of exon 4, mRNA was extracted and reverse-transcribed using the protocols described above. Successful deletion of exon 4 in the duodenum was verified by RT-PCR using the forward primers GTGGCCAAGCTGTACATGA (exon 3) and the reverse primer TCCTTCCTTCGAGTGTGCTT (exon 6). The reaction amplified a truncated fragment (280 bp; lacking exon 4 (136 bp) in the DOX-treated conditional KCa3.1– and the larger wt fragment (416 bp, un-cut by CRE) indicating expression of the wt KCa3.1 or un-cut conditional KCa3.1– in other duodenal cells than the epithelium (Figure 7). The intensity of the small and large fragments per lane was analyzed on black/white-inverted images of electrophoresis gel (1.5% agarose supplemented with Gelred®), and the pixel number per fragment was quantified using the histogram function of the ImageJ program. The ratio of the pixel number (large fragment/small fragment) was calculated and represented in the graph of Figure 7.

All the procedures were approved by the Universidad de Zaragoza Animal Ethics Committee (PI27/13; PI28/12; PI37/13/16; PI32/15 (09 October 2015) and in accordance with the ARRIVE guidelines.

4.2. Tissue Preparation

After the mice were sacrificed, the gastrointestinal package was removed and placed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) solution. All the organs (stomach, small intestine, caecum, and large intestine) were weighed. The content of the small intestine was measured and kept for electrolytic studies. The duodenum and colon were cut in segments for different studies. The initial portion was prepared for histopathology. The middle portion was used for myography studies, and the more distal portion was used for qPCR-studies.

4.3. Histology

Segments of proximal duodenum were fixed in 4% neutral-buffered formaldehyde, embedded in paraffin blocks and cut into 4-µm-thick sections. They were stained with hematoxylin–eosin and

examined. The thickness of the longitudinal and circular smooth muscle layers and the cross-sectional area of the duodenal wall were determined. The thickness was measured at 3 different points using a Nikon Eclipse Ci microscope, a Nikon DS-Ri 1 digital still camera, and the Nikon NIS calibrated digital image analysis system (Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands). The cross-sectional area was determined using ImageJ (downloaded from <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Immunohistochemistry of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): 5- μm -thick tissue sections were placed on silanized slides. After de-paraffinization, endogenous peroxidase was quenched by immersing the samples in methanol containing 0.03% hydrogen peroxide. Heat antigen retrieval was performed in pH6.5 10 μM citrate-based buffered solution (Dako, Santa Clara, CA, US). In order to prevent non-specific binding, the samples were incubated with Protein Block (Dako). The samples were incubated overnight at 4 °C with mouse monoclonal antibody against PCNA (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands, 1:500), followed by incubation with an anti-mouse polymer-based Ig coupled to peroxidase (Cell Signaling) for 30 min at RT. Then, the sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin.

Apoptosis was determined by using TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase mediated X-dUTP nick end labeling) assay. Briefly, tissue sections (5 μm) were placed on silanized slides. The sections were de-paraffinized and rehydrated and then treated with Proteinase K (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 min, room temperature) following by washing 2 times with PBS. Afterwards, the sections were incubated for 1 h at 37 °C with the in situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. For nuclear counterstaining, the samples were incubated with H \ddot{o} chst-33258 (Sigma, Darmstadt, Germany) at a final concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ and mounted with Vectashield mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA).

The sections were examined with an Olympus BX-61 epifluorescence microscope equipped with filter sets for fluorescence microscopy: ultraviolet (UV, 365 nm, exciting filter UG-1 (ultraviolet glas-1) and blue (450–490 nm, exciting filter BP 490). Photographs were taken with an Olympus CCD DP70 digital camera and processed with the Adobe PhotoShop 7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). For quantifying and comparing PCNA expression and apoptosis, the duodenal sections were scored by three investigators (R.K., A.-L.G.-O., and A.O.-V.), independently and in a blinded fashion, using an in-house scoring system. The individual scores were averaged. For the quantification of signal intensity, we measured DAPI-positive and TUNEL-positive areas using the Fiji software for image analysis and calculated the percentage of TUNEL-positive areas ($(\text{pixels(TUNELpositive)}/\text{pixels(DAPI-positive)}) \times 100$).

4.4. Intestinal Contractility Studies

The middle of the duodenum and colon were immediately washed with cold Ringer Krebs solutions (NaCl 120 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 24.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, and glucose 5.6 mM, pH 7.4), cleaned from mesenteric attachment, and cut into segments. Whole segments (10 mm long) were suspended in the direction of longitudinal smooth muscle fibers in an organ bath containing 5 mL of Ringer Krebs, maintained at 37 °C and were continuously gassed with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Muscle tension of each segment were measured isometrically with an initial tension of 9.8 mN, and changes in mechanical activity were amplified, recorded on a computer for analysis (AD Instruments Inc, Milford, MA, USA), and digitized at a sample per second per channel.

After an adaptation period (60 min), we recorded spontaneous contractions and tested the effect of TRAM-34 (1 μM , 15 min exposure time), a KCa3.1 blocker, and of acetylcholine (ACh, 100 μM , exposure time 3 min), a cholinergic agonist, on intestinal contractility. To analyze spontaneous contractions, we measured the mean frequency (contractions per minute) and amplitude of force (in gram) over 5 min. The ACh-induced motor responses were measured as integrated mechanical activity per second during the first 3 min of ACh response, minus the integrated area per second of spontaneous contractions. The data are given as g/s and normalized to weight (g) of wet tissue. The responses were normalized

to responses in the control mice (% of – DOX). The amplitude and frequency of the spontaneous contractions in the presence of TRAM-34 were expressed as a percentage of the control (– TRAM-34, before addition of TRAM-34).

4.5. Hydroelectrolytic Determination in Serum, Chyme, and Stools

Stools pellets found in the colon were weighed (Wet Stools), dried for 48 h at room temperature, and then weighed again (Dry Stools). Thereafter, they were re-suspended on 1 mL of deionized water and heated to 65 °C for 60 min. The suspensions were centrifuged at 12,000 g for 5 min. The supernatant was filtered through Millex 0.22 µm filter units, and Na⁺, K⁺, and Cl[−] assays were performed using a standard electrolyte analyzer equipped with ion selective electrodes. The calculation of water content was performed using the following formula: % water = (wet stool (mg) – dry stool (mg)) × 100/wet stool (mg). The blood and chyme samples were also centrifuged at 3500 g for 10 min at 4 °C to separate the serum or supernatant, and the concentration of Na⁺, K⁺ and Cl[−] were determined.

4.6. Statistical Analyses

The data are expressed as mean ± SEM. Normal distribution of the sample was assessed by Shapiro–Wilk test. Student's *T* test or Mann–Whitney test were performed to compare between 2 groups (– DOX vs + DOX, in the different conditions). *p*-values of <0.05 were considered statistically significant. The statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism version 6.0 software (San Diego, CA, US).

Author Contributions: Conceptualization, R.K., M.S.V., and H.M.; methodology, R.K., M.S.V., H.M., S.V., P.C., J.L.-G., M.R.-G., S.V., and P.D.-W.; formal analysis, R.K., M.S.V., H.M., J.L.-G., M.R.-G., P.D.-W., S.V., P.C., and A.O.-V.; investigation, R.K., M.S.V., H.M., M.R.-G., P.C., S.V., A.-L.G.-O., J.L.-G., P.D.-W., V.L., and A.O.-V.; resources, R.K., M.S.V., H.M., P.C., S.V., E.P., and A.-L.G.-O.; experimental discussions, R.K., M.S.V., H.M., and K.L.H.; original draft preparation, R.K., M.S.V., and H.M.; reviewing and editing of manuscript, P.C., K.L.H., E.P., V.L., A.-L.G.-O., E.P., and A.O.-V.; visualization, R.K., M.S.V., H.M., P.D.-W., and J.L.-G.; supervision, R.K., M.S.V., and H.M.; project administration, R.K., M.S.V., and H.M.; funding acquisition, R.K., M.S.V., H.M., and E.P.

Funding: This research was funded by the Government of Aragón (METIC; B04_17R; BSICoS, T39_17R; PhD scholarship to J.L.-G., C072/2014), the Spanish Government and ISCIII (FIS-CB06/07/1036; FIS-PI16/02112), the European Community (FP7-PEOPLE-MC-CIG, ERC-2014-StG-638284), and the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI-R01-HL080173, NCRP-P20-RR018751). K.L.H. received sabbatical support from the University of Otago.

Acknowledgments: We thank Andrea Lorda for the excellent technical assistance and the staff of the animal core facility IACS for genotyping, animal breeding, and collecting tissue. K.L.H. thanks the University of Otago for his sabbatical leave.

Conflicts of Interest: We declare that we have no financial and personal relationships with other people or organizations that can inappropriately influence our work, there is no professional or other personal interest of any nature or kind in any product, service and/or company that could be construed as influencing the position presented in, or the review of, the manuscript entitled. Salvador Valero is the managing partner of Valero Analitca, S.L.

Abbreviations

DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride
DOX	Doxycycline
KCa3.1	Intermediate-conductance calcium-activated potassium channel Type 4
KCa3.1+	Conditional KCa3.1-overexpressing mice
KCa3.1–	Conditional KCa3.1-suppressing mice
<i>Kcnn4</i>	Intermediate-conductance calcium-activated potassium channel Type 4 gene
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
TUNEL	terminal deoxynucleotide transferase mediated X-dUTP nick end labeling

References

1. Wei, A.D.; Gutman, G.A.; Aldrich, R.; Chandy, K.G.; Grissmer, S.; Wulff, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 463–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ishii, T.M.; Silvia, C.; Hirschberg, B.; Bond, C.T.; Adelman, J.P.; Maylie, J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11651–11656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Devor, D.C.; Singh, A.K.; Frizzell, R.A.; Bridges, R.J. Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **1996**, *271*, L775–L784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rufo, P.A.; Merlin, D.; Riegler, M.; Ferguson-Maltzman, M.H.; Dickinson, B.L.; Brugnara, C.; Alper, S.L.; Lencer, W.I. The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K⁺ conductances. Demonstration of efficacy in intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 3111–3120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Al-Hazza, A.; Linley, J.E.; Aziz, Q.; MacLennan, K.A.; Hunter, M.; Sandle, G.I. Potential role of reduced basolateral potassium (KCa3.1) channel expression in the pathogenesis of diarrhoea in ulcerative colitis. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 463–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Di, L.; Srivastava, S.; Zhdanova, O.; Ding, Y.; Li, Z.; Wulff, H.; Lafaille, M.; Skolnik, E.Y. Inhibition of the K⁺ channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1541–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hansen, L.K.; Sevelsted-Møller, L.; Rabjerg, M.; Larsen, D.; Hansen, T.P.; Wulff, H.; Knudsen, T.; Kjeldsen, J.; Köhler, R. Expression of T-cell K^v 1.3 potassium channel correlates with pro-inflammatory cytokines and disease activity in ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis* **2014**, *8*, 1378–1391. [[CrossRef](#)]
8. Strøbaek, D.; Brown, D.; Jenkins, D.; Chen, Y.-J.; Coleman, N.; Ando, Y.; Chiu, P.; Jørgensen, S.; Demnitz, J.; Wulff, H.; et al. NS6180, a new KCa3.1 channel inhibitor prevents T-cell activation and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 432–444. [[CrossRef](#)]
9. Grgic, I.; Kiss, E.; Kaistha, B.P.; Busch, C.; Kloss, M.; Sautter, J.; Muller, A.; Kaistha, A.; Schmidt, C.; Raman, G.; et al. Renal fibrosis is attenuated by targeted disruption of KCa3.1 potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14518–14523. [[CrossRef](#)]
10. Huang, C.; Shen, S.; Ma, Q.; Gill, A.; Pollock, C.A.; Chen, X.-M. KCa3.1 mediates activation of fibroblasts in diabetic renal interstitial fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2014**, *29*, 313–324. [[CrossRef](#)]
11. Zhao, L.-M.; Wang, L.-P.; Wang, H.-F.; Ma, X.-Z.; Zhou, D.-X.; Deng, X.-L. The role of KCa3.1 channels in cardiac fibrosis induced by pressure overload in rats. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2015**, *467*, 2275–2285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Roach, K.M.; Wulff, H.; Feghali-Bostwick, C.; Amrani, Y.; Bradding, P. Increased constitutive α SMA and Smad2/3 expression in idiopathic pulmonary fibrosis myofibroblasts is KCa3.1-dependent. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hua, X.; Deuse, T.; Chen, Y.-J.; Wulff, H.; Stubbendorff, M.; Köhler, R.; Miura, H.; Länger, F.; Reichenspurner, H.; Robbins, R.C.; et al. The potassium channel KCa3.1 as new therapeutic target for the prevention of obliterative airway disease. *Transplantation* **2013**, *95*, 285–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Møller, L.S.; Fialla, A.D.; Schierwagen, R.; Biagini, M.; Reul, W.; Klein, S.; Rabjerg, M.; Hansen, L.K.; Schaffalitzky de Muckadell, O.; Koehler, R.; et al. KCa3.1 channels are upregulated in hepatocytes of cirrhotic patients. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, S481. [[CrossRef](#)]
15. D'Alessandro, G.; Catalano, M.; Sciacaluga, M.; Cece, G.; Cipriani, R.; Rosito, M.; Grimaldi, A.; Lauro, C.; Cantore, G.; Santoro, A.; et al. KCa3.1 channels are involved in the infiltrative behavior of glioblastoma in vivo. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bulk, E.; Ay, A.-S.; Hammadi, M.; Ouadid-Ahidouch, H.; Schelhaas, S.; Hascher, A.; Rohde, C.; Thoennissen, N.H.; Wiewrodt, R.; Schmidt, E.; et al. Epigenetic dysregulation of K_{Ca} 3.1 channels induces poor prognosis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 1306–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rabjerg, M.; Oliván-Viguera, A.; Koch Hansen, L.; Jensen, L.; Sevelsted-Møller, L.; Walter, S.; Jensen, B.L.; Marcussen, N.; Köhler, R. High expression of KCa3.1 in patients with clear cell renal carcinoma predicts high metastatic risk and poor survival. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122992. [[CrossRef](#)]

18. Ramachandran, A.; Madesh, M.; Balasubramanian, K.A. Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2000**, *15*, 109–120. [[CrossRef](#)]
19. Wulff, H.; Miller, M.J.; Hansel, W.; Grissmer, S.; Cahalan, M.D.; Chandy, K.G. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8151–8156. [[CrossRef](#)]
20. Sevelsted Møller, L.; Fialla, A.D.; Schierwagen, R.; Biagini, M.; Liedtke, C.; Laleman, W.; Klein, S.; Reul, W.; Koch Hansen, L.; Rabjerg, M.; et al. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 is an important modulator of hepatic injury. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28770. [[CrossRef](#)]
21. Feske, S.; Wulff, H.; Skolnik, E.Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33*, 291–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Köhler, R.; Oliván-Viguera, A.; Wulff, H. Endothelial small- and intermediate-conductance K channels and endothelium-dependent hyperpolarization as drug targets in cardiovascular disease. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *77*, 65–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hochedlinger, K.; Yamada, Y.; Beard, C.; Jaenisch, R. Ectopic Expression of Oct-4 Blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **2005**, *121*, 465–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Grgic, I.; Kaistha, B.P.; Paschen, S.; Kaistha, A.; Busch, C.; Si, H.; Köhler, K.; Elsässer, H.-P.; Hoyer, J.; Köhler, R. Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2009**, *458*, 291–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Si, H.; Heyken, W.-T.; Wolfle, S.E.; Tysiac, M.; Schubert, R.; Grgic, I.; Vilianovich, L.; Giebing, G.; Maier, T.; Gross, V.; et al. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 537–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lambertsen, K.L.; Gramsbergen, J.B.; Sivasaravanaparan, M.; Ditzel, N.; Sevelsted-Møller, L.M.; Oliván-Viguera, A.; Rabjerg, M.; Wulff, H.; Köhler, R. Genetic KCa3.1-deficiency produces locomotor hyperactivity and alterations in cerebral monoamine levels. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chen, Y.-J.; Nguyen, H.M.; Maezawa, I.; Grössinger, E.M.; Garing, A.L.; Köhler, R.; Jin, L.-W.; Wulff, H. The potassium channel KCa3.1 constitutes a pharmacological target for neuroinflammation associated with ischemia/reperfusion stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2016**, *36*, 2146–2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tappenden, K.A. Intestinal adaptation following resection. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2014**, *38*, 23S–31S. [[CrossRef](#)]

