

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II**



**ANÁLISIS GENÓMICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA  
INTESTINAL EN TRES MODELOS ANIMALES MEDIANTE MICROCHIPS  
DE DNA Y PCR A TIEMPO REAL**

**BORRADOR  
TESIS DOCTORAL**

***Trinidad Montero Meléndez***

**Granada, 2007**



# ANÁLISIS GENÓMICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL EN TRES MODELOS ANIMALES MEDIANTE MICROCHIPS DE DNA Y PCR A TIEMPO REAL

Memoria que presenta Doña Trinidad Montero Meléndez para aspirar al grado de  
Doctora en Farmacia

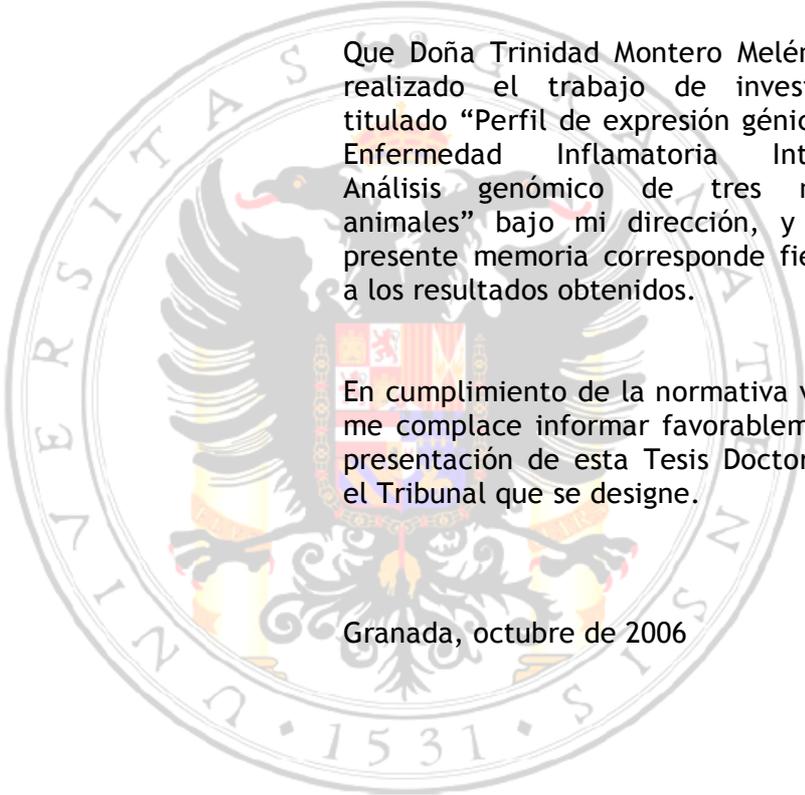


Prof. Dr. D. Antonio Suárez García

Lda. Doña Trinidad Montero Meléndez

D. Antonio Suárez García, Doctor en Farmacia, Profesor Titular de Universidad

CERTIFICA:

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central eagle with its wings spread, perched on a shield. The shield is divided into four quadrants with various symbols. The eagle is surrounded by a circular border containing the Latin text 'UNIVERSITAS GRANATA' at the top and '1531' at the bottom, separated by dots.

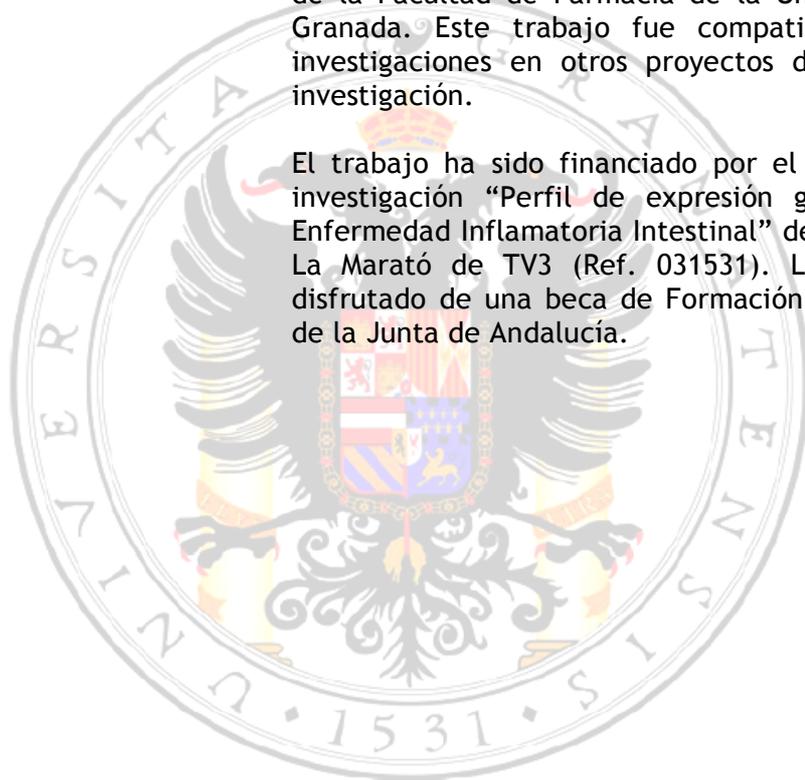
Que Doña Trinidad Montero Meléndez ha realizado el trabajo de investigación titulado “Perfil de expresión génica en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Análisis genómico de tres modelos animales” bajo mi dirección, y que la presente memoria corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

En cumplimiento de la normativa vigente, me complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis Doctoral ante el Tribunal que se designe.

Granada, octubre de 2006

El presente trabajo de investigación contiene parte de la labor experimental realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Este trabajo fue compatibilizado con investigaciones en otros proyectos del grupo de investigación.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación “Perfil de expresión génica en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal” de la Fundació La Marató de TV3 (Ref. 031531). La autora ha disfrutado de una beca de Formación de Doctores de la Junta de Andalucía.



Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos nacionales e internacionales y revistas de divulgación científica:

#### Comunicaciones a congresos

**Montero, T., Llor, X., Vieites, J.M., Sánchez de Medina, F., Martínez, O., Gil, A., Gassull M.A., Suárez A. *Análisis genómico de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: perfil de expresión de tres modelos experimentales.*** Comunicación oral. XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Málaga, 2007. Publicación en libro de actas.

**T. Montero, J.M. Vieites, F. Sánchez de medina, A. Zarzuelo, X. Llor, A. Suárez. *Análisis genómico comparado de la colitis experimental inducida por DSS y TNBS en modelo de rata.*** Comunicación póster. Acto de celebración del nacimiento de Severo Ochoa. Madrid, 2005. Publicación en libro de actas.

Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., Suárez, A., Vieites, J.M., **Montero, T., Zarzuelo, A. *Perfil genómico de dos modelos de enfermedad inflamatoria intestinal.*** Comunicación póster. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Gerona, 2005. Publicación en libro de actas.

Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., Suárez, A., Vieites, J.M., **Montero, T., Zarzuelo, A. *Genomic profiling of two models of inflammatory bowel disease.*** Comunicación póster. Symposium "Inflammatory bowel disease: Research drives clinics". Muenster (Alemania), 2005. Publicación en libro de actas.

**T. Montero, J.M. Vieites, F. Sánchez de medina, A. Zarzuelo, X. Llor, A. Suárez. *Análisis genómico de la enfermedad inflamatoria intestinal.*** Comunicación póster. XXVIII Congreso de la SEBBM. Zaragoza, 2005. Publicación en libro de actas.

#### Comunicaciones a congresos publicadas en revistas

**Montero, T., Vieites, J.M., Sánchez de Medina, F., Llor, X., Martínez, O., Gil, A., Gassull M.A., Suárez A. *Genomic expression analysis reveals new molecular and cellular events involved in the pathogenesis of DSS-induced colitis.*** Comunicación póster. Digestive Diseases Week, 2007. Washington D.C. (USA). *Gastroenterology* 2007;132(4, supl1):A395.

**Montero, T., Vieites, J.M., Llor, X., Martínez, O., Sánchez de Medina, F. Gil, A., Gassull M.A., Suárez, A. *Comparative genomic analysis of rat IBD models identifies new genes and biological processes as potential therapeutic targets.*** Comunicación póster. Digestive Diseases Week, 2007. Washington D.C. (USA). *Gastroenterology* 2007;132(4, supl1):A394.

**Martínez, O., Montero, T., Suárez A., Llor, X., Vieites, J.M., Suárez, MD, Zarzuelo, A., Gassull M.A., Sánchez de Medina, F. *Effect of sulfasalazine on the colonic transcriptome in rat TNBS colitis.*** Comunicación póster. Digestive Diseases Week, 2007. Washington D.C. (USA). *Gastroenterology* 2007;132(4, supl1):A234.

**Montero, T., Vieites, J.M., Llor, X., Martínez, O., Sánchez de Medina, F., Suárez, A. *A comparative genomic perspective on murine inflammatory bowel disease models.*** Comunicación póster. Digestive Disease Week 2006. Los Ángeles (USA). *Gastroenterology* 2006;130(4, suppl.2):A551.

**Montero, T., Martínez, O., Vieites, J.M., Llor, X., Gassull M.A., Suárez M.D., Zarzuelo A., Suárez A., Sánchez de Medina, F. *Efectos de la sulfasalazina en el perfil de expresión génica de la colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico en ratas.*** Comunicación oral. Semana de las

enfermedades digestivas, LXV Congreso anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Granada. Revista Española de Enfermedades Digestivas 2006;98(supl.1):3.

**Montero, T., Vieites, J.M., Llor, X., Martínez, O., Sánchez de Medina, F., Suárez, A. *Análisis genómico comparativo de varios modelos animales de Enfermedad Inflamatoria Intestinal.*** Comunicación póster. Semana de las enfermedades digestivas, LXV Congreso anual de la Sociedad Española de Patología Digestiva. Granada. Revista Española de Enfermedades Digestivas 2006;98(supl.1):39.

# *ÍNDICE*



# ÍNDICE

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

## **A) EL INTESTINO**

- A1. Anatomía y funciones del intestino
- A2. El epitelio intestinal
  - A2.1 Mecanismos de reparación epitelial
- A3. La microbiota intestinal
- A4. El tejido linfoide asociado a las mucosas, MALT
- A5. La tolerancia inmunológica
  - A5.1 Tolerancia oral

## **B) LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

- B1. Aspectos generales
  - B1.1 Epidemiología y calidad de vida
  - B1.2 La enfermedad de Crohn
  - B1.3 La colitis ulcerosa
- B2. Etiología
  - B2.1 Factores ambientales
  - B2.2 Factores genéticos
  - B2.3 Alteraciones en el sistema inmune
  - B2.4 Patógenos
- B3. Patología de la inflamación intestinal
- B4. Diagnóstico de la EII
- B5. Tratamiento de la EII
  - B5.1 Tratamiento médico general
  - B5.2 Probióticos y prebióticos
  - B5.3 Nuevas estrategias terapéuticas

## **C) LOS MODELOS ANIMALES DE INFLAMACIÓN INTESTINAL**

- C1. Aspectos generales
- C2. Modelo de inducción con sulfato de dextrano
- C3. Modelo de inducción con ácido trinitrobencenosulfónico
- C4. Modelo IL10-/-

## ***D) BIOLOGÍA DE SISTEMAS, TRANSCRIPTÓMICA Y BIOINFORMÁTICA***

### **D1. Biología de Sistemas: la ciencia del siglo XXI**

- D1.1 Desarrollo y retos de la Biología de Sistemas
- D1.2 Concepto de sistema y propiedades emergentes
- D1.3 Investigación en Biología de Sistemas
- D1.4 La era de las “ómicas”

### **D2. Transcriptómica**

- D2.1 El estudio de la expresión génica
- D2.2 Los microarrays de DNA
  - D2.2.1 Introducción, tipos y aplicaciones
  - D2.2.2 Microarrays: de la Genómica funcional a la Biología de Sistemas
  - D2.2.3 Estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal mediante microarrays de DNA
  - D2.2.4 Estandarización de los trabajos de microarrays
- D2.3 Postgenómica: PCR a tiempo real
  - D2.3.1 PCR cuantitativa vs PCR traducional
  - D2.3.2 Métodos de detección

### **D3. Bioinformática**

- D3.1 Como surge la Bioinformática
- D3.2 Herramientas bioinformáticas para el análisis de microarrays

<b>MATERIALES</b>
-------------------

### ***1. Animales***

### ***2. Productos químicos***

### ***3. Microarrays y kits comerciales***

#### **4. Programas informáticos**

#### **5. Equipamientos generales**

### **MÉTODOS**

#### **1. Diseño experimental de los modelos animales de inflamación intestinal**

- 1.1 Inducción de la colitis con sulfato de dextrano sódico
- 1.2 Inducción de la colitis con ácido trinitrobencenosulfónico
- 1.3 Colitis en ratones *knockout* IL10<sup>-/-</sup>

#### **2. Recogida de muestras de colon**

#### **3. Seguimiento de la colitis y selección de las muestras**

- 3.1 Seguimiento macroscópico de la inflamación
- 3.2 Medida de la actividad mieloperoxidasa
- 3.3 Selección de las muestras para el análisis genómico

#### **4. Extracción y preparación de las muestras de RNA**

- 4.1 Tratamiento del material con DEPC
- 4.2 Extracción del RNA
- 4.3 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA
- 4.4 Visualización de la integridad del RNA
- 4.5 Limpieza del RNA
- 4.6 Envío de las muestras

#### **5. Análisis genómico**

- 5.1 Microarrays
- 5.2 Obtención del cRNA marcado con biotina
  - 5.2.1 Síntesis del cDNA
  - 5.2.2 Limpieza del cDNA
  - 5.2.3 Síntesis del cRNA y marcaje con biotina

- 5.2.4 Fragmentación del cRNA
- 5.3 Hibridación con los chips**
- 5.4 Lavado, tinción y escaneado**
  - 5.4.1 Lavado y tinción
  - 5.4.2 Escaneado
- 5.5 Controles de calidad**
  - 5.5.1 Genes domésticos
  - 5.5.2 Controles *spike*
  - 5.5.3 P call %
  - 5.5.4 Array Outlier %
  - 5.5.5 Gráficas NUSE
- 5.6 Normalización de los datos**
- 5.7 Análisis de agrupamientos**
- 5.8 Análisis funcional 1: “*functional enrichment*”**
- 5.9 Análisis funcional 2: “*gene-set enrichment*”**
- 5.10 Visualización de genes en árboles**
- 5.11 Análisis de dianas terapéuticas**

## **6. Análisis postgenómico**

- 6.1 Sistema de tarjetas “*TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Array*” de Applied Biosystems
- 6.2 Protocolo de transcripción inversa
- 6.3 Protocolo de PCR
- 6.4 Análisis de datos

# **RESULTADOS**

## **1. Resultados del modelo de sulfato de dextrano**

- 1.1 Desarrollo y evolución de la colitis
- 1.2 Análisis temporal
  - 1.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes
  - 1.2.2 Análisis de agrupamiento de muestras
  - 1.2.3 Agrupamiento de genes

### 1.3 Análisis de expresión diferencial

1.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

1.3.2 Comparación de las tres fases

1.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda (grupo DSS5%)

1.3.3.1 Análisis tradicional: “*functional enrichment*”

1.3.3.2 Nuevas propuestas: “*gene-set enrichment*”

1.4 Validación de genes por PCR a tiempo real

## 2. Resultados del modelo de ácido trinitrobencenosulfónico

2.1 Desarrollo y evolución de la colitis

2.2 Análisis temporal

2.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes

2.2.2 Análisis de agrupamiento de muestras

2.2.3 Agrupamiento de genes

2.3 Análisis de expresión diferencial

2.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

2.3.2 Comparación de las fases

2.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda (grupo TNBS-colitis)

2.3.3.1 Análisis tradicional: “*functional enrichment*”

2.3.3.2 Análisis de “*gene-set enrichment*”

2.4 Validación de genes por PCR a tiempo real

## 3. Resultados del modelo de ratones *IL10*<sup>-/-</sup>

3.1 Desarrollo y evolución de la colitis

3.2 Análisis temporal

3.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes

3.2.2 Análisis de agrupamiento de muestras

3.3 Análisis de expresión diferencial

3.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

3.3.2 Comparación de las condiciones convencionales y libres de patógenos específicos

2.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda en condiciones convencionales (grupo 9CC)

#### **4. Análisis comparativo de los tres modelos animales**

4.1 Comparación de las secuencias significativas

4.2 Análisis funcional

4.3 Análisis de biomarcadores comunes entre los tres modelos

#### **4. Análisis exploratorio de dianas terapéuticas**

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

ANEXOS

REFERENCIAS

# *ABREVIATURAS*



## ABREVIATURAS

5-ASA	Ácido 5 aminosalicílico
6-MP	6 mercaptopurina
ATCB1	ATP-binding cassette, sub-family B member 1
ATCG8	ATP-binding cassette, sub-family G member 8
ALDOB	Aldolase B
APC	Antigen presenting cell
APOE	Apolipoprotein E
ASCA	Anti saccharomyces cerevisiae antibody
ATG16L1	Autophagy related 16-like 1
AZA	Azatioprina
BSA	Bovine serum albumin
CARD15	Caspase recruitment domain family, member 15
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
CD3	Cluster of differentiation 3
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
cDNA	DNA complementario
cm	Centímetros
CRFB4	Cytokine receptor family member B4
cRNA	RNA complementario
CSF	Colony-stimulating factor
CU	Colitis ulcerosa
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
DC	Dendritic cell
DEFA2	Defensin, alpha 2
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DLG5	Discs, large homolog 5
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic acid
DSS	Dextran sodium sulphate
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
FC	Fold change
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramos
GO	Gene Ontology
GPX1	Glutathione peroxidase 1
GSTMA1	Glutathione S-transferase M
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human leukocyte antigen
IFNB1A	Interferon beta 1A
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IGF	Insulin-like growth factor
IL10	Interleukina 10
IL12	Interleukina 12
IL13	Interleukina 13
IL13	Interleukina 13
IL18	Interleukina 18
IL1B	Interleukina 1B

IL23	Interleukina 23
IL23	Interleukina 23
IL2R $\alpha$	Interleukin 2 receptor, alpha
IL4	Interleukina 4
IL5	Interleukina 5
IL6	Interleukina 6
IL7	Interleukina 7
IL8	Interleukina 8
IL8	Interleukina 8
IL8	Interleukina 8
IRGM	Immunity-related GTPase family, M
ITGB2	Integrin beta 2
KO	Knocked out
LDA	Low Density Array
LDL	Low density lipoprotein
LECAM1	Leukocyte adhesion molecule 1
LLR	Leucine rich repeat
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MBL2	Mannose-binding lectin 2
MDA5	Melanoma differentiation associated protein 5
MDR1	Multidrug resistance 1
mg	Miligramos
MHC	Major histocompatibility complex
MIAME	Minimum information about microarray experiment
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1
MSR2	Macrophage scavenger receptor 2
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NF $\kappa$ B1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
nm	Nanómetros
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OCTN1	Organic cation transporter 1
OCTN2	Organic cation transporter 2
OmpC	Outer membrane porin protein C
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pANCA	Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRR	Pathogen recognition receptor
PTGER4	Prostaglandin E receptor 4
qPCR	Quantitative PCR
Rag2	Recombination activating gene 2
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcription
SCFA	Short chain fatty acid

<b>SCID</b>	Severe combined immunodeficiency
<b>SIGIRR</b>	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor
<b>SLC22A4</b>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4
<b>SLC22A5</b>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5
<b>SOD</b>	Superoxido dismutasa
<b>SPF</b>	Specific pathogen free
<b>SULT1A3</b>	Sulfotransferase family 1A
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TFF</b>	Trefoil factor
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Tumor growth factor $\alpha$
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Tumor growth factor $\beta$
<b>TIRAP</b>	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
<b>TL1A</b>	TNF ligand-related molecule 1
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNBS</b>	Trinitrobenzenesulfonic
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TOLLIP</b>	Toll interacting protein
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor A
<b>VIP</b>	Vasoactive intestinal peptide
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitros



# ***O***BJETIVOS



# OBJETIVOS

## Objetivo general

El objetivo general del Proyecto de Investigación “Gene expresión profiling in inflammatory bowel disease” de la Fundació la Marató de TV3 consiste en realizar un análisis genómico de la enfermedad inflamatoria intestinal en modelos animales de colitis y en enfermos de Crohn y colitis ulcerosa, de forma individualizada y comparada, con el objeto de obtener una visión global del inicio, desarrollo y recuperación de la colitis, conocer los mecanismos moleculares, procesos y funciones biológicas que intervienen, identificar genes biomarcadores y, finalmente, caracterizar potenciales dianas terapéuticas y proponer nuevos tratamientos.

## Objetivos específicos

- 1.** Análisis genómico de la colitis provocada mediante sulfato de dextrano. Caracterización de los procesos biológicos implicados e identificación de genes, rutas de señalización y funciones biológicas relevantes en el modelo.
- 2.** Análisis genómico de la colitis provocada mediante ácido trinitrobencenosulfónico. Caracterización de los procesos biológicos implicados e identificación de genes, rutas de señalización y funciones biológicas relevantes en el modelo.
- 3.** Análisis genómico de la colitis espontánea en ratones knockout IL10<sup>-/-</sup> en condiciones normales y SPF. Caracterización temporal de los procesos biológicos implicados e identificación de genes, rutas de señalización y funciones biológicas relevantes en el modelo.
- 4.** Análisis genómico comparado de la colitis en los tres modelos animales. Caracterización de genes, rutas de señalización y funciones biológicas comunes a los modelos. Identificación de genes biomarcadores de colitis.
- 5.** Identificar genes y procesos biológicos como potenciales dianas terapéuticas para esta patología, mediante la aplicación de nuevas estrategias basadas en la Bioinformática.



# ***INTRODUCCIÓN***



# A) EL INTESTINO

## A1. Anatomía y funciones del intestino

El intestino maduro consiste en un conducto muscular revestido de membrana mucosa. Se divide longitudinalmente en duodeno, yeyuno, íleon (que componen el intestino delgado), ciego, colon y recto (que forman el intestino grueso). En el tubo digestivo se distinguen cuatro capas que son semejantes en toda su extensión excepto la capa mucosa, que varía mucho según las zonas (*Figura 1*). La capa mucosa consiste en un revestimiento epitelial de una sola capa, la lámina propia de sostén y la capa *muscularis mucosae*, que determina movimientos locales y el plegamiento de la mucosa. La capa submucosa está constituida por colágeno laxo y sirve de sostén a la mucosa alojando los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. La capa muscular está formada por músculo liso organizado a su vez en dos capas, una interna circular y otra externa longitudinal. La capa adventicia o serosa es la capa más externa y sirve de sostén donde se alojan los vasos sanguíneos principales y nervios.

La función principal del intestino es la digestión y absorción de nutrientes. Para ello, el intestino incrementa la superficie de absorción de tres formas: pliegues circulares o válvulas de Kerckring, vellosidades y criptas de Lieberkún.



*Figura 1. Sección transversal del intestino*

## A2. El epitelio intestinal

El epitelio que recubre todo el tracto gastrointestinal presenta una estructura muy organizada. Se encuentra plegado formando invaginaciones llamadas criptas. En el intestino delgado existen otros pliegues en forma de dedos conocidos como vellosidades, que no se encuentran en el colon. En el fondo de cada cripta existe una célula madre que a medida que se divide, las células hijas van migrando y diferenciándose a lo largo de la cripta (y de las vellosidades en el caso del intestino delgado) hasta que se descaman hacia el lumen intestinal (Figura 2). Este recambio celular dura entre 24-96 horas. Las células se diferencian principalmente en tres tipos: enterocitos, células de Goblet y células enteroendocrinas. En el intestino delgado existen también las células de Paneth y en algunas criptas se forman además las células M (1).

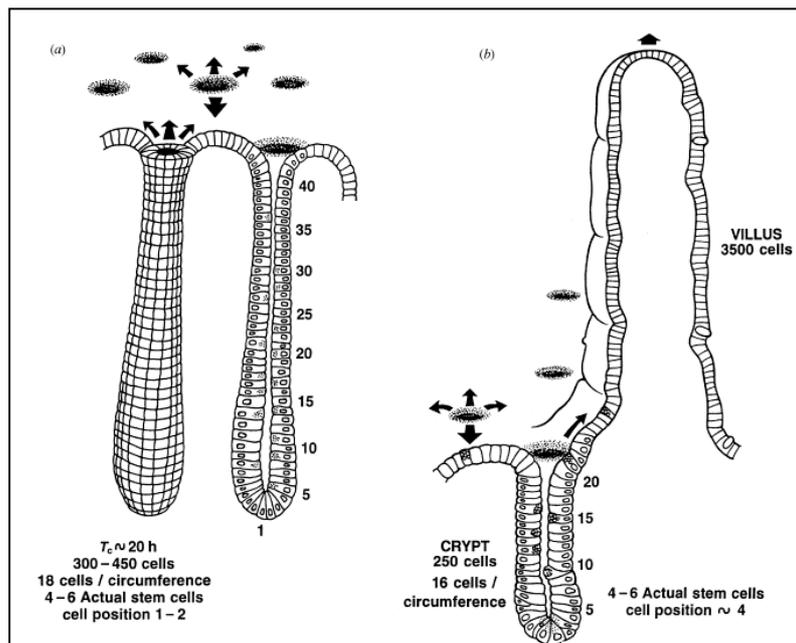


Figura 2. Representación tridimensional de la estructura de las criptas y vellosidades del intestino grueso (A) y delgado (B).

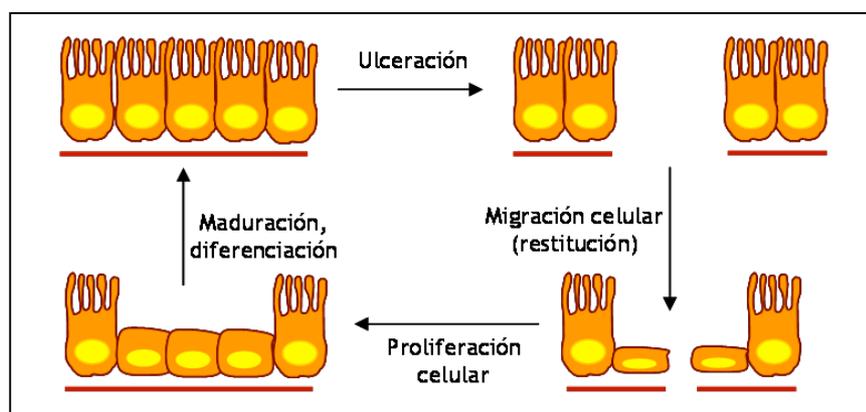
Los enterocitos son las células mayoritarias de la mucosa. Son células polarizadas cuya membrana apical presenta pequeñas proyecciones llamadas microvellosidades (borde encepillo), y están unidas por fuertes uniones intercelulares. Su principal función es la absorción de nutrientes y el transporte de agua y electrolitos, especialmente en el colon, aunque también están implicadas en la presentación de antígenos y en la producción de citocinas (2). También producen enzimas hidrolíticas como la lactasa y la sacarasa-isomaltasa. Las células enteroendocrinas representan un pequeño porcentaje pero pueden producir hasta 15 tipos de hormonas diferentes. Las células de Goblet o también llamadas caliciformes se encargan de producir las mucinas que recubren todo el epitelio intestinal y forman un gel que constituye un mecanismo de barrera frente a antígenos patógenos. También segregan otros factores protectores del intestino como los péptidos trébol (*trefoil factors*) (3). El número de células varía gradualmente, desde un 5% en el intestino delgado hasta el 50% en el colon. Las células de Paneth se encuentran en las criptas y producen

péptidos antimicrobianos como la lisozima y las defensinas. Las células M (*microfolds*) son células epiteliales especializadas que se encuentran sobre las placas de Peyer y poseen micropliegues en la superficie luminal, similares a las microvellosidades, pero menos prominentes. Estas células carecen de glicocalix y están adaptadas para interactuar directamente con moléculas del lumen. Las células M captan antígenos por endocitosis y los presentan a los linfocitos de las placas de Peyer.

En el caso del colon, aunque su diámetro es mayor que el del intestino delgado, el área epitelial es menor ya que la superficie no está tan plegada y no existen vellosidades. En el colon se produce gran cantidad de mucus y su función principal es la regulación del transporte de agua y electrolitos (4).

### A2.1 Mecanismos de reparación epitelial

La superficie epitelial representa una barrera muy importante entre una amplia variedad de agentes tóxicos y antígenos bacterianos presentes en el lumen y el organismo. El daño o destrucción de esta superficie de barrera ocurre en diversas enfermedades y da lugar al aumento en la entrada de agentes tóxicos o inmunogénicos dentro del hospedador, lo que resulta en inflamación, respuesta inmune descontrolada y desequilibrio en la homeostasis del hospedador. Por ello, la rápida reparación del epitelio tras el daño es fundamental para mantener la homeostasis. El intestino posee mecanismos para reestablecer rápidamente la continuidad del epitelio cuando éste ha sido dañado (5). En este proceso intervienen tres mecanismos (*Figura 3*):



**Figura 3.** Mecanismos de reparación epitelial

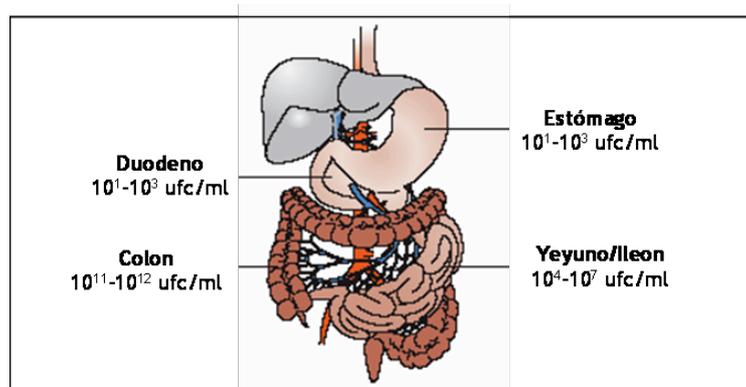
- primero, las células adyacentes a la superficie dañada migran para cubrir el área desprotegida. Este proceso se conoce como restitución epitelial (6).
- las células que han migrado, proliferan para restaurar completamente el daño.
- finalmente, esas células maduran y se diferencian para recuperar la funcionalidad del epitelio.

En estos procesos intervienen varios factores de crecimiento y citocinas (7, 5), que juegan un papel fundamental en la regulación de la diferenciación epitelial, la preservación de la homeostasis y en el

mantenimiento de la integridad de la mucosa. Entre estos factores se incluyen péptidos de las familias TGF $\alpha$ /EGF, TGF $\beta$ , FGF, HGF, IGF, CSF y los péptidos trébol.

### A3. La microbiota intestinal

La población microbiana del tracto digestivo del ser humano constituye un ecosistema enormemente complejo que incluye numerosos tipos de microorganismos. La microbiota de un individuo cualquiera está formada por más de 400 especies diferentes y en cantidad, suponen unas diez veces el número de células eucariotas que forman el cuerpo humano (Figura 4). Por ello, se le conoce como el “órgano” más grande del cuerpo humano y supone una defensa natural para el hospedador. No es de extrañar, por tanto, que cambios en la microbiota intestinal puedan tener repercusiones importantes sobre la salud del individuo.



**Figura 4.** Concentración de bacterias (ufc: unidades formadoras de colonias) en los distintos segmentos del tracto digestivo.

El intestino fetal es estéril pero la colonización comienza inmediatamente tras el nacimiento y está influenciada por el tipo de parto (natural o cesárea), el tipo de alimentación (leche materna), condiciones higiénicas... y sobre todo factores genéticos (8). Está compuesta por bacterias anaerobias (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*) y aeróbicas (*Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*). La flora intestinal ejerce funciones protectoras (competición con patógenos, producción de bacteriocinas...), funciones estructurales (fortificación de la barrera, desarrollo del sistema inmune, inducción de IgA...) y funciones metabólicas (producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de vitamina K, control de proliferación y diferenciación...)

Existe una comunicación constante entre la microbiota y el epitelio intestinal. La correcta interpretación de estas interacciones bacteria-hospedador es lo que permite distinguir los organismos comensales de los patógenos. En la mucosa intestinal existen tres tipos de células que rastrean las bacterias del lumen: los enterocitos, que actúan como “sensores” y secretan quimioquinas y citocinas que alertan al sistema inmune. Las células M, que transportan antígenos del lumen hacia las células

presentadoras de antígenos, y las células dendríticas, que rastrean el contenido intestinal a través de dendritas que introducen entre los enterocitos hasta el lumen. La desregulación de este equilibrio se ha relacionado con diversas enfermedades, como la EII, el cáncer colorrectal, e incluso con la predisposición a la obesidad (9), por eso, la manipulación de la flora intestinal para cambiar la composición de la misma e incrementar las bacterias más beneficiosas, constituye una estrategia terapéutica muy prometedora.

#### **A4. El tejido linfoide asociado a las mucosas, MALT**

Las superficies mucosas del organismo son especialmente vulnerables a infecciones. Son barreras delgadas y permeables debido a sus funciones fisiológicas, como el intercambio de gases (pulmones), absorción de nutrientes (intestino), funciones secretoras (ojos)... La necesidad de que exista esta permeabilidad hace que sean muy susceptibles a infecciones. De hecho, la mayoría de los agentes infecciosos invaden al organismo a través de las mucosas. El intestino, además de estar expuesto a agentes externos, es extremadamente rico en bacterias comensales y está adaptado para funcionar bajo esa presión antigénica permanente. Estos estímulos ponen en marcha al llamado tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*). El MALT está formado por tejido linfoide difuso (linfocitos intraepiteliales y células mononucleares de la lámina propia) y tejido nodular (placas de Peyer y nódulos linfáticos). El MALT está implicado en el procesamiento de antígenos que interactúan con la mucosa intestinal y en la diseminación de la respuesta inmune y no solo debe distinguir lo propio de lo extraño, sino que también debe diferenciar entre los antígenos de la microbiota normal y los antígenos patógenos.

Las placas de Peyer contienen todas las células necesarias para inducir y regular la respuesta inmune y se encuentran estructuralmente muy organizadas para facilitar su función. Existen áreas formadas por células B (folicúlos de células B) que se encuentran rodeados de células T. Estos centros germinativos contienen células en división y en ellos se encuentran algunas células plasmáticas. El área comprendida entre los folicúlos y el epitelio es rico en células B, células T, macrófagos y células dendríticas, que se encuentran estratégicamente situadas para responder frente a antígenos o bacterias transportadas por células especializadas del epitelio que cubre las placas de Peyer (10).

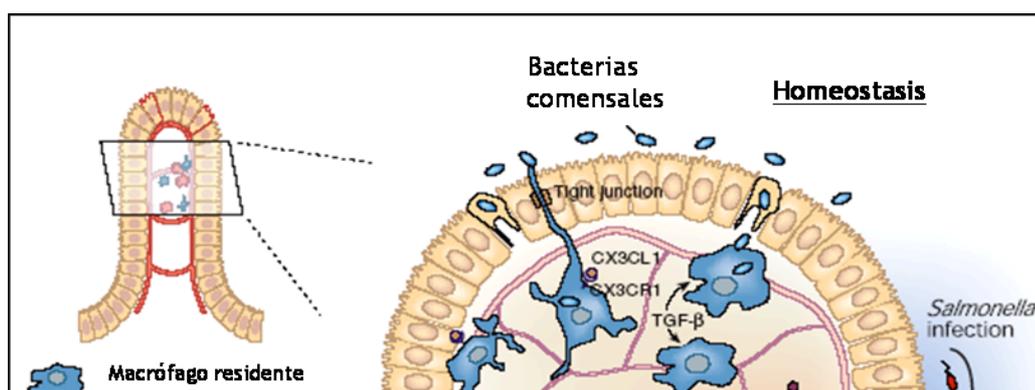
En el MALT también se incluyen los linfocitos intraepiteliales, muy importantes ya que se encuentran muy próximos a los antígenos lumbales, y los macrófagos y células dendríticas de la lámina propia (*Figura 5*).



**Figura 5. Estructura y organización del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT).**

Para que se induzca la respuesta inmune, los antígenos presentes en el lumen intestinal son transportados dentro de las placas de Peyer a través de las células M, localizadas entre los enterocitos del epitelio. Una vez allí, los antígenos son presentados a las células T y B localizadas en los folículos germinativos o en zonas interfoliculares. Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos (APCs) más importantes en la inducción de la respuesta de células T (11). Tras su activación, los linfocitos T y B son drenados por los nodos linfáticos y migran a través del conducto torácico hacia el torrente sanguíneo. Finalmente, tras circular durante varios días, se diferencian en células efectoras y migran hacia la lámina propia.

Ésta es sin embargo una visión muy general ya que el funcionamiento del sistema inmune de la mucosa es bastante más complejo. Las células dendríticas y los macrófagos de la lámina propia juegan también un papel muy importante. Los estudios más recientes muestran que la barrera epitelial es bastante “porosa” y que existe una interrelación constante entre la flora residente y los elementos del sistema inmune intestinal. Por ejemplo, las bacterias interactúan con las prolongaciones que emiten las células dendríticas entre las células epiteliales, o incluso, algunas bacterias consiguen atravesar la mucosa. Sin embargo, la explicación de por qué esas interacciones o esa entrada de bacterias no provoca una inflamación no es bien conocida (Figura 6).



**Figura 6.** En condiciones normales, las bacterias son detectadas pero no hay inflamación. Los macrófagos no liberan citocinas, sino que son fagocíticos. Las células dendríticas (DC) también se comportan como no inflamatorias. Esto mantiene la homeostasis intestinal. Sin embargo, durante la infección, las bacterias invasivas activan las células epiteliales y producen mediadores proinflamatorios que reclutan nuevas células como los neutrófilos, y además hacen que los macrófagos y DCs se diferencian hacia un fenotipo inflamatorio (SII25).

Las criptas poseen también mecanismos de defensa que les permite proteger a las células madre que albergan en su interior y asegurar así la proliferación y regeneración del epitelio. Cuando se activan las rutas proinflamatorias por la presencia de algún patógeno, se desencadena una serie de mecanismos que incluyen la liberación de agentes proinflamatorios, como las defensinas, que “limpian el lumen de las criptas, y agentes quimiotácticos que atraen a los neutrófilos.

## **A5. La tolerancia inmunológica**

Una característica del sistema inmune es la de no reaccionar frente a los componentes propios del individuo, manteniendo, sin embargo, la capacidad de responder frente a cualquier antígeno extraño al mismo. Esta capacidad de reconocimiento y aceptación de los componentes propios del organismo se denomina tolerancia inmunológica. La tolerancia es por tanto la ausencia específica de respuesta del sistema inmune frente a un antígeno, ya sea propio o extraño. La tolerancia se caracteriza por ser un fenómeno de naturaleza *inmunológica*, es *específica* frente a cada antígeno y es un fenómeno *adquirido*. Los principales mecanismos de adquisición de tolerancia son (12):

- **Anergia:** ocurre cuando las células T reconocen un antígeno que está siendo presentado por una APC pero sin las señales coestimuladoras necesarias. Las células T se vuelven entonces incapaces de responder a ese antígeno.

- **Eliminación de células T:** la estimulación repetida de los linfocitos T por antígenos persistentes puede provocar la muerte por apoptosis de las células T activadas. Este fenómeno ocurre cuando un gran número de células T activadas recientemente son reactivadas por antígenos.

- **Tolerancia inducida por linfocitos T supresores:** algunas respuestas inmunitarias son inhibidas por células que producen citocinas y bloquean la activación y las funciones de los linfocitos T efectores. Estas células T reguladoras o supresoras están presentes en la lámina propia del intestino. Se conocen como células Th3 o Tr1 y son capaces de inhibir la activación, diferenciación y proliferación de otras células T mediante la producción de IL10 y/o TGFβ.

- **Ignorancia clonal:** los linfocitos autorreactivos pueden no reconocer o no responder a ciertos antígenos en la periferia, pero las células no mueren ni se vuelven anérgicas.

## A5.1 Tolerancia oral

En el caso del intestino, la ausencia de respuesta frente a la presión antigénica constante que supone la microbiota intestinal así como los antígenos de los alimentos se conoce como *tolerancia oral*. Las células dendríticas y las placas de Peyer son especialmente importante en este proceso (13). La enfermedad inflamatoria intestinal parece estar relacionada con este mecanismo, ya que parece que lo que ocurre es una pérdida de la tolerancia oral a los microorganismos de la flora intestinal.

Existen varios mecanismos que intervienen en la tolerancia intestinal a las bacterias comensales (14):

- Propiedades de la bacteria. El que una bacteria produzca o no una infección depende de que posea factores de virulencia como las adhesinas o invasinas, que le confieran capacidad para colonizar el epitelio. También es importante la capacidad que tengan de escapar de la capa de mucus que recubre el intestino. Las bacterias son secuestradas en esta capa y finalmente son eliminadas mediante los movimientos peristálticos.

- Características de la capa epitelial. Son varios los mecanismos que posee el epitelio para no responder frente a antígenos no patógenos. Algunos receptores TLRs, que reconocen componentes bacterianos, en condiciones normales se expresan muy poco en la superficie epitelial, o bien, se encuentran “escondidos” en la membrana basolateral con lo que no se produce respuesta frente a ellos. Estos procesos se conocen

como tolerancia por ignorancia. Otro mecanismo diferente consiste en la comunicación activa entre bacterias y epitelio. Se ha observado que la flora comensal puede inducir la expresión de PPAR $\gamma$ , que da lugar a la inhibición del NF $\kappa$ B, un factor de transcripción pro-inflamatorio.

- Tolerancia de las células inmunes de la lámina propia. En presencia de bacterias no patógenas, las células dendríticas y los macrófagos no producen citocinas sino que poseen actividad fagocítica. En cambio, cuando hay patógenos, liberan citocinas, como la IL12. El control de la expresión de la IL12 es un elemento esencial en la tolerancia.

## B) LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

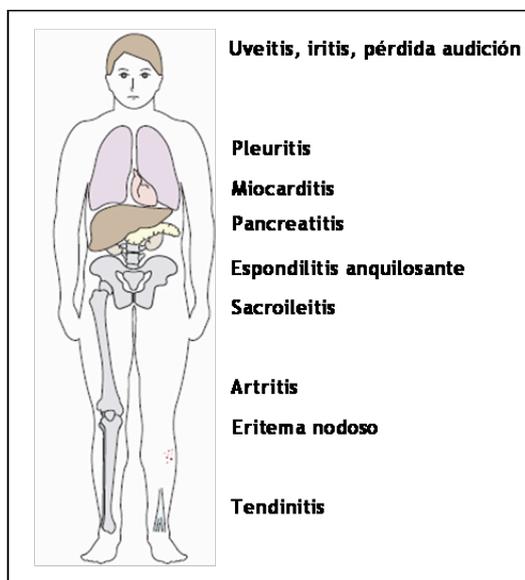
### B1. Aspectos generales

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de enfermedades que cursan con inflamación crónica del tubo digestivo donde se incluyen la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). El curso clínico de estas patologías se caracteriza por periodos de actividad o brotes que se alternan con fases de remisión. La patogénesis es muy compleja y no del todo conocida, aunque se sabe que intervienen tres elementos: susceptibilidad genética, microflora intestinal y daño tisular mediado por una desregulación inmune. Se piensa que lo que ocurre es una pérdida de la tolerancia oral a los microorganismos comensales de la flora intestinal normal, es decir, que microorganismos en principio inofensivos son los que desencadenarían la respuesta inmune descontrolada, en personas con predisposición genética (15).

#### B1.1 Epidemiología y calidad de vida

La incidencia de la EII parece ir en aumento en países desarrollados. En España se estiman unas tasas en torno a 2 casos/año/10<sup>5</sup> habitantes en la EC y de 4 casos/año/10<sup>5</sup> habitantes para la CU, aunque con una importante variabilidad geográfica (16,17). Sin embargo, al ser estudios retrospectivos, es probable que esas tasas sean incluso mayores, y en total, se estiman que existen más de 100.000 casos de EII. Este incremento se asocia a una mejora en las condiciones de vida en los últimos años, lo cual pone de manifiesto que no solo los factores genéticos, sino que los factores ambientales tienen un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. La edad de inicio de la enfermedad suele estar entre los 15 y los 40 años, con un segundo pico entre los 55-75 años y la frecuencia parece ser similar entre hombres y mujeres. La mortalidad asociada a la EII ha disminuido durante los últimos años, gracias a la aparición de nuevos tratamientos. En 1950, la mortalidad de un brote grave en la CU oscilaba entre el 31 y el 61%; en 1960 disminuyó al 5-9% y en la actualidad se asume una mortalidad del 3%.

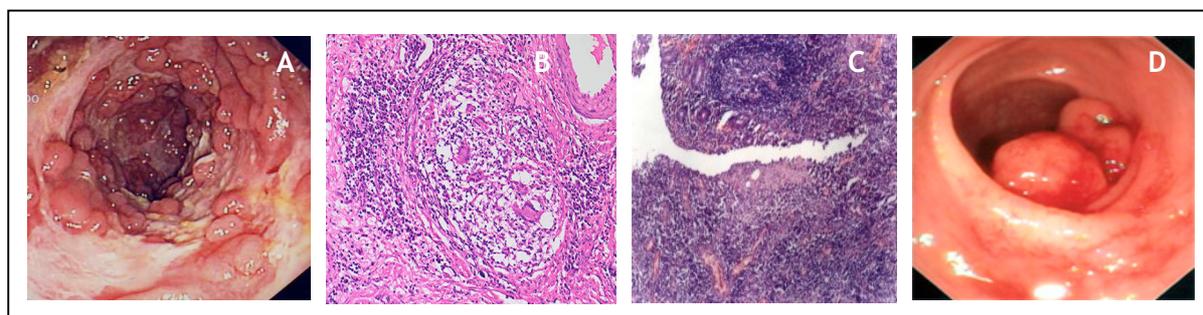
La calidad de vida de estos pacientes se ve gravemente afectada debido a las recaídas, síntomas impredecibles y hospitalizaciones frecuentes. Una de las complicaciones más serias de la EII, sobre todo de la CU es el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, que parece estar relacionado con la extensión y la duración de la enfermedad. La malnutrición es también frecuente debido sobre todo a una ingesta inadecuada, ya que el comer agrava los síntomas de la diarrea y el dolor abdominal. En niños y adolescentes es especialmente importante ya que puede causar alteraciones en el crecimiento. Además, aparte de los síntomas característicos de la EC y CU, alrededor del 25% de los pacientes presentan manifestaciones extraintestinales en diversos órganos, piel, articulaciones, ojos... (Figura 7).



**Figura 7.** Manifestaciones extraintestinales en la EII.

## B1.2 La enfermedad de Crohn

La EC es una enfermedad transmural que puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la cavidad bucal hasta en ano. Se diferencia de la CU principalmente en la distribución de las lesiones y en la presencia de inflamación en todo el espesor de la pared intestinal. Es una enfermedad segmentaria y afecta sobre todo al colon proximal e íleon. Los pacientes presentan dolor abdominal, diarrea, malnutrición y anemia.



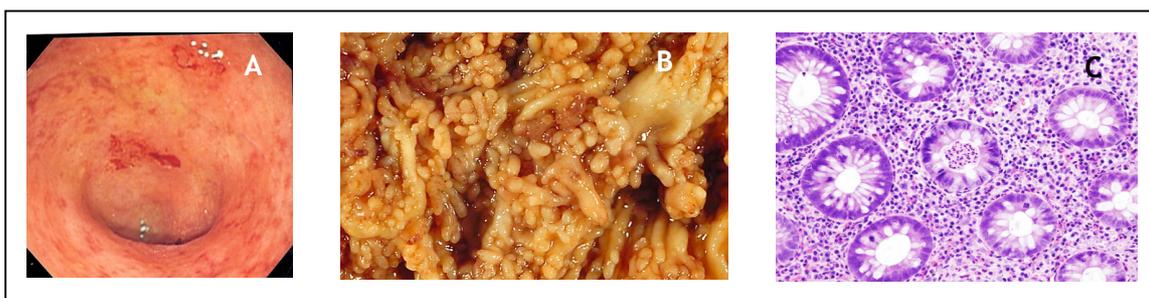
**Figura 8.** A) Aspecto de la mucosa en la EC. B) Granuloma. C) Úlcera de la mucosa. D) Pólipos.

Las lesiones que se producen (*Figura 8*) consisten en erosiones superficiales y úlceras longitudinales y transversales que le dan a la mucosa un aspecto de “empedrado”. Pueden producirse úlceras profundas en forma de fisuras que pueden ocasionar abscesos o fístulas entre segmentos intestinales. Gran parte de los enfermos presentan estenosis que consiste en el estrechamiento de la luz, a menudo circular y el engrosamiento de la pared intestinal. En las estenosis graves el diámetro de la luz rara vez supera los 5 mm. La superficie de la serosa muestra vasos prominentes y dilatados (hiperemia).

La presencia de granulomas en secciones histológicas del intestino es una característica clave de la EC. Los granulomas consisten en acúmulos de macrófagos y otras células inflamatorias. También aparece necrosis epitelial parcheada, microulceraciones mucosas y úlceras en la base de las criptas que conducen a la formación de úlceras en “pico de montaña”. Son frecuentes las lesiones en el sistema nervioso entérico que consisten en hipertrofia e hiperplasia de las fibras nerviosas y alteraciones en los ganglios nerviosos de la submucosa y del plexo mientérico.

### B1.3 La colitis ulcerosa

La CU, a diferencia de la EC, es una enfermedad exclusivamente colónica en la que las lesiones están confinadas a la mucosa. Esto posiblemente esté relacionado con la microbiota intestinal, ya que el colon es la zona del intestino con mayor concentración de bacterias. Su forma aguda se caracteriza por la presencia de moco y sangre y úlceras de distintos tamaños que cuando cicatrizan, a menudo se forman nódulos conocidos como pseudopólipos. En los estadios más avanzados el colon se vuelve fibrótico, estrecho y acortado. Durante los periodos de remisión, la mucosa puede tener un aspecto prácticamente normal. En los casos más graves, la inflamación puede extenderse a la submucosa y en ocasiones puede producirse una perforación (*Figura 9*).



*Figura 9. A) Aspecto granuloso de la mucosa en CU. B) Pseudopólipos. C) Abscesos en las criptas.*

En cuanto a las características microscópicas, destaca el infiltrado celular que se produce, compuesto principalmente de neutrófilos. También aparecen alteraciones en las criptas (acortamiento de las mismas, ramificación y bifurcación o su desaparición), erosiones de la mucosa, engrosamiento de la *muscularis mucosae* y metaplasia de las células de Paneth. Salvo en el ciego, el colon no tiene habitualmente células de Paneth y su presencia es muy indicativa de EII, especialmente de CU.

## **B2. Etiología**

### **B2.1 Factores ambientales**

#### **• “Industrialización”**

La incidencia de la EII sufrió un fuerte incremento durante el siglo XX en países del norte de Europa y EEUU, frente a los países no desarrollados, un hecho que se denominó gradiente Norte-Sur (18). Sin embargo, en los últimos años, en países del sur de Europa, incluyendo España, estas diferencias son cada vez más discretas ya que la incidencia ha aumentado, de forma paralela a la mejora del nivel de vida. Por ello, hoy se habla más bien de un gradiente Este-Oeste, relacionado con el desarrollo tecnológico, un mejor acceso de la población a la medicina de calidad, modificaciones dietéticas, diferente trato de aguas, condiciones higiénicas... La incidencia de EII es mayor en áreas urbanas que en áreas rurales, por lo que algunos investigadores sugieren que empleos que se realizan al aire libre y que implican actividad física podrían proteger frente a la EII.

#### **• Dieta**

Los estudios para intentar relacionar diferentes alimentos o dietas con la enfermedad presentan algunas dificultades. No se pueden establecer relaciones con determinados tipos de dietas (ej. dieta mediterránea) ya que la incidencia es muy baja. Además, normalmente la edad de inicio de la enfermedad no coincide con la edad de diagnóstico, con lo que es difícil relacionarlo con algún alimento. Algunos alimentos o nutrientes que se han relacionado con la aparición o empeoramiento de la enfermedad son los ácidos grasos, proteínas lácteas, azúcares refinados, comida rápida... El papel de la fibra alimentaria en la EII es muy discutido. Algunos estudios han apuntado a que existe un menor consumo de fibra entre los pacientes con EC comparado con un grupo control aunque otros han observado lo contrario. Por ello parece poco probable que la fibra alimentaria juegue un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Lo que sí está bien establecido es que las dietas ricas en fibra son eficaces para mantener la remisión de los pacientes con CU.

#### **• Tabaco**

El consumo de tabaco es el factor de riesgo externo asociado a la EII mejor estudiado. En el año 1982 se publicó por primera vez el posible papel “protector” del tabaco frente a la CU, ya que se observó una proporción significativamente menor de fumadores entre los pacientes de CU (8%) que en el grupo control (44%). Estos datos se han confirmado posteriormente en diferentes regiones geográficas. Paradójicamente, el dejar de fumar incrementa el riesgo de desarrollar CU frente a personas que nunca han fumado. Por otro lado, el tabaco incrementa el riesgo de padecer EC, aumentando la frecuencia por lo menos al doble en relación con los no fumadores, además de empeorar el curso de la enfermedad y el pronóstico.

## • Otros factores

Varios estudios epidemiológicos han asociado el uso de anticonceptivos orales con la EII, aunque el mecanismo por el que incrementan el riesgo no está aclarado.

La alimentación con leche materna confiere inmunidad al bebé durante el desarrollo del sistema inmune intestinal. Algunos estudios han mostrado cierto efecto protector de la alimentación con leche materna frente a la EII (19).

Los trastornos psicológicos como la ansiedad y la depresión también se han relacionado a veces con la enfermedad y se ha sugerido que podrían afectar al sistema inmune. El estrés es un desencadenante de brotes de CU en un 40% de los pacientes (20). Estudios en animales sugieren que podría ser debido a la reducción de mucinas y al incremento de la permeabilidad de la mucosa. Algunos estudios relacionan la actividad del nervio vago en el control de la inflamación (21).

La apendicectomía parece tener un papel protector frente a la CU, ya que el riesgo de CU es menor entre pacientes apendicectomizados. Se desconoce la razón aunque se han sugerido varias explicaciones: puede ser que el apéndice tenga alguna función inmunológica, puede que contenga algún microorganismo que sea el desencadenante de la CU o por otro lado también podría ser que la predisposición genética a padecer CU proteja frente a la apendicitis.

## B2.2 Factores genéticos

### • Estudios familiares

Tras la identificación en el año 2001 del primer gen de susceptibilidad para la EC (22, 23) ha crecido mucho el interés en la identificación de otros genes que predispongan a la enfermedad. La susceptibilidad de un individuo de padecer una enfermedad está determinada en muchos casos por la combinación de factores genéticos y ambientales. La identificación de estos factores de riesgo genéticos es uno de los objetivos más importantes de la medicina moderna ya que conduce a una medicina más individualizada y a la identificación de dianas terapéuticas. Estudios epidemiológicos y familiares han demostrado que la EII es una enfermedad genéticamente muy compleja que no puede explicarse con la alteración en un único gen, sino que se trata de desórdenes poligénicos que siguen una distribución no Mendeliana y donde los factores ambientales son fundamentales ya que la presencia de dichas alteraciones genéticas no garantiza que se desarrolle la enfermedad.

Los estudios de agregación familiar indican una elevada incidencia de familiares con ambas formas de EII. EL riesgo para familiares consanguíneos es 30 veces mayor. Entre el 10-20% de los enfermos tiene antecedentes de EII entre sus familiares (15). Estudios en gemelos monocigotos muestran una concordancia

del 6-17% para la CU y del 37-58% para la EC (18), lo cual indica que los factores ambientales son más importantes en la CU.

En familias con una elevada incidencia de EII se ha observado que en el 75% de los casos, existe concordancia para EC o CU mientras que en el 25% no, es decir, que algunos familiares presentan EC mientras que otros CU. Esto sugiere que existen factores genéticos que son compartidos por ambas enfermedades (18) y que el tipo concreto (EC o CU) que finalmente se manifiesta podría depender de otros factores, como los ambientales, incluyendo por ejemplo, el tipo de microbiota que presente cada individuo.

### • Genes de susceptibilidad

En los últimos años han surgido numerosas revisiones sobre aspectos genéticos de la EII (24-29). Las dos estrategias básicas para la identificación de determinantes genéticos son el clonado posicional y la evaluación de genes candidatos. El clonado posicional se basa en análisis estadísticos tales como el análisis de ligamiento (*linkage*) y estudios de asociación intrafamiliar, mientras que la evaluación de genes candidatos implica el conocimiento previo de la localización cromosómica así como información funcional y de expresión génica. Hasta el momento se han confirmado 7 *loci* involucrados en la predisposición genética de la EII (Figura 10).

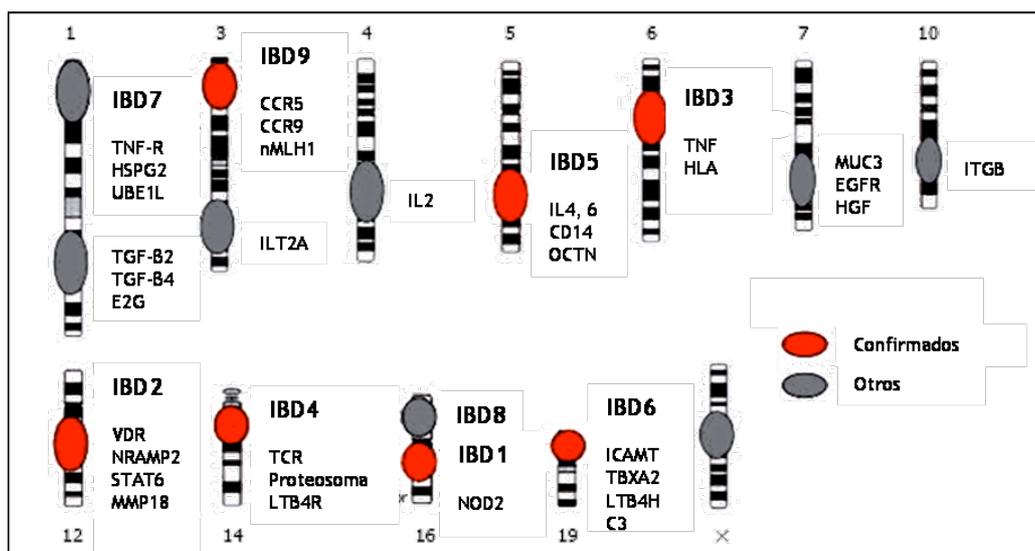


Figura 10. Locus de susceptibilidad identificados en la EII y genes incluidos en dichas regiones.

En el locus IBD-1, situado en el cromosoma 16, se encuentra el gen *CARD15/NOD2*, el primer gen confirmado que confiere susceptibilidad para la EC. Dos estudios simultáneos e independientes (22, 23) identificaron que tres de las más de 60 mutaciones que se han encontrado en dicho gen (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC), se asocian a un mayor riesgo de padecer EC. Entre un 17% y un 27% de los casos

de EC presentan alteraciones en el gen *CARD15/NOD2* aunque se desconoce el mecanismo por el que esas alteraciones predisponen a la enfermedad. Las proteínas de la familia NOD son receptores citoplasmáticos que reconocen componentes bacterianos y tienen un papel importante en la respuesta inmune innata. La activación de esos receptores resulta en la activación del factor del NF- $\kappa$ B y en la producción de citocinas proinflamatorias (30). Las mutaciones en *NOD2* asociadas a EC se localizan en el dominio LRR (repeticiones ricas en leucina) dando lugar a proteínas que no interactúan correctamente con el muramildipéptido bacteriano, que es su ligando.

Posteriormente se identificó un nuevo gen que confiere susceptibilidad a la EII, la *IL23* (interleukina 23), localizada en la región cromosómica 1p31 (31). Estudios previos en ratones habían mostrado que la *IL23* era necesaria para el desarrollo de la colitis. Además, ratones transgénicos que expresan *IL23* desarrollan inflamación sistémica incluyendo el intestino, y este efecto está mediado en parte por una respuesta de tipo Th17. La identificación de este nuevo gen sugiere que el bloqueo de la ruta de señalización de la *IL23* podría ser una nueva estrategia terapéutica en la EII.

Según un estudio realizado con 735 enfermos, el gen *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) también confiere susceptibilidad a la EC (32), aunque no a la CU. La proteína que codifica interviene en la fagocitosis y el procesamiento intracelular de bacterias, lo que apoya la hipótesis actual de que la patogénesis de la EC está relacionada con una alteración de la barrera defensiva que supone la mucosa intestinal para las bacterias y antígenos del lumen.

También se ha identificado alteraciones en varios genes de la ruta de señalización de los receptores TLR (*toll-like receptors*), incluyendo los genes *TLR4*, *TIRAP* y *NFKB1*, que confieren susceptibilidad a la EII, aunque con una influencia bastante modesta en el riesgo a desarrollar la enfermedad (33).

El más reciente de todos los genes identificados es el gen *IRGM* (*immunity-related GTPase family, M*), localizado en el locus 5p13.1, también identificado recientemente (34, 35). Este gen interviene en el control de patógenos intracelulares. Las variantes genéticas en este mismo locus parecen influir también en la expresión del gen *PTGER4*, que codifica el receptor de prostaglandina EP4. Ratones knock-out para este gen presentan un incremento en la susceptibilidad a desarrollar colitis.

Todos estos genes, *NOD2*, *IL23*, *ATG16L1*, *TLR4* y *IRGM*, implican directamente a la respuesta inmune temprana, en concreto, a rutas del sistema inmune innato relacionadas con bacterias intracelulares.

El gen *MDR1* (36) es otro gen candidato para la EII y está relacionado con la detoxificación. Se han identificado algunos polimorfismos aunque son necesarios más estudios para confirmar la implicación de

este gen, al igual que el gen de la citokina *CCL20*, implicada en la quimiotaxis de las células dendríticas que se encuentran en las placas de Peyer.

También se han identificado polimorfismos en los genes *SLC22A4* y *SLC22A5* (más conocidos como *OCTN1* y *OCTN2*), localizados en el locus IBD5 (37). Son proteínas implicadas en el transporte de numerosas moléculas, incluyendo xenobióticos. Las alteraciones identificadas pueden afectar a las propiedades de la proteína o bien, a la expresión del gen.

El gen *DLG5* parece estar implicado en el mantenimiento de la estructura y la polaridad de las células epiteliales. Polimorfismos en este gen también se han asociado a la EC (38).

También se habla hoy día de que con el desarrollo y el incremento en las condiciones sanitarias, genes que antes actuarían como factores protectores y de supervivencia en épocas anteriores, podrían constituir factores de riesgo para desórdenes de hipersensibilidad inmune en un ambiente moderno más higiénico (39).

## B2.3 Alteraciones en el sistema inmune

### • Defectos en el sistema inmune innato

Durante mucho tiempo, el estudio de la patogénesis de la EI se había centrado en el papel que jugaban las células T efectoras, ya que las terapias más eficaces, en concreto para EC, iban dirigidas frente a citocinas de tipo Th1 como el  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  y más recientemente, IL12. Sin embargo, tras la identificación del gen de susceptibilidad *NOD2*, un receptor central en la respuesta inespecífica, el interés ha girado hacia el estudio de una posible alteración del sistema inmune innato como causa de la enfermedad. Además, la reciente implicación de otros genes como *DLG5*, *TLRs*, *OCTN1/2* y *MDR1*, apoyan la idea de una alteración en la respuesta innata y en la función barrera de la mucosa intestinal (40, 41, 27).

La respuesta innata se genera a partir de unos receptores que reconocen estructuras bacterianas muy conservadas, como son el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, ácido lipoteicoico, manano y DNA bacteriano. Estas estructuras se conocen como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) y sus receptores PRRs (*pathogen recognition receptors*), que se expresan en células presentadoras de antígenos y también en células epiteliales.

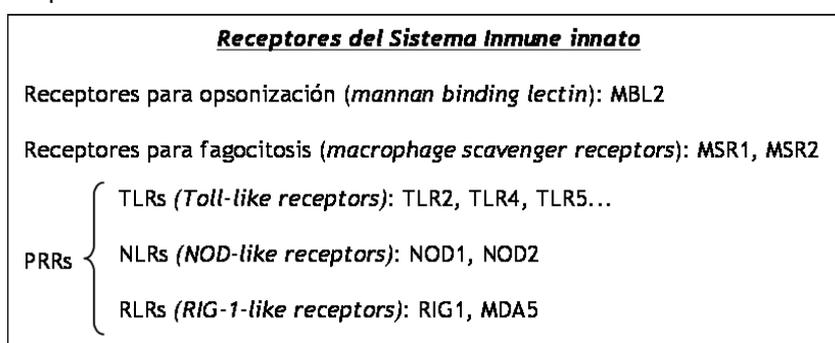


Figura 11. Receptores que intervienen en la respuesta inmune innata.

Cuando se estimulan estos receptores (*Figura 11*) se origina una respuesta efectora inmediata y posteriormente se generan las señales necesarias para generar una respuesta adaptada y específica frente al patógeno.

El sistema inmune de la mucosa es un sistema muy complejo que debe ser capaz de mantener la integridad de la barrera epitelial, rastrear el lumen intestinal en busca de bacterias comensales y patógenas, inducir tolerancia o bien desencadenar una primera línea de defensa frente a un patógeno y si es necesario, iniciar las señales que desencadenen una respuesta específica.

## Receptores tipo Toll

Los TLRs (*Toll-like receptors*) actúan como PRRs en el sistema inmune innato. Proporcionan una respuesta efectora frente a patógenos a la vez que una respuesta de tolerancia frente a la microbiota intestinal. En ausencia de patógenos, los PAMPs de las bacterias intestinales interactúan con los TLRs y dan lugar a la expresión de péptidos antimicrobianos, fortificación de la barrera y proliferación epitelial. Es decir, que en condiciones normales, se mantiene un estado de “inflamación controlada”. El mecanismo por el que se distinguen las bacterias comensales de las patógenas no se conoce bien ya que los PAMPs son estructuras que se encuentran en ambos. Se han propuesto varios mecanismos por los que los TLRs protegen al organismo en ausencia de patógenos que incluyen el nivel de expresión de los TLRs, tipos celulares que los expresan, localización celular de los TLRs e inhibidores de la cascada de señalización (27).

La expresión de TLR2 y TLR4 es muy baja en el epitelio del colon, por lo que estas células responden muy poco frente al LPS. Así, una exposición prolongada y continua al LPS resultaría en tolerancia. Por otro lado, estos receptores también se expresan muy poco en los macrófagos de la lámina propia en un intestino sano y poseen actividad fagocítica y bactericida aunque no producen citocinas, manteniendo así la homeostasis frente a la flora comensal. En la EC se ha observado un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en los macrófagos de la lámina propia, lo que podría alterar este equilibrio. Las células de Paneth también expresan TLRs donde están implicados en la liberación de defensinas. Otro mecanismo consiste en la polarización del TLR5, ya que se expresa en la cara basolateral de las células epiteliales. En ausencia de bacterias invasivas no se produce respuesta pero cuando alcanzan la membrana basolateral, son reconocidas por el TLR5 y se liberan citocinas que inician así la respuesta inflamatoria. Finalmente, existen inhibidores de la ruta de señalización por TLRs (TOLLIP, SIGIRR, PPAR $\gamma$ ) que controlan la inflamación en un intestino sano.

Según todo esto, la comunicación que ejercen las bacterias comensales con el hospedador a través de la señalización con los TLRs regula el funcionamiento normal del intestino. Se ha observado que en

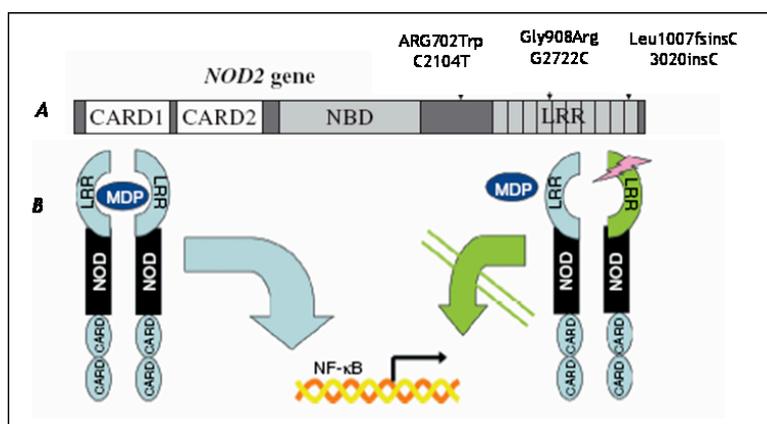
ausencia de un correcto funcionamiento de los TLRs, disminuye la expresión de quimioquinas, el reclutamiento de neutrófilos y favorece la translocación de bacterias a los nodos linfáticos mesentéricos. Estos datos muestran la importancia de los TLRs en el mantenimiento de la barrera epitelial normal y que un cierto nivel de activación de los TLRs en el intestino es protector para el hospedador.

En la EII, la alteración de estos receptores puede deberse a un polimorfismo (se han identificado algunos), puede estar afectada la cascada de señalización o puede deberse a un incremento en la expresión de TLRs en enterocitos o en macrófagos de la lámina propia.

### Proteínas NOD

Las proteínas NOD constituyen otro grupo de PRRs del sistema inmune innato. Se han identificado más de 20 proteínas NOD en mamíferos, entre ellas, NOD1 y NOD2. Son receptores citoplasmáticos, fundamentales por tanto para la detección de patógenos intracelulares y tienen funciones pro-inflamatorias, activando la ruta del NF $\kappa$ B y pro-apoptóticas, a través de la activación de la caspasa 1. NOD1 se expresa en las células epiteliales del intestino y es necesario para el reconocimiento de bacterias invasivas Gram-negativas. Algunos estudios sugieren la implicación de este gen en la predisposición a la EII.

La alteración en el gen *NOD2* en la EC, previamente descrita en el apartado anterior (2.2 Factores genéticos) ha sido confirmada en diferentes poblaciones, excepto en la asiática. La proteína se expresa en monocitos y macrófagos principalmente y también en células T y B, células dendríticas, células de Paneth y células epiteliales intestinales. Su ligando es el muramildipéptido y regula la respuesta frente a patógenos así como la liberación de defensinas en las células de Paneth. Conforme a esto, se ha sugerido que la disminución en la expresión de defensina- $\alpha$  en EC (originada por el defecto en *NOD2*), podría ser un defecto primario en la patogénesis de la enfermedad y no un hecho secundario al proceso inflamatorio (42). Se desconoce, sin embargo, por qué esas mutaciones predisponen a la enfermedad. Se ha observado que la mutación Leu1007fsinsC presenta una expresión basal de NF- $\kappa$ B normal pero una activación reducida cuando se estimula con su ligando.



**Figura 12.** A) Mutaciones identificadas en el gen *NOD2*, que confieren susceptibilidad a la EC. B) Efecto de la alteración del gen *NOD2* sobre la activación del NF $\kappa$ B.

En las otras dos mutaciones (Arg702Trp y Gly908Arg), tanto la expresión basal como la derivada de la unión al ligando está reducida (27). Esto parece en principio contradictorio puesto que si la activación del NFκB es menor, cabría esperar una disminución de la inflamación. Al igual que ocurre con los TLR, la proteína NOD2 podría estar implicada en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y un defecto en ella podría originar una pérdida de la función barrera.

### Células dendríticas

El reconocimiento y procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígenos se encuentra alterado en pacientes con EI (150). Estudios *in vitro* y en animales sugieren que las células dendríticas no reconocen correctamente las bacterias comensales e inducen una respuesta inmune proinflamatoria de tipo Th1 o Th17, que normalmente son dirigidas frente a microorganismos patógenos.

### • Defectos en el sistema inmune adquirido

#### Células T CD4<sup>+</sup>

Numerosos estudios confirman que en la EC se produce una respuesta de tipo Th1, con incremento en la producción de IFNγ y TNFα, así como de las interleukinas IL12 y IL18 y el factor de transcripción T-bet, que inducen la polarización hacia Th1. El TNFα también está incrementado en UC aunque menos que en EC.

La respuesta de células T que aparece en la CU no es de tipo Th1, sino que se considera una respuesta Th2 atípica, ya que aunque está incrementada la expresión de IL5 e IL10, los niveles de IL4 parecen reducidos. La presencia de autoanticuerpos antitropomiosina o antimucina también sugieren una respuesta de tipo Th2 (43).

Además de la polarización hacia un determinado tipo de respuesta, existe otra alteración en estas células. Se ha observado que el incremento en el número de células T CD4<sup>+</sup> en la mucosa de los pacientes se debe a que son resistentes a la apoptosis (44). Cuando se resuelve un proceso inflamatorio, las células normalmente son eliminadas por apoptosis. En la EC estas células no son eliminadas, lo cual contribuye a la perpetuación de la inflamación y a que adquiera un carácter crónico.

## Células B

En algunos modelos animales se ha observado la implicación de los linfocitos B en la patogénesis de la colitis, aunque con funciones diferentes. En el modelo TCR $\alpha$ -/-, las células B parecen proteger del desarrollo de la inflamación, mientras que en ratones inmunodeficientes (SCID), la transferencia de células B junto con células T CD4<sup>+</sup> produce una colitis más severa que si se transfieren únicamente células T CD4<sup>+</sup> (27). Además, la presencia de anticuerpos como pANCA en CU o ASCA en EC, implican a las células B en la enfermedad, aunque no necesariamente en la patogénesis.

## Células T-reguladoras

Las células T reguladoras son linfocitos T que producen IL10 o TGF $\beta$  y hacen que disminuya la respuesta de las células T efectoras. Varios estudios han mostrado que en la EII hay defectos en la generación de éstas células reguladoras de la respuesta inmune y se están estudiando como potencial terapéutico para la EII.

## Células presentadoras de antígenos

La lámina propia es rica en células presentadoras de antígenos (APCs) como los macrófagos y células dendríticas. Estas células juegan un papel importante en la EC ya que producen IL12, y también IL18 junto con las células epiteliales, lo cual polariza la respuesta inmune hacia linfocitos Th1. Además, los macrófagos de la lámina propia de pacientes de EC expresan TL1A, un ligando que actúa como estimulador de la secreción de IFN $\gamma$  (27). Las células dendríticas son fundamentales para rastrear el contenido del lumen intestinal, ya que emiten proyecciones entre las células epiteliales para alcanzar así la superficie del epitelio (45), y juegan un papel importante en la generación de tolerancia. Se ha sugerido que alteraciones en estas células podrían ser importantes en el desarrollo de la enfermedad.

## Células “Natural Killer”

El modelo de colitis inducida por oxalazona se caracteriza por una respuesta inmune de tipo Th2 y presenta características parecidas a la CU humana. Se ha observado que en este modelo, la colitis está mediada por células T “*natural killer*” (NK) y que éstas producen grandes cantidades de IL13 (46), que parece ser muy importante en la colitis ya que la administración de IL13Ra2-Fc previene la inflamación intestinal. Recientemente también se ha observado que en la CU se producen grandes cantidades de IL13,

comparado con EC y controles sanos, y que esta interleukina incrementa la expresión de claudina 2, aumenta el número de células apoptóticas y disminuye la restitución epitelial (47).

### • Defectos en la barrera epitelial

Los 400m<sup>2</sup> de superficie que componen la monocapa de células epiteliales del intestino suponen la primera barrera que impide el paso de antígenos dentro de la mucosa intestinal. En esta barrera física son fundamentales las proteínas que mantienen unidas las células (*tight junctions*), que se encargan de mantener la correcta permeabilidad de la mucosa, permitiendo la entrada selectiva de nutrientes y fluidos. Por otro lado, la protección que ejerce la mucosa no es solo física, sino que contiene diversas células inmunes (macrófagos, células M, células dendríticas, linfocitos...) y es capaz de producir factores protectores como las mucinas y defensinas. Además, la superficie apical de la célula epitelial está recubierta por IgA y el glicocalix.

Los defectos que se han observado en la barrera intestinal en enfermos de EII son de tres tipos: incremento de la permeabilidad, alteración de la integridad epitelial y disminución de los factores protectores.

Existe un modelo animal que consiste en ratones que carecen de caderina N, una proteína que interacciona con caderina E y que está implicada en el mantenimiento de la polarización celular. Estos animales desarrollan una colitis espontánea. En la enfermedad humana se ha observado una disminución en la caderina E, así como alteraciones en otras proteínas implicadas como catenina  $\alpha$  y las claudinas 2, 5 y 8 (48, 49). En este incremento de la permeabilidad podrían estar implicados varios mecanismos, como el incremento del TNF $\alpha$  o la IL13. Algunos estudios sugieren que la alteración de la permeabilidad es más probable que sea una consecuencia, más que la causa de la inflamación (50).

La integridad epitelial parece estar dañada debido a la alteración en genes como *OCTN1/2* y *DLG5*, ya comentados en el apartado 2.2. Además, también se ha observado un incremento en la apoptosis de las células epiteliales en enfermos de EC, lo que contribuye notablemente al deterioro de la barrera mucosa y a la pérdida de su función (151).

La producción de mucus también está alterada en la EII, aunque de manera diferente: en la CU está disminuida mientras que en la EC es mayor. Estas alteraciones podrían afectar a la entrada de bacterias luminales a través del epitelio. De hecho, se ha observado un incremento de bacterias adherentes en ambas enfermedades, lo que podría deberse, bien a cambios en la composición del mucus o a cambios en las propiedades de las bacterias que incrementan su capacidad de adherencia. Otros factores protectores que están alterados en la EII son las defensinas. Aunque las células de Paneth, que son las que las producen, no se encuentran generalmente en el colon, en la EII se ha observado metaplasia de estas células y el incremento de las defensinas B-2 y B-3 en enfermos de CU (51).

## B2.4 Patógenos

Hasta el momento no se ha conseguido asociar ningún microorganismo concreto con el desarrollo de la EII. Algunos investigadores han identificado algunos patógenos como *Micobacterium paratuberculosis*, *M. paramyxovirus*, *Listeria monocitogenes* y *Helicobacter hepaticus*, aunque la implicación de éstas en la enfermedad no está demostrada. Otros estudios sugieren una relación entre el virus del sarampión y la EC (151). Es posible que algunos de estos agentes infecciosos actúen como cofactores que afectan de algún modo al sistema inmune disparando así la enfermedad. También sería posible que estuviesen implicados microorganismos que hasta el momento no son cultivables y por tanto no se habrían podido aislar aunque estuviesen presentes en dichos enfermos.

## B3. Patología de la inflamación intestinal

### • Inflamación aguda

La respuesta inflamatoria consiste en una reacción del tejido conectivo vascularizado en respuesta a una agresión, con el objetivo de proteger y restaurar los tejidos lesionados. La inflamación aguda es de duración relativamente corta, se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos. Los cambios que se producen tras la agresión tisular comienzan con la vasodilatación arteriolar, que da lugar al incremento del flujo sanguíneo (hiperemia). Esto hace que llegue más sangre a los capilares, por lo que la presión aumenta y en consecuencia, se produce la salida de líquido y proteínas de los vasos sanguíneos, originando el edema. En estos procesos intervienen derivados del ácido araquidónico, como las prostaglandinas, que producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, o los leucotrienos, que poseen actividad quimiotáctica. También intervienen proteínas del complemento y otros mediadores como el óxido nítrico. Estos cambios en el endotelio vascular junto con los agentes quimiotácticos permiten el reclutamiento de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia el lugar de la lesión. La expresión de moléculas de adhesión es aquí muy importante ya que permite que esas células que van a proteger del daño, salgan de los vasos sanguíneos y se infiltren en el tejido inflamado. Una vez allí, se produce la degranulación y liberan enzimas y especies reactivas de oxígeno, dirigidas a destruir al patógeno, y también citocinas como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 o IL8, que reclutan y activan otras células como los macrófagos.

El daño tisular que se produce en la inflamación es debido al exceso de mediadores (NO -óxido nítrico-, radicales libres, prostaglandinas, leucotrienos, proteasas, histamina...) que se liberan para combatir al patógeno, que a veces es demasiado potente e incluso daña los tejidos propios. El daño tisular que se produce en la EII está causado en parte por las metaloproteasas (MMPs) liberadas por neutrófilos y macrófagos. En diversos modelos animales se ha observado el incremento de muchas de ellas, como MMP3, 7, 9, 10 y 13, y en la enfermedad humana se ha descrito el incremento de la MMP3 (153). Los radicales

libres producen también un daño importante. Como consecuencia de la inflamación, también se produce el crecimiento de fibroblastos y la secreción de colágeno, que conduce a la formación de fibrosis.

Cuando la inflamación no se resuelve, sino que continúa durante semanas o meses, se considera entonces inflamación crónica, que es lo que ocurre en la EII.

### • Respuesta Th1/Th2.

Tras la respuesta inicial inespecífica que ocurre en la inflamación aguda, se activa la respuesta inmune adquirida, donde intervienen principalmente las células T.

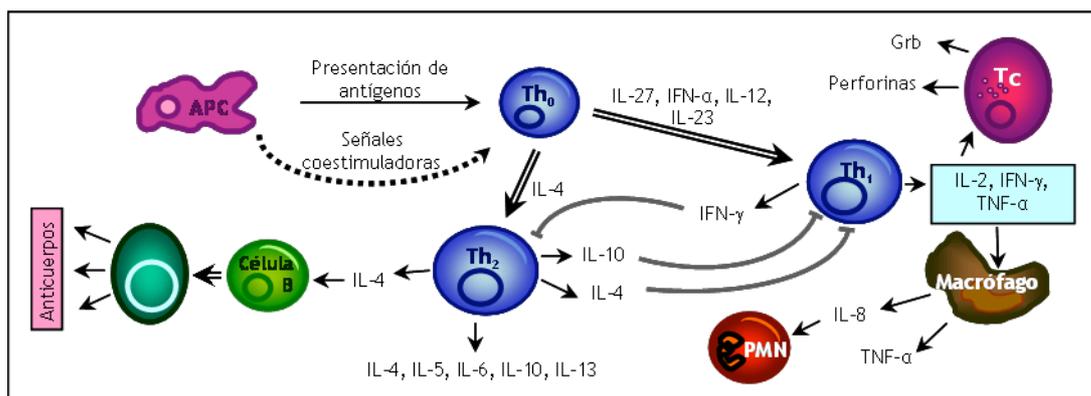


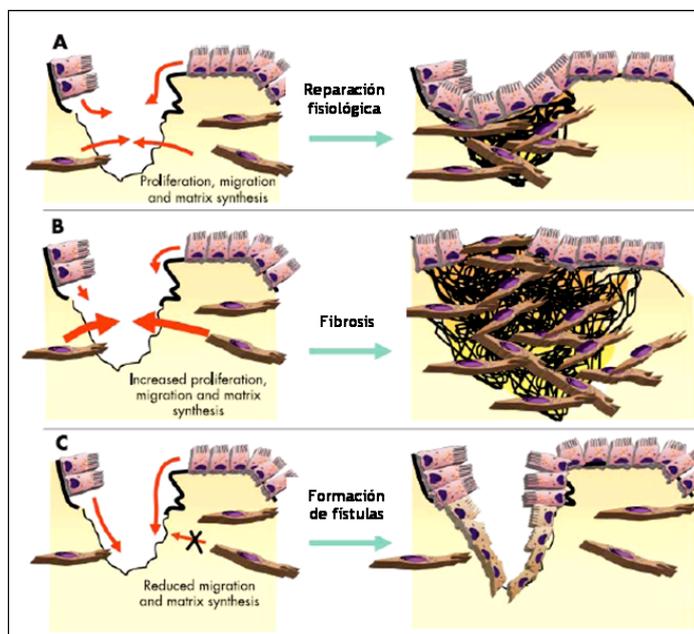
Figura 13. Esquema de las respuestas Th1 y Th2.

Las APCs presentan los antígenos a los linfocitos Th0 (preinmunes o vírgenes) y en función de las señales coestimuladoras, se produce una respuesta inmune celular (Th1), implicada en la respuesta a patógenos intracelulares, o humoral (Th2), que interviene en respuestas de tipo alérgicas (Figura 13). Las IL12 e IL18 activan la respuesta Th1 y se produce un incremento de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL2, que activan las células T citotóxicas y las células NK. La respuesta Th2 se activa por la IL4 y desencadena la producción de citocinas como IL5, IL10 o IL13. La EC se caracteriza por un patrón de citocinas Th1 ya que están incrementadas la IL12, IL18, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . La CU es algo más compleja, ya que se ha observado el aumento de algunas citocinas, como IL5 aunque no parece que las células B jueguen un papel importante.

Recientemente, en una extensa revisión del paradigma Th1/Th2, se ha descrito un nuevo tipo de respuesta para explicar el daño tisular, que consiste en la respuesta Th17, que se activa por la IL23 (53). Diversos estudios han asociado la IL17 con enfermedades humanas como la dermatitis de contacto o la artritis reumatoide. Además, la IL23 y la ruta Th17 han sido recientemente asociadas con la susceptibilidad a la EII (31).

## • Reparación del daño tisular

El proceso inflamatorio crónico conduce a la destrucción de la barrera epitelial y a la formación de úlceras. La resolución de la inflamación está asociada a procesos de reparación que facilitan el remodelado tisular con el fin de restaurar la arquitectura intestinal normal. Los procesos de reparación en la CU son generalmente efectivos en restaurar la estructura de la mucosa.



**Figura 14.** Procesos de reparación epitelial, fibrosis y formación de fistulas.

Sin embargo, en la EC es frecuente la aparición de fibrosis debido al exceso de depósito de matriz extracelular. En la reparación intervienen los procesos de angiogénesis, migración y proliferación de fibroblastos, depósito de matriz extracelular y remodelación tisular.

La reparación del daño, a pesar de su importancia, es un proceso poco estudiado en la EII. Cuando la reparación es insuficiente se forman abscesos y fístulas, mientras que cuando es excesivo, da lugar a la fibrosis (Figura 14), (54). En estos procesos intervienen varios factores de crecimiento, entre ellos, el EGF, FGF, TGF $\beta$ , VEGF, familia IGF, HGF o PDGF. Algunos de ellos se están probando como potenciales terapias para la EII (30), con el objetivo de incrementar los mecanismos de reparación y mejorar la regeneración epitelial.

## **B4. Diagnóstico de la EII**

Actualmente, el diagnóstico de la EII se basa en datos clínicos, endoscópicos, histopatológicos y radiológicos. Son necesarios, sin embargo, métodos menos invasivos, más baratos y marcadores más precisos que permitan un diagnóstico rápido y acertado de la enfermedad. Uno de los problemas que presenta el diagnóstico de la EII es el retraso en el diagnóstico, que a veces puede tardar hasta un año, cuando los síntomas no son muy claros. Otro problema es que en un pequeño porcentaje de los casos en que la inflamación está en el colon, resulta imposible precisar si se trata de EC o CU, lo cual es fundamental ya que el tipo de tratamiento, el pronóstico, la necesidad de cirugía o el riesgo a desarrollar cáncer de colon, es diferente en ambas enfermedades. La investigación en nuevos métodos de diagnóstico también se centran en buscar marcadores que permitan predecir las recaídas, monitorizar la actividad de la enfermedad, así como marcadores de la respuesta terapéutica que permitan evaluar el efecto del tratamiento que esté recibiendo el paciente. Dentro de la EC y de la CU parece haber diferentes subclases de pacientes, es decir que son enfermedades heterogéneas, lo cual explicaría la diversidad de los síntomas y el por qué unos pacientes responden a un tratamiento y otros no. Por ello, otro de los grandes objetivos que se pretenden con los nuevos métodos de diagnóstico es el poder definir subpoblaciones que permitan un tratamiento más individualizado.

Entre los métodos más recientes se incluyen algunos marcadores serológicos y técnicas de ultrasonidos. Entre los marcadores serológicos destacan los anticuerpos pANCA y ASCA. El primero de ellos (auto-anticuerpos frente a citoplasma de neutrófilos) está presente en el 57% de los enfermos de CU (55). Estos anticuerpos son producidos por las células B de la mucosa intestinal y presentan reacción cruzada con la proteína OmpC, presente en la pared de *Escherichia coli*, lo que sugiere una respuesta inmune anormal frente a la microbiota intestinal. Los anticuerpos ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae*) se encuentran en el 55% de los enfermos de EC. Sin embargo, estos marcadores no son totalmente específicos ya que pANCA está presente en un 13% de pacientes de EC y ASCA, en el 5% de pacientes de CU y sujetos sanos. Estos porcentajes varían según el estudio y sería necesario validar estos marcadores en diferentes poblaciones para utilizarlos como herramienta de diagnóstico no invasiva.

Otros marcadores (56) que se han estudiado incluyen la lactoferrina fecal, que parece estar relacionada con la diarrea crónica, y anticuerpos frente antígenos pancreáticos, presentes en el 31% de EC y el 4% de CU.

Las evaluaciones endoscópicas resultan imprescindibles para clasificar, localizar y delimitar la extensión y gravedad de la inflamación, lo cual sería imposible conocer con marcadores serológicos. Las técnicas de ultrasonidos son técnicas no invasivas que permiten obtener dicha información. Se han realizado estudios para evaluar la utilidad de esta técnica que concluyen en que son altamente predictivos

de un desorden inflamatorio intestinal, permite localizar la enfermedad y detectar abscesos y fístulas, aunque no resulta útil para evaluar la actividad de la enfermedad.

## **B5. Tratamiento de la EII**

La EC y la CU son enfermedades crónicas para las que no existe actualmente ningún tratamiento curativo. A medida que se avanza en el conocimiento de la patogénesis de la EII, van surgiendo nuevas estrategias de tratamiento, como es el caso de los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, el mayor problema que presentan, incluso las terapias más recientes, es que la eficacia está limitada solo a algunos pacientes. El avance en aspectos genéticos y genómicos llevado a cabo en los últimos años ha permitido identificar nuevas rutas y dianas específicas con interés terapéutico en la EII, como por ejemplo genes implicados en apoptosis, migración leucocitaria o en la reparación epitelial (30).

### **B5.1 Tratamiento médico general**

La terapia de elección en la CU (57, 58), tanto para la inducción como para el mantenimiento de la remisión, son los aminosalicilatos, entre ellos la mesalazina. Estos fármacos además, parecen ser útiles como quimiopreventivos ya que se ha observado que producen una disminución del 80% en el riesgo de padecer cáncer colorrectal. En casos más graves o cuando no se observa respuesta a los aminosalicilatos, se emplean esteroides, aunque no todos los pacientes responden a ellos, además de los posibles efectos secundarios que pueden presentarse. Cerca de un 30% de los pacientes presentan resistencia a los esteroides, y en esos casos se recurre a la colectomía o a la administración de ciclosporina, un inmunosupresor con eficacia sobre todo a corto plazo aunque puede presentar efectos adversos, como hipertensión, insuficiencia renal o infecciones oportunistas. En la CU también pueden emplearse inmunomoduladores como la azatioprina (AZA) y 6-mercaptopurina (6-MP), aunque su eficacia está relacionada con la actividad del enzima tiopurina-metiltransferasa, que la metaboliza. El tacrolimus es otro inmunosupresor más reciente que ha mostrado eficacia en la CU y presenta menos efectos adversos que la ciclosporina.

Para el tratamiento de la EC (59), en casos leves o moderados, se emplean aminosalicilatos, como la sulfasalazina, o glucocorticoides tópicos, como la budesonida. En pacientes que no responden a estos fármacos se emplean esteroides por vía oral o en brotes muy graves, por vía sistémica. En pacientes refractarios o que han desarrollado dependencia a los esteroides se emplean inmunomoduladores, como la AZA, 6-MP, 6-tioguanina o tacrolimus. El metotrexato también ha mostrado eficacia y seguridad para inducir la remisión. En casos graves que no responden a otros tratamientos, se emplea el infliximab, un anticuerpo monoclonal con gran afinidad por el TNF $\alpha$  humano. La administración del mismo induce una respuesta terapéutica en aproximadamente dos tercios de pacientes refractarios a otros tratamientos y la

remisión completa en un tercio. En la CU se ha empleado a veces el infliximab, aunque la utilidad en este caso no está bien establecida.

## B5.2 Probióticos y prebióticos

Los tratamientos probióticos consisten en la administración microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que confieren un beneficio en la salud del hospedador. Puesto que está bien establecida la implicación de las bacterias intestinales en la patogénesis de la EII, el interés se está centrando en manipular la composición de la flora intestinal con el uso de probióticos. Los posibles mecanismos de acción de éstos incluyen la producción de factores antimicrobianos, interacciones competitivas con patógenos, modulación del sistema inmune o el reestablecimiento de la homeostasis bacteriana. Los tratamientos probióticos parecen ser prometedores en la CU. Hay dos terapias que han mostrado eficacia: *E. coli* Nissle 1917 y la mezcla VSL#3, compuesta por cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. También se están desarrollando microorganismos modificados genéticamente para que adquieran nuevas propiedades. Por ejemplo, se han desarrollado cepas de *L. lactis* capaz de producir IL10 y otras que producen TFFs (*trefoil factors*), así como cepas de *L. farciminis* que producen óxido nítrico (60).

Por otra parte, los prebióticos son componentes no digeribles de los alimentos que benefician al hospedador porque estimulan selectivamente el crecimiento o la actividad de una o varias especies bacterianas existentes en el colon y pueden alterar la composición cuantitativa de la microflora. Algunos prebióticos son la fibra de la dieta y determinados oligosacáridos como la inulina, oligofructosa o lactulosa. El mecanismo de acción parece estar relacionado con el incremento de los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), nutrientes importantes para el intestino e inductores de un ambiente ácido. El butirato es el SCFA más importante y se está ensayando la administración de butirato para el tratamiento de la EII. Además, las semillas de plantago ovata, al ser fermentadas es el colon producen butirato y han mostrado eficacia en el mantenimiento de la remisión de la CU (154).

Recientemente se ha propuesto otro tipo de tratamiento, denominado terapia simbiótica, que consiste en administrar simultáneamente probióticos y prebióticos. Concretamente se analizó el efecto de la administración de *Bifidobacterium longum* junto con fructooligosacáridos. Observaron una mejora en las lesiones y la disminución del TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  (60, 61).

## B5.3 Nuevas estrategias terapéuticas

Algunas de las terapias que se han ensayado en los últimos años (55) incluyen la nicotina, que consigue beneficio en el 75% de los ex-fumadores, aunque presenta efectos secundarios frecuentes como la taquicardia, náuseas e hipertensión. Otros investigadores observaron una mejora en la enfermedad con la administración de heparina, aunque estudios posteriores parecen concluir en que la heparina no es útil en

la CU. El IFN $\beta$ -1A parece ser un tratamiento prometedor ya que se ha visto que inhibe el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  y aumenta la IL10. El natalizumab es un anticuerpo monoclonal frente a la integrina  $\alpha$ 4 y ha mostrado eficacia en la EC y CU. Este fármaco actúa sobre el tráfico leucocitario, al igual que el MLN-02, otro anticuerpo frente a la integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, y parece ser más eficaz en la EC. El visilizumab parece ser una alternativa menos tóxica a la ciclosporina, y los resultados preliminares parecen ser prometedores. Consiste en un anticuerpo que induce apoptosis en las células T CD3. La resistencia al tratamiento con esteroides parece estar relacionada con la IL2, por lo que el bloqueo de esta citokina podría mejorar la respuesta a este tratamiento. El basiliximab es un anticuerpo frente a la IL2 y parece mejorar la respuesta de los pacientes al tratamiento con esteroides.

La aféresis es una técnica que consiste en eliminar células u otros componentes de la circulación sanguínea. Para la EII se emplean dos dispositivos, el Adacolumn, que elimina granulocitos y monocitos/macrófagos y Cellsorba, que elimina leucocitos de manera no selectiva. La leucocitoaféresis, además de eliminar células, también se ha observado que reduce citokinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL8 y otras moléculas como LECAM-1, selectina-L y CXCR3.

## C) LOS MODELOS ANIMALES DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

### C1. Aspectos generales

Los mecanismos patológicos que desencadenan la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son aún desconocidos y para su estudio se recurre a diversos modelos animales de experimentación. Los modelos existentes son muy diversos y cada uno presenta ventajas y desventajas. Un modelo ideal de EI debe ser reproducible, fácil de inducir, debe emplear especies animales asequibles y fáciles de mantener, el curso de la inflamación debe ser predecible y la enfermedad generada debe asemejarse al curso clínico, respuesta terapéutica y a la respuesta inflamatoria de la EI humana (62). Ningún modelo, sin embargo, cumple totalmente estos requisitos. La mayor limitación que presentan es que ninguno cursa con etapas agudas alternadas con periodos de remisión, y en muy pocos modelos se pueden conseguir características crónicas. Ninguno de los modelos presenta tampoco las manifestaciones extraintestinales que sí aparecen en pacientes humanos (63).

A pesar de que estos modelos no representan totalmente la complejidad de la enfermedad humana y no pueden reemplazar los estudios en pacientes, constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio de muchos aspectos importantes de la enfermedad. Según el método de obtención, los modelos se pueden clasificar en: modelos espontáneos, modelos de inducción química, animales manipulados genéticamente y modelos de transferencia. La tabla 1 recoge los modelos animales más utilizados (64).

Tabla 1. Clasificación de los modelos animales de inflamación intestinal

Modelo	Lugar afectado	Alteración	Fenotipo	
<b>1. Modelos de inducción química</b>				
Enema	Ácido acético	Colon	Exógena	CU
	Oxalazona	Colon	Exógena	CU
	Formalin immune-complex	Colon	Exógena	CU
	TNBS	Colon	Exógena	EC
Oral	Indometacina	Colon	Exógena	CU
	Carragenano	Colon	Exógena	CU
	DSS	Colon	Barrera epitelial	CU
Subcutáneo	Ciclosporina A	Colon	Exógena	CU
Intracolónico	Peptidoglicano-polisacárico	Colon	Exógena	CU
<b>2. Modelos modificados genéticamente</b>				
Función de citocinas	IL2 <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	IL2R $\alpha$ <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	IL10 <sup>-/-</sup>	Intestino delgado, colon	Inmunodesregulación	EC/CU
	TGF $\beta$ <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	CRFB4 <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	TNF $\Delta$ ARE <sup>-/-</sup>	Intestino delgado	Inmunodesregulación	CU
	Stat4 transgénico	Colon	Inmunodesregulación	CU
	IL7 transgénico	Colon	Inmunodesregulación	CU

Función de células T	Gai2 <sup>-/-</sup>	Colon	Transducción señales	CU
	TCRα <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	TCRβ <sup>-/-</sup>	Colon	Inmunodesregulación	CU
	MHC Class II <sup>-/-</sup>	Colon	Presentación antígenos	CU
Función barrera epitelial	HLAB27 transgénico	Intestino delgado, colon	Presentación antígenos	CU
	mdr1a <sup>-/-</sup>	Colon	Barrera epitelial	EC
	N-cadherina dominante negativo	Intestino delgado	Barrera epitelial	CU
	Tff <sup>-/-</sup>			CU
<b>3. Modelos de transferencia</b>				
	CD4+CD45RB <sup>hi</sup> en Scid o Rag2 <sup>-/-</sup>	Colon	Regulación células T	EC/CU
	Médula espinal en Tge26	Colon	Regulación células T y NK	CU
<b>4. Modelos espontáneos</b>				
	Tití de cabeza de algodón	Colon	Desconocido	CU
	C3HeJBir	Colon	Desconocido	CU
	SAMP/Yit	Intestino delgado	Desconocido	EC

### • Tipos de modelos

Cada modelo permite estudiar diferentes aspectos sobre la patogénesis de la enfermedad (61-63):

- En los modelos espontáneos, la colitis se desarrolla sin ninguna manipulación externa y son los que mejor reúnen los requisitos de un modelo “ideal”. Son la mejor alternativa para estudiar los factores genéticos que confieren susceptibilidad a la inflamación intestinal.

- Los modelos de inducción química consisten en exponer a los animales a un agente exógeno, que generalmente induce una respuesta inmune o altera la barrera mucosa. Permiten relacionar determinados tipos de respuesta inmune con reacciones histopatológicas concretas y conocer así los mecanismos básicos de la patogénesis de la enfermedad. Estos modelos son muy empleados para estudiar nuevos fármacos y terapias potenciales en la EII. La mayor limitación de los modelos de inducción química es que difieren de la enfermedad humana sobre todo en la causa inicial que desencadena la colitis y en el curso clínico de la inflamación.

- Los animales modificados genéticamente resultan útiles para estudiar las características de la inflamación en ausencia de determinadas moléculas e identificar así estrategias terapéuticas específicas. Estos modelos permiten una “disección molecular” de las rutas inmunorreguladoras y permiten estudiar la contribución de determinados genes o funciones intestinales en la inflamación. Una limitación de los modelos “*Knockout*” es que otros genes pueden verse sobreexpresados como resultado de la eliminación del gen, pudiendo originar conclusiones erróneas sobre el gen inicialmente investigado.

- Finalmente, los modelos de transferencia consisten en inducir la colitis mediante la transferencia de determinados tipos celulares a animales inmunocomprometidos.

## • Etiología de la inflamación en los modelos animales

Al estudiar estos modelos animales se ha observado que hay tres principales tipos de defectos que pueden desencadenar la inflamación intestinal y pueden estar implicados en la enfermedad humana:

- puede haber un incremento en los mecanismos efectores de la inflamación
- pueden estar disminuidos los mecanismos reguladores, por lo que el estado de “inflamación controlada” pasaría a ser no controlada.
- la barrera epitelial (primera línea de defensa del intestino) puede estar dañada, tanto la integridad del epitelio, como la producción de factores protectores.

## • Aportaciones de los modelos animales

Las tres grandes aportaciones de los modelos animales al conocimiento de la enfermedad son las siguientes:

- han demostrado que la microbiota normal está implicada en la patogénesis de la inflamación intestinal, puesto que, en casi todos los modelos, si se mantienen los animales en condiciones de esterilidad, no se produce la inflamación.
- las células T CD4 intervienen de alguna forma en la inflamación. En algunos modelos se origina una respuesta Th1, en otros es de tipo Th2; en unos casos participan en la etapa aguda mientras que en otros modelos intervienen en la fase crónica...
- la variedad de modelos experimentales muestra además como defectos muy dispares pueden provocar la misma enfermedad. Por ejemplo, vemos como la eliminación de una citokina, un receptor de células T, un transportador de xenobióticos o una proteína de uniones intercelulares, desencadenan una inflamación intestinal.

En cuanto al futuro en la investigación con modelos animales de inflamación intestinal, se espera que puedan ser útiles en la identificación de las respuestas inmunes concretas implicadas en la patogénesis de enfermedad humana, en el desarrollo de nuevas terapias (terapia anti-citocinas, terapia génica...) y en la identificación de los factores genéticos que confieren susceptibilidad a la enfermedad.

## C2. Modelo de inducción con sulfato de dextrano

El sulfato de dextrano (*dextran sodium sulphate*, DSS) es un polisacárido sulfatado cargado negativamente y es muy utilizado para generar inflamación intestinal en roedores por ser asequible y barato, la colitis es fácil de inducir, es un modelo que está bien caracterizado y sobre todo, el daño y las lesiones producidas son muy reproducibles. Por ello, resulta muy útil para ensayar nuevos fármacos y estudiar sus mecanismos de acción.

En 1990, Okayasu *et al* describieron este modelo en ratones BALB/c. La administración de DSS al 5% en el agua de bebida originaba inflamación aguda de la mucosa del colon, ulceración, pérdida de peso, acortamiento de la longitud del colon y diarreas sanguinolentas. La inflamación originada era más grave en el colon izquierdo que en el derecho y la lámina propia aparecía infiltrada con gran número de macrófagos y neutrófilos (66). Tras interrumpir el tratamiento, se consigue una fase de regeneración. Además, cuando el DSS se administra en forma de ciclos (7 días de DSS seguidos de 10 días de agua sola), se consigue una colitis de características crónicas entre el tercer y el quinto ciclo (15).

La fase regenerativa fue estudiada en ratones Swiss-Webster (67). Observaron que dos semanas después de interrumpir la administración del DSS, la lámina propia y la capa submucosa seguían infiltradas por macrófagos y además aparecían agregados de células B. También observaron la presencia de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 en las áreas de inflamación y en las lesiones en criptas que estaban regenerándose.

**Tabla 2.** Características de la colitis inducida por DSS tras 1, 2 y 3 ciclos de tratamiento (6 días de DSS seguidos de 6 días de agua)

	Primer ciclo	Segundo ciclo	Tercer ciclo
Aspectos macroscópicos	Edema en submucosa Erosiones hemorrágicas	Múltiples erosiones en mucosa Acortamiento del colon	
Aspectos histológicos	Erosiones en epitelio Dilatación de criptas Infiltrado inflamatorio Congestión vascular Pérdida células goblet Edema en lámina propia, muscularis mucosa y submucosa	Severidad de las lesiones similar al primer ciclo	Pérdida de superficie epitelial Menor número de glándulas y células de goblet Reducción del grosor de la mucosa Menor infiltrado celular
Características inmunohistoquímicas	No se observan alteraciones en la inmunoreactividad de fibras nerviosas de los plexos submucoso y mientérico		
Observaciones microscopio electrónico	Dilatación de las criptas con aspecto de fisura Depleción de células de goblet dando	Superficie epitelial ampliamente dañada Gran dilatación de las criptas Eliminación de células	Lesiones crónicas en la mucosa Enterocitos aparecen esparcidos Carencia de

	aspecto de cráter	de goblet Distribución no homogénea de las microvellosidades	microvellosidades y bacterias adheridas a la superficie epitelial, en algunos puntos
--	-------------------	---	--

La fase crónica del modelo de DSS fue estudiada con detalle en ratas Sprague-Dawley (68), donde analizaron las características clínicas, estructurales y ultraestructurales tras la administración de uno, dos y tres ciclos de DSS, donde cada ciclo consistía en 6 días de DSS seguidos de 6 días de agua sola (*Tabla 2*).

El mecanismo por el que el DSS produce la colitis no se conoce completamente. La implicación de las células T en este modelo ha sido muy discutida. Algunos investigadores afirmaron que se produce una respuesta de tipo Th1 (62) mientras que otros observaron que la respuesta Th1 se daba en la fase aguda pero que en la etapa crónica predominaba una respuesta Th2 (67). Sin embargo, Dieleman y col. (69) demostraron que el DSS es capaz de inducir una colitis de idénticas características en ratones BALB/c y en ratones SCID (*severe combined immunodeficiency*), que carecen de células T y B. Esto sugiere nuevas hipótesis sobre la etiología de la inflamación, en la que los macrófagos cobran mayor importancia. Las últimas hipótesis apuntan a que el DSS, en primer lugar produce un efecto tóxico sobre el epitelio intestinal produciendo un aumento de la permeabilidad, que es previo a la activación de los macrófagos (70). Una vez dañada la mucosa, el DSS es capaz de atravesarla (71), al igual que las bacterias intestinales, y es incorporado por los macrófagos de la lámina propia, lo cual podría alterar su función y desencadenar así la inflamación, mediada en principio por macrófagos y en etapas más tardías, también por linfocitos.

### ***C3. Modelo de inducción con ácido trinitrobencenosulfónico***

Las ventajas que presenta este modelo (barato, fácil y rápido de inducir, muy reproducible...) hacen que sea uno de los más utilizados y lo han hecho especialmente útil, al igual que el modelo de DSS, para ensayar nuevos tratamientos y para estudiar sus mecanismos de acción.

En 1989, Morris *et al* (72) describieron este modelo de inflamación en rata que se induce con la administración de un único enema de 30mg de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico) disuelto en etanol (30-50%). El TNBS es un hapteno que al unirse a sustancias de suficiente tamaño molecular adquiere la capacidad de inducir una respuesta inmune. El etanol actúa como destructor de la barrera mucosa, facilitando que el TNBS penetre en la pared del colon y reaccione con los grupos lisina de las proteínas, generándose así una reacción de hipersensibilidad retardada, caracterizada por un patrón de citocinas de tipo Th1, en la que se producen grandes cantidades de IL12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1B e IL6.

Las lesiones producidas se caracterizan por afectación segmentaria de la mucosa -áreas de úlceras con áreas de mucosa normal-, afectación transmural con engrosamiento de la pared intestinal, intenso infiltrado inflamatorio en la lámina propia (neutrófilos, macrófagos y células T), edema y fisuras de la mucosa profundas -longitudinales y transversales-. En la fase crónica pueden observarse granulomas no caseificantes, adherencias, fístulas y áreas de estenosis. Los animales presentan pérdida de peso, diarrea y leucocitosis durante la fase aguda, y diarrea sanguinolenta mientras persisten las úlceras (15).

El modelo de inducción por TNBS ha sido muy útil para el estudio de aspectos muy importantes de la inflamación intestinal, como por ejemplo, el estudio de patrones de secreción de citokinas, mecanismos de la tolerancia oral, adhesión celular o inmunoterapia. Entre otros muchos ejemplos, sirvió para estudiar terapias anti-citokinas. Se observó que la administración de anticuerpos anti-IL12 o el empleo de ratones IL12<sup>-/-</sup> es capaz de prevenir la enfermedad o de tratar la colitis ya establecida. La administración de anticuerpos anti-IFN $\gamma$ , es sin embargo un tratamiento menos efectivo e incluso se puede inducir la colitis con TNBS en ratones IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (73). Esta discrepancia podría explicarla el hecho de que la administración de anticuerpos anti-IL12 a ratones con colitis inducida por TNBS, produce la muerte de células Th1 activadas por apoptosis mediada por Fas, mientras que anticuerpos anti IFN $\gamma$  no producen este efecto. De esta forma, mientras que el tratamiento anti-IL12 conduce a la pérdida de células Th1, el tratamiento anti-IFN $\gamma$  simplemente bloquea la función de dicha citokina. Además, en la inflamación de tipo Th1 también se produce TNF $\alpha$  y es probable que esta citokina produzca la inflamación en la mucosa en ausencia de IFN $\gamma$ .

#### **C4. Modelo IL10<sup>-/-</sup>**

Los ratones deficientes en el gen de la *IL10* desarrollan espontáneamente una colitis a las pocas semanas de vida (74), que afecta al intestino delgado y grueso y se caracteriza por inflamación transmural, lesiones discontinuas, hiperplasia epitelial, úlceras, abscesos en las criptas y engrosamiento de la pared intestinal. Los animales sufren también diarrea, pérdida de peso, anemia y retraso en el crecimiento. Estas características aparecen cuando los animales se mantienen en condiciones normales, ya que cuando se obtienen en condiciones SPF (*specific pathogen-free*), se produce una atenuación de la enfermedad ya que la colitis generada es más leve y queda restringida al colon. Estos ratones sufren menos alteraciones extraintestinales como anemia, esplenomegalia y hepatitis. Además, cuando los ratones IL10<sup>-/-</sup> se mantienen en condiciones estériles, la colitis se suprime completamente (74). En este caso no se observan evidencias clínicas ni histopatológicas y los animales son indistinguibles de ratones “*wild type*” mantenidos en las mismas condiciones. Estos datos apoyan la hipótesis de que la inflamación intestinal está causada por una respuesta anormal del sistema inmune de la mucosa frente a la microbiota intestinal. Algunos investigadores han encontrado alteraciones en las especies que colonizan el colon, al igual que ocurre en pacientes de EC, y que esos cambios se observan a las 24 horas tras el nacimiento. Esto ha sugerido que

alteraciones genéticas de fondo influyen la colonización bacteriana y que esta alteración en la colonización precede el desarrollo de la colitis (75).

En este modelo existen diferencias importantes en las características de la enfermedad en función de la cepa de ratón que se emplee en el estudio, lo cual muestra que el perfil genético característico de cada tipo de ratón tiene una influencia importante en el desarrollo y la progresión de la colitis (76). En un estudio entre diferentes cepas se observó que por ejemplo, las cepas C3H/HeJBir y 129/SvEv son muy susceptibles, mientras que ratones C57BL/6L desarrollan una colitis más leve que se resuelve a los tres meses tras el nacimiento (77).

La eliminación del gen de la *IL10* origina una serie de defectos inmunes que desencadenan la enfermedad (78). La IL10 es una citokina antiinflamatoria, fundamental en la regulación de la respuesta de las mucosas. Reduce la presentación de antígenos, inhibe la activación de las células T (79, 80) y son fundamentales en la función de las células T reguladoras (81). La mucosa y submucosa de ratones IL10<sup>-/-</sup> contiene gran número de macrófagos, células B, células plasmáticas y células T CD4<sup>+</sup>αβTCR<sup>+</sup> y están sobreexpresadas varias citocinas como IL1, IL6, IL12/p40 y TNFα. Las células T son fundamentales ya que la colitis no se desarrolla en ratones deficientes en células T. Estas células T CD4<sup>+</sup> presentes en el colon producen además grandes cantidades de IFNγ, lo que implica una respuesta de tipo Th1 en la patogénesis de la enfermedad (82, 83). En el inicio de la inflamación son importantes el IFNγ y la IL12 ya que la administración de anticuerpos anti-IFNγ disminuye la gravedad de la colitis y los anticuerpos anti-IL12 previenen totalmente la inflamación. En la fase crónica, en cambio, no se requiere el IFNγ (84) pero si la IL12. Esta última citokina se requiere para la proliferación y viabilidad de las células Th1, que están implicadas en la perpetuación de la inflamación, ya que son resistentes a la apoptosis.

De los estudios derivados de este modelo de inflamación ha surgido la idea de la administración de IL10 como terapia para tratar la EII (85), ya que inhibe la producción de citocinas Th1. Comenzó probándose la administración subcutánea de anticuerpos anti-IL10, aunque los resultados no fueron muy prometedores debido a que solo se observó una modesta mejoría en pacientes de EC. La vida media de la IL10 en sangre es de entre 1,1 a 2,6 horas, por lo que es posible que estuviese siendo eliminada antes de que alcanzase los tejidos diana. Las bacterias modificadas genéticamente son una nueva estrategia para la liberación de la IL10 en el lugar de acción. Primero se ensayaron en los modelos animales de DSS, donde se consigue una reducción del daño del 50% y en ratones IL10<sup>-/-</sup>, en los que se previene la colitis (86). Eliminando el gen de la timidilato sintasa se evitaban problemas de seguridad, ya que de esa forma, la viabilidad disminuye drásticamente si no hay timina o timidina en el medio (87). Este tratamiento ya se está probando en humanos con resultados preliminares buenos sobre la seguridad y eficacia (88). Otras estrategias propuestas incluyen el empleo de microesferas de gelatina que contienen IL10, o terapia génica empleando adenovirus como vectores que liberen el gen de la *IL10* directamente en las células del epitelio gastrointestinal.

# D) BIOLOGÍA DE SISTEMAS, TRANSCRIPTÓMICA Y BIOINFORMÁTICA

## D1. *Biología de Sistemas: la ciencia del siglo XXI*

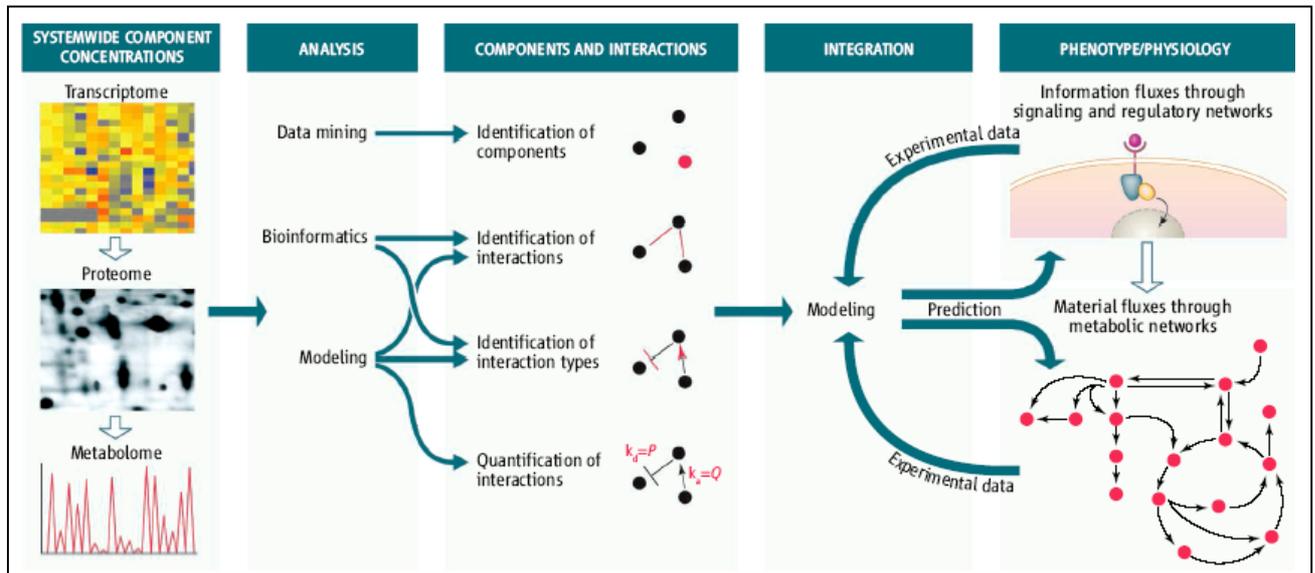
### D1.1 Desarrollo y retos de la Biología de Sistemas

La Biología Molecular es el estudio de la vida a un nivel molecular. Esta área se solapa con otros campos de la Biología y la Química, particularmente Genética y Bioquímica. La Biología Molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un afinado funcionamiento de la célula. La Biología Molecular moderna se puede decir que comienza a partir de los hallazgos de Watson y Crick, en 1953 (89). Uno de los grandes logros de esta disciplina ha sido la secuenciación de genomas de diferentes organismos a gran escala, lo cual no hubiese sido posible sin el desarrollo de herramientas informáticas muy potentes que pudiesen manejar todo ese volumen de datos. Sin embargo, la obtención de la secuencia del genoma por sí misma nos aporta muy poca información sobre el funcionamiento de las células u organismos ya que falta por conocer qué codifican esos millones de pares de bases, cómo se regula su lectura, qué función tienen los productos de transcripción (RNA codificantes, no codificantes), como interaccionan entre ellos... Por ello, el proyecto Genoma Humano ha conseguido abrir las puertas a una enorme cantidad de posibilidades de investigación futuras. Para conocer el comportamiento en su conjunto de todos los genes y proteínas que actúan en una célula, se requiere por tanto una visión y una forma de trabajar totalmente diferente. Para ello surge la Biología de Sistemas, como una nueva forma de investigación en Biología (90-92).

La Biología de Sistemas consiste en el estudio de un organismo, entendiéndolo de una forma integrada, como una red de interacciones entre genes, proteínas y reacciones biológicas que dan lugar a la vida. En lugar de analizar componentes o aspectos individuales del organismo, esta disciplina se centra en todos los componentes y las interacciones entre ellos, todo como parte de un único sistema (93). A diferencia de la Biología tradicional, basada en un enfoque reduccionista del estudio individualizado de genes o proteínas y sus funciones específicas, el objetivo de la Biología de Sistemas es combinar la información molecular de varios orígenes (mRNA, proteínas...) para entender los sistemas biológicos y su complejidad y, finalmente, intentar predecir la respuesta biológica a nivel celular, tisular, de órgano e incluso de organismo completo (*Figura 15*).

El enfoque innovador que supone la Biología de Sistemas se puede entender con el siguiente ejemplo. Si queremos estudiar un automóvil y lo que hacemos es estudiar las funciones específicas por

separado que tienen el motor, los faros, la dirección y los frenos, de ninguna forma podremos comprender como funciona un automóvil en su conjunto. Y más importante aún, no podremos saber como arreglarlo si el vehículo deja de funcionar correctamente. De igual forma, las estrategias tradicionales en estudios biológicos y en salud humana proporcionan una información muy limitada sobre cómo funciona realmente el cuerpo humano y cómo predecir, prevenir o remediar potenciales problemas de salud.



**Figura 15.** El estudio de Biología de Sistemas consiste en la integración de información procedente de diversas estrategias experimentales para la creación de modelos matemáticos que permitan comprender un sistema biológico en su totalidad (93).

Gracias al avance en los últimos años sobre genes y proteínas, y al desarrollo de nuevas herramientas y tecnologías, la comunidad científica ha comprendido que los componentes de los organismos vivos nunca funcionan de forma aislada. La Biología de Sistemas pretende por tanto, comprender esas interacciones dinámicas como claves para comprender la vida en varios niveles:

- interacciones moleculares y celulares
- redes de interacción (“networks”)
- metabolitos y señalización celular
- redes reguladoras y de control

## D1.2 Concepto de sistema y propiedades emergentes

Un sistema podría definirse como un conjunto de *partes*, que una vez unidas, interactúan para formar una única unidad más compleja. Un ejemplo de sistema muy simple sería el siguiente, compuesto por tres partes:

- un pequeño vasito de metal, del tamaño de una nuez,
- una pieza de cristal, con forma de globo,
- un trozo de cable de tungsteno enrollado en espiral.

Cada una de estas partes resultan poco útiles por separado pero si se unen de una determinada forma (el cable dentro de la pieza de cristal, y el pequeño vaso de metal cerrando al vacío la abertura del cristal), lo que obtenemos sería una bombilla, es decir, tres partes, relativamente inútiles por separado, formando un sistema. Ese sistema posee una función, que es propia y única del sistema, y no de las partes por separado. Y aún más, esa función solo puede observarse cuando consideramos el sistema, y de ninguna manera sería imaginable observando cada componente por separado. La idea fundamental es que partes individuales, insignificantes por sí solas, pueden combinarse de formas inesperadas para formar un sistema, y la interacción de dichas partes en el sistema crea importantes funciones o propiedades que no podrían imaginarse de la observación de cada parte por separado. Es decir, que un sistema es mayor que la suma de sus partes.

Esas propiedades o funciones que surgen sólo de la interacción de las partes de un sistema se conocen en Biología de Sistemas como propiedades emergentes. Cualquier función llevada a cabo por un sistema, que no se debe a ninguna de las partes por separado sino únicamente a la interacción de las mismas dentro del sistema, es una propiedad emergente. En el ejemplo anterior, la capacidad de la bombilla para generar luz no puede atribuirse a ninguna de las tres partes del sistema, sino que la luz solo aparece cuando se unen e interaccionan las partes.

### **D1.3 Investigación en Biología de Sistemas**

Una vez descrito el concepto de sistema, podemos considerar qué ocurre con el número de posibles interacciones a medida que el número de partes del sistema se incrementa. En el caso más simple, un sistema tendría dos partes, con lo que solo sería posible una interacción. En un sistema de cuatro partes, habría 11 modos posibles de interacción. Si las partes fuesen 20, las interacciones posibles serían 190, y eso considerando solo interacciones de dos en dos. Y entre los aproximadamente 25.000 genes que comprenden el genoma humano, cabrían esperar más de 336 millones de interacciones de dos en dos. Sin embargo, los genes interaccionan más que simplemente en pares, con lo que el número total de interacciones sería incalculable. Bajo esta situación, se hace necesaria cierta simplificación para poder comprender un sistema biológico. Afortunadamente, en la naturaleza, los procesos biológicos parecen operar de la misma manera en diferentes organismos. El ciclo de Krebs, por ejemplo, es igual en la mayoría de las especies. Debido a que esos procesos biológicos se repiten en diferentes organismos, incluyendo formas de vida muy simples y organismos complejos, el estudio de la Biología de Sistemas se puede realizar empleando los llamados “organismos modelo”. Así, los científicos pueden emplear células de levadura para estudiar como es el metabolismo de los azúcares en muchas especies, incluyendo los humanos.

Para poder estudiar, por tanto, un organismo en su totalidad, la Biología de Sistemas se basa en los siguientes pilares (94):

- Deben seguirse estrategias globales para la obtención de datos. Los experimentos a gran escala son hoy día posibles gracias al desarrollo de técnicas de miniaturización y manejo informático de la información. Técnicas de Transcriptómica, Proteómica..., es decir, las conocidas “ómicas”, son las que actualmente permiten obtener datos a gran escala de todo un sistema.
- La información que deriva de diversas fuentes debe ser integrada, ya que el poder de la Biología de Sistemas, deriva en parte de conocimientos pre-existentes sobre Bioquímica y Biología Celular que deben ser integrados con los modelos matemáticos obtenidos a partir de experimentos a escala global.
- Modelado matemático y estadístico. La Biología de Sistemas se basa en modelos de trabajo para crear simulaciones que se usan para probar los posibles efectos de una perturbación en un sistema y hacer predicciones que pueden ser comprobadas con más datos experimentales. Existe por tanto integración entre diseño experimental y modelado informático.
- Colaboración interdisciplinaria entre investigadores de muy diversas áreas. Ingenieros, físicos, matemáticos e informáticos deben trabajar junto con bioquímicos, biólogos y fisiólogos, para poder obtener los datos experimentales, desarrollar estrategias computacionales muy sofisticadas, realizar predicciones y poder hacer una interpretación biológica de los resultados.

### D1.4 La era de las “ómicas”

En paralelo a la ejecución del Proyecto Genoma Humano (95, 96) se han desarrollado tecnologías de alta capacidad de análisis a nivel molecular. Así, surgió en primer lugar el término Genómica, como rama de la Biología que se encarga del estudio de los genes. El éxito de esta disciplina condujo a la proliferación de las llamadas ciencias “ómicas”, cuya denominación resulta de la unión entre conceptos conocidos y dicho sufijo, el cual proviene del griego “om-“, que hace referencia a la totalidad de algo. Estas tecnologías de alta capacidad de análisis molecular están suponiendo un salto de escala en la aproximación al conocimiento básico de las cuestiones biológicas, así como en el análisis de la funcionalidad celular y en las aplicaciones biotecnológicas derivadas de ese conocimiento. Entre las “ómicas” perfectamente aceptadas entre la comunidad científica, destacan la Transcriptómica, que estudia la expresión de genes, la Proteómica, que se encarga de las proteínas que existen en una célula/tejido, la Metabolómica, que se encarga del estudio de los metabolitos, o la Interactómica, que estudia las interacciones entre las proteínas. Entre las más novedosas se encuentran la Fluxómica, que se encarga de estudios dinámicos de los flujos metabólicos o la Epitómica, que trata de identificar los epítomos que interaccionan y activan al sistema inmune, y que presenta aplicaciones muy innovadoras como el diseño *in silico* de vacunas.

De la aplicación práctica de estas disciplinas, han surgido también otras ramas, entre las que destacan la Farmacogenómica, cuyo objetivo es optimizar el tratamiento de los pacientes creando

fármacos en base a las características genéticas que afectan a la respuesta a un fármaco, es decir, la medicina individualizada (97-99). La Toxicogenómica (100), por su parte, trata de comprender el desarrollo de enfermedades que son el resultado de la relación que existe entre los genes y el medio ambiente, estudiando cómo y cuándo las señales externas a las células estimulan la expresión de ciertos genes en su interior.

## **D2. Transcriptómica**

### **D2.1 El estudio de la expresión génica**

Todos los organismos vivos poseen miles o decenas de miles de genes en sus genomas, de los cuales, solo una pequeña fracción se están expresando en cada célula en un determinado momento. Por ello, la regulación temporal y espacial de la expresión génica es lo que determina a los organismos vivos. La Transcriptómica puede definirse como el estudio de ese conjunto de mRNAs que hay en una determinada célula/tejido/organismo en un determinado momento o condición, es decir, el estudio del transcriptoma. El interés y las aplicaciones del estudio de los transcriptomas son muy diversos. Por ejemplo, el estudio de los transcriptomas de las células madre o de células cancerosas es de gran interés para conocer y entender los procesos de diferenciación celular y carcinogénesis. El desarrollo normal de una célula, así como los cambios patológicos que dan lugar a las enfermedades, se piensan que están dirigidos por cambios en la expresión génica. Aunque los microarrays o chips de DNA son el principal recurso en la actualidad para conocer esos genes que están diferencialmente expresados, existen otras técnicas que se han empleado hasta ahora para el estudio de la expresión génica. En análisis en serie de la expresión génica, SAGE (“*serial analysis of gene expression*”) es una técnica muy usada para el estudio de la expresión. Consiste en aislar el mRNA, producir cDNA de los extremos 3', unirlos formando una cadena y finalmente clonarlos en un vector para secuenciarlos. La técnica de “*differential display*”, consiste en la amplificación de regiones 3'-terminales de los mRNA empleando cebadores oligo-dT y una colección de cebadores de secuencias aleatorias. Estos fragmentos, marcados radiactivamente, son resueltos en un gel de poliacrilamida donde se pueden observar las diferencias de expresión entre dos condiciones. Otro método, conocido como hibridación sustractiva (“*subtractive hybridization*”) consiste en el empleo de cebadores oligo-dT para sintetizar cDNA y producir así librerías de cDNA específicas para un tipo celular, tejido o condición concreta. Ese cDNA es hibridado con el mRNA de la muestra a estudiar, de modo que, aquellas secuencias que hibriden, es decir, que estén presentes en ambas poblaciones, serán separadas, usando columnas de hidroxapatito, de aquellas que no han hibridado, obteniendo así las moléculas expresadas diferencialmente entre las dos condiciones. Todas estas técnicas están siendo reemplazadas por los microarrays de DNA, debido a su reproducibilidad, facilidad de experimentación, alta sensibilidad o ausencia de radiactividad. Por otro lado, se han mejorando los protocolos experimentales y de análisis, se han reducido los costes y se están desarrollando nuevas herramientas informáticas que facilitan el manejo de la información.

## D2.2 Los microarrays de DNA

### D2.2.1 Introducción, tipos y aplicaciones

En un organismo vivo, miles de genes y sus productos funcionan de manera muy organizada y regulada. Sin embargo, con los métodos tradicionales en biología molecular, en los que se trabajaba normalmente con un gen por cada experimento, era muy difícil obtener una visión global del funcionamiento de los genes y sus interacciones. En los últimos años, una nueva tecnología conocida como “Microarrays” ha atraído la atención de los investigadores (101-104). La palabra *microarray* deriva del griego “*mikro*” (pequeño) y del inglés “*array*” (distribución ordenada). Esta tecnología permite analizar los sistemas vivos de un modo completamente nuevo e incluso puede estudiar el genoma completo empleando un único chip. El principio en el que se basa esta técnica es tan simple como el apareamiento de bases (A-T y G-C en el DNA y A-U y G-C en el RNA). Un chip o microarray consiste en un soporte sólido sobre el que se ha depositado de forma ordenada y en localizaciones concretas, una colección de ácidos nucleicos complementarios a genes específicos. Pueden representar genomas completos pudiendo incluso incluir secuencias de genes aún desconocidos. En otros casos consisten en colecciones de secuencias de genes relacionados con algún proceso o función concreta, como por ejemplo genes de apoptosis, genes de citokinas...La característica más importante de los chips es la capacidad de análisis masivo y simultáneo, lo cual permite un salto cuantitativo en las posibilidades experimentales (se pueden estudiar muchos genes), pero sobre todo, el poder de esta técnica radica en la posibilidad de aportar una visión molecular global de todo lo que está ocurriendo en una célula/tejido por ejemplo en una determinada enfermedad y permite entrever el funcionamiento orquestado de los genes.

Aunque se han desarrollado diferentes plataformas y procedimientos, todas comparten la simplicidad del diseño experimental. Un experimento típico con microarrays consiste en extraer el RNA de un tejido, órgano o cultivo celular, convertirlo en cRNA marcado (“*target*”) e hibridarlo con las secuencias (“*probes*”) que contiene el chip (*Figura 16*). La cantidad de muestra que hibride con cada secuencia del chip nos da información sobre el nivel de expresión del gen correspondiente.

Los microarrays de ácidos nucleicos pueden ser de cDNA (en los que las sondas son producidas mediante amplificación de cDNA por PCR) o de oligonucleótidos (donde las sondas son porciones de DNA sintético de cadena simple de unos 15-25 nucleótidos). En cuanto a los tipos de marcaje, las primeras propuestas consistieron en marcar las muestras de RNA con dos colorantes derivados de cianinas (Cy5 rojo y Cy3 verde). Estas muestras procedentes de dos condiciones a comparar (por ejemplo, sano-enfermo) se mezclan en cantidades iguales y se hibridan en el mismo chip. La lectura se hace con detectores que permitan detectar los espectros de emisión de los dos colorantes y generar imágenes separadas para cada uno de ellos. Los inconvenientes que presenta este procedimiento son la necesidad de utilizar mayores cantidades de RNA y sobre todo que la afinidad de los distintos colorantes a la muestra puede ser diferente. Los protocolos más modernos trabajan con RNA complementario (cRNA) que resulta de la

transcripción *in vitro* del RNA total. Las cantidades de RNA requeridas para hacer el experimento son ínfimas (0,2-2µg) y además solo se emplea un colorante (generalmente biotina-estreptavidina). La desventaja de este método es de tipo económica puesto que se necesita un chip para cada muestra.

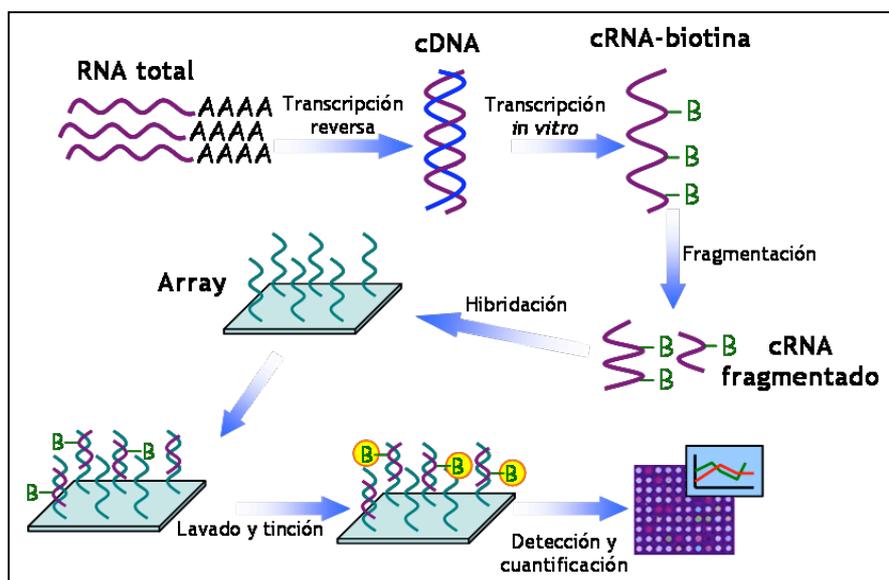


Figura 16. Esquema básico del protocolo de hibridación de los microarrays.

Los dos objetivos principales para los que se diseñan los estudios de microarrays suelen ser el estudiar los cambios de expresión génica o bien, la identificación de polimorfismos. Las aplicaciones más directas que derivan de ellos son, por ejemplo, el conocer los genes que están implicados en una enfermedad, subdividir enfermedades como el cáncer en subtipos que permitan un mejor tratamiento, identificar nuevas dianas terapéuticas, aplicaciones en Farmacogenómica para conocer la eficacia que tendría un tratamiento en cada paciente, permitiendo por ejemplo, seleccionar el tratamiento más adecuado para el VIH en función de las mutaciones del virus, así como la Toxicogenómica, donde los microarrays pueden dar información sobre la eficacia, mecanismo de acción o sus efectos tóxicos.

En cuanto a las perspectivas de los microarrays en salud humana, aunque aún no se observa una implantación generalizada de la técnica, las previsiones son prometedoras. Así, recientemente han aparecido diversos microarrays con aplicaciones concretas en determinadas patologías (105). Por ejemplo, el OncoChip, que incluye 9.300 genes relacionados con las formas de cáncer más frecuentes, empleado para la caracterización de tumores; el LipoChip, que constituye el primer test genético para la hipercolesterolemia familiar y recoge 224 mutaciones del gen del receptor LDL. El IBDChip es otra herramienta genética que cuenta hasta el momento con 46 genes relacionados con la enfermedad y que puede aportar datos sobre la agresividad de la dolencia, necesidad de cirugía o localización de la patología. Otro ejemplo es el Mammaprint, un dispositivo que evalúa el pronóstico de esta enfermedad en

las mujeres que se han sometido a cirugía e indica el riesgo de sufrir una recaída en función de la actividad de una selección de 70 genes (106).

### **D2.2.2 Microarrays: de la Genómica funcional a la Biología de Sistemas**

Una de las mayores dificultades que ha tenido la investigación con microarrays en los últimos años ha sido la carencia de protocolos o metodologías comunes a seguir. Los primeros microarrays contenían solo cientos o pocos miles de genes, que daban como resultado varias decenas de genes afectados, fácilmente analizables. Sin embargo, las mejoras de la técnica y el progreso tan rápido en las tecnologías han hecho que las posibilidades de esta técnica hayan crecido a un ritmo mucho mayor que la propia metodología para poder analizarlas. Cuando surgieron los chips de genoma completo (el chip humano de Affymetrix, por ejemplo, contiene más de 54.000 sondas) se empezaron a utilizar estrategias estadísticas muy restrictivas, que daban como resultado demasiados falsos negativos, que luego han sido sustituidas por estrategias de filtrado basadas en umbrales de cambios de expresión y valores de *p*-value más discretos. Las listas de genes así seleccionadas son sometidas a análisis funcionales para obtener información biológica sobre los procesos biológicos que están afectados. El último paso en esta metodología, que es la más aceptada actualmente, consiste en la confirmación por otras técnicas independientes (*postgenómica*), de los cambios de expresión identificados en los genes de mayor interés.

Sin embargo, una nueva visión de la Biología y los organismos vivos, la Biología de Sistemas, está haciendo cambiar también la forma de interpretar, entender y trabajar con los datos obtenidos de un experimento de microarrays. Los genes dentro de una célula no operan por separado sino que se regulan e interaccionan entre ellos. Se sabe que los genes que se coexpresan tienden a desempeñar funciones relacionadas en una célula y que la coexpresión de genes ocurre en muchos casos en zonas contiguas del cromosoma (107). Además, genes con funciones relacionadas aparecen a veces en zonas próximas del genoma. Los microarrays de genoma completo permiten medir el comportamiento de todos los genes que se están expresando en una célula, tejido u organismo en un determinado momento y por ello, pueden aportar gran información sobre el comportamiento de la célula/tejido como “sistema” y no únicamente de sus partes (cada gen) por separado. Las herramientas más recientes para analizar datos de microarrays que se están creando se basan en el mismo enfoque de la Biología de Sistemas, en el hecho de analizar el comportamiento global de todos los genes, en vez de analizar las funciones de genes pre-seleccionados en base a umbrales de corte.

### **D2.2.3 Estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal mediante microarrays de DNA.**

En los últimos meses se han ido publicando numerosos trabajos realizados con microarrays, tanto en diversos modelos animales como en la enfermedad humana. En este apartado se recogen algunos de ellos y en él se refleja el problema comentado anteriormente, de la falta de criterios y pautas tanto en la metodología, como en la forma de comunicar y presentar los resultados.

Entre los trabajos realizados con modelos animales, encontramos uno que estudian el perfil genómico de tres modelos de inflamación: DSS, TNBS y un modelo de transferencia, con el fin de ver el parecido con la enfermedad humana (108). Para ello emplean un chip de Agilent en los tres modelos y ratones BALB/c como controles. Sin embargo, en este trabajo no describen el chip, cuantos genes tiene, ni el número de réplicas de cada modelo, no está clara la forma de normalizar los datos, no han realizado ninguna validación posterior... Además, los resultados que aportan consiste en un listado de genes donde la mayoría ya habían sido previamente relacionados con la EII o descritos en estos modelos, como genes de cotquinas, quimioquinas y sus receptores, metaloproteasas, calgranulina, prostaglandina sintasa... En el año 2006 se publicó otro trabajo en el modelo de TNBS (109). Utilizaron un chip de cDNA que representa 1.252 genes. La información que se puede obtener de este chip es muy limitada aunque el principal inconveniente de este trabajo es que únicamente han empleado una muestra de TNBS y un control, es decir, que no han realizado al menos un duplicado por lo que el tratamiento estadístico por tanto es nulo en este trabajo, un aspecto fundamental cuando se trabaja con una técnica nueva. Otro grupo de investigadores estudió el efecto de la administración del péptido intestinal vasoactivo (VIP) sobre la colitis inducida por TNBS (110). Emplearon un chip se genes de citokinas compuesto por unos 90 genes. En este caso, emplearon 3 animales en cada punto, permitiéndoles realizar análisis estadísticos y además validaron algunos genes por PCR cuantitativa. En otro artículo, publicado en el año 2002 y empleando microarrays, observan patrones de expresión similares entre el modelo de TNBS y animales con deficiencia en vitamina A (111). Estudios previos apuntaban a que la deficiencia en esta vitamina podría inducir o intensificar alteraciones de tipo inflamatorio en el sistema gastrointestinal, de ahí el interés de este trabajo. En este caso emplearon un chip de 1.152 genes, construido con cadenas de cDNA obtenidas de librerías de células CaCo. La dificultad en la interpretación de los resultados que aporta este trabajo está en el hecho de que usaron el chip anterior, preparado con una librería de células humanas, para hibridar muestras de rata, un abordaje totalmente inaceptable.

Entre los trabajos en EII humana, podemos citar varios. En uno realizado por Langmann *et al* (112) observaron una represión generalizada en EC y CU de genes de detoxificación como *CYP3A4*, *GPX1*, *GSTMA1*, *SULT1A3*, *ABCB1* o *ABCG8* entre otros. Para este trabajo emplearon uno de los chips más usados para humano, el Human Genome U133 de Affymetrix y además llevaron a cabo validaciones por PCR cuantitativa. Emplearon sin embargo, *pool* de muestras, cuando lo más recomendable es hacer réplicas independientes. En el año 2000, Dieckgraefe *et al* publicaron un trabajo donde emplearon un chip de aproximadamente 6.500 genes para estudiar la EII (113). Sus resultados consisten en un listado de genes muy diversos como *MMP1*, *ALDOB*, *APOE*, *DEFA2*, *IL8*, *SOD2*, *ITGB2*... También profundizan en la utilidad de agrupar los genes por perfiles de expresión y validan tres genes por PCR (aunque en este caso no es cuantitativa). La precaución que hay que tener con este artículo es que han empleado tejido de mucosa y no tejido total como suele ser más habitual. En otro trabajo se encargaron de estudiar el efecto de varios fármacos que habitualmente se emplean para tratar la EII como el 5-ASA, metronidazol, azatioprina y prednisona (114). Emplearon un chip llamado PharmArray, el cual no describen, para analizar células CaCo

tratadas con dichos fármacos. Encuentran relación sobre todo con la azatioprina ya que genes que están sobreexpresados en EC, se reprimen con dicho fármaco. La precaución con este trabajo es que los datos de las células lo normalizan respecto a los datos de biopsias donde hay más tipos celulares además de enterocitos, lo que puede generar errores. EL último artículo que incluimos en este apartado (115) consistió en un estudio de la expresión génica en EC y CU empleando un chip de cDNA compuesto por más de 33.000 genes. Este trabajo, entre todos los comentados, es el que empleó el chip más completo y el que mejor siguió las normas recomendadas a la hora de trabajar con microarrays. Emplearon 10 réplicas independientes de EC y 10 de CU, realizaron análisis estadísticos para seleccionar los genes que presentaran cambios significativos y además llevaron a cabo validaciones de algunos genes por PCR cuantitativa. Encontraron que en la EC hay 500 genes afectados y 272 en la CU. De estos genes, mientras que en un 84% estaba reprimido en la EC, en la CU solo el 42% aparecían reprimidos. Además, los genes afectados que detectan corresponden principalmente a las categorías funcionales de respuesta inmune e inflamatoria, oncogénesis y proliferación celular y estructura y permeabilidad celular.

#### **D2.2.4 Estandarización de los trabajos de microarrays.**

Uno de los problemas que surgió con el progreso tan rápido de la tecnología de microarrays, es la falta de unificación en cuanto a protocolos, metodologías y estrategias experimentales y de análisis de datos, y más importante aún, en cómo comunicar y compartir los resultados con la comunidad científica para que se cumpliera el principio fundamental de cualquier publicación científica, que consiste en aportar todos los datos, materiales y metodologías necesarias para que cualquier científico pueda reproducir y confirmar los resultados obtenidos. Ante la diversidad de protocolos y estrategias posibles en un trabajo de microarrays, surgió la necesidad urgente de crear unas normas que permitieran comprender y sobre todo, comparar los trabajos de microarrays realizados por investigadores independientes (116-119). De esta necesidad, surgieron las normas MIAME (*“minimum information About a microarray experiment”*) (120, 121), que consisten en una serie de recomendaciones sobre como comunicar trabajos de microarrays, y que incluyen pautas sobre como describir bien el chip utilizado, describir los procesos de normalización, análisis estadísticos, filtrado de genes o la necesidad de depositar los datos de cada gen en bases de datos públicas. Las recomendaciones del MIAME suponen así el primer paso en homogeneizar los trabajos de microarrays, aunque siguen siendo necesarios criterios más específicos (122) sobre que tipos de métodos de normalización, filtrado, análisis estadísticos y estrategias de análisis son los más adecuadas para este tipo de experimentos donde se manejan miles de datos.

En el presente trabajo hemos seguido las recomendaciones MIAME, incluyendo el depósito de los datos en una base de datos pública (GEO, *“Gene Expression Omnibus”*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) para asegurar que toda la información tanto del trabajo experimental como analítico esté incluida con detalle.

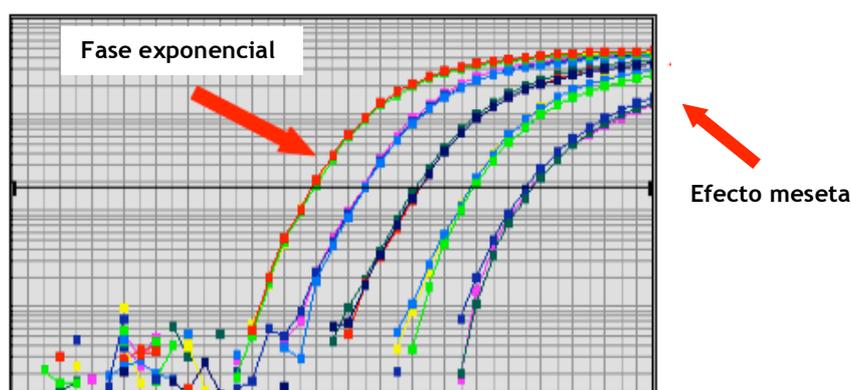
## D2.3 Postgenómica: PCR a tiempo real

Para confirmar los resultados obtenidos del análisis de microarrays se emplean técnicas independientes como northern blot, western blot o hibridación *in situ*. La más utilizada, sin embargo, es la técnica de PCR a tiempo real, ya que, gracias al desarrollo que ha experimentado esta técnica en los últimos años, permite analizar decenas o cientos de genes simultáneamente.

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (*“polymerase chain reaction”*), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Esta metodología permite producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico basándose en la actividad del enzima DNA-polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de DNA de secuencia complementaria a otra ya existente. Es una técnica muy sensible aunque su mayor inconveniente es que no es cuantitativa. Esto se ha solucionado realizando modificaciones en la técnica han dado lugar a lo que se conoce como PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa (qPCR) se caracteriza por la capacidad de monitorizar el progreso de la reacción de PCR a medida que ésta ocurre. La información, por lo tanto, va siendo recogida a lo largo del proceso de la PCR y no al final de la misma. Este concepto es el que revoluciona completamente la técnica ya que es lo que permite la cuantificación. En la qPCR, las reacciones se caracterizan por el momento en el cual el producto que está siendo amplificado comienza a detectarse y no por la cantidad de producto total que se ha sintetizado al final de la reacción. Así, mientras mayor sea el número de copias de un determinado ácido nucleico, antes será detectado en una qPCR.

### D2.3.1 PCR cuantitativa vs PCR tradicional

Una reacción de PCR tiene tres etapas: una exponencial (la cantidad de producto se duplica en cada ciclo), otra lineal (fase de gran variabilidad, los reactivos se van consumiendo y la cantidad de producto no se duplica en cada ciclo) y una fase de meseta (la reacción ha finalizado y ya no aumenta más la cantidad de producto). La PCR tradicional acaba en la fase de meseta.



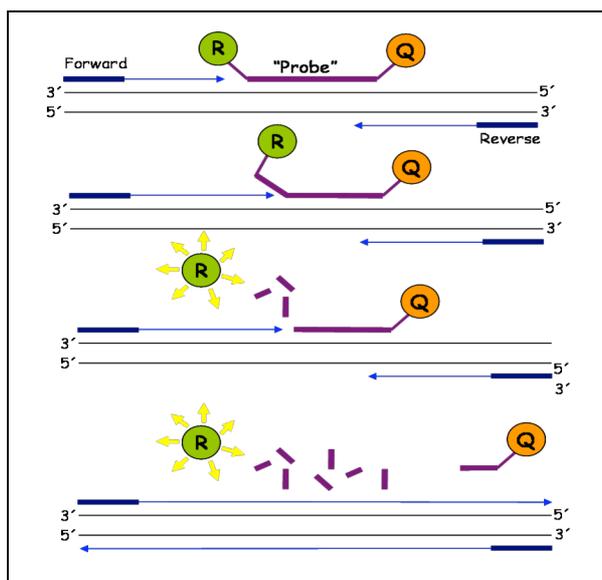
**Figura 17.** Fases exponencial y de meseta, durante el transcurso de una reacción de PCR, con diluciones seriadas de una misma muestra.

En la gráfica se representan diluciones seriadas de una misma muestra (*Figura 17*). Cada una contiene diferente cantidad de DNA de partida pero sin embargo, al final de la reacción se obtiene la misma cantidad de producto final. En este caso, el resultado que daría una PCR tradicional no reflejaría realmente la cantidad de material de partida. En cambio, si se recogen los datos en la fase exponencial, se verían claramente las diferencias. La fase exponencial es por tanto el momento óptimo para analizar los datos.

### D2.3.2 Métodos de detección

En la qPCR, los procesos de amplificación y detección se realizan de manera simultánea en el mismo tubo, sin necesidad de realizar ninguna acción posterior. Se emplean métodos de detección por fluorescencia que permiten medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Los sistemas empleados pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes, como el SYBR Green I, que se une al surco menor del DNA, y sondas específicas marcadas con fluorocromos, como las sondas TaqMan, que son las que hemos empleado en nuestro trabajo.

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (*Figura 18*). Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda hibrida con su secuencia complementaria en el DNA diana. La DNA-polimerasa de *Thermus aquaticus*, a medida que va sintetizando la cadena complementaria se va desplazando a lo largo de la misma, y gracias a su actividad 5'-exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector. A mayor fluorescencia detectada, mayor número de moléculas amplificadas.



*Figura 18. Fundamento de las sondas TaqMan.*

## D3. Bioinformática

### D3.1 Como surge la Bioinformática

Como ya indicamos previamente, el siglo XXI ha significado un cambio de rumbo en la forma de ver las diversas disciplinas que forman las llamadas Ciencias de la Vida. El enfoque reduccionista, que es el que se ha venido aplicando desde principios del siglo XX, establece una compartimentación, entre las distintas disciplinas, lo cual ha sido muy productivo en las últimas décadas. Sin embargo, el enfoque integrador del presente siglo hace imprescindible la colaboración entre distintas disciplinas, entre ellas, la Bioinformática. La Bioinformática surge por tanto, de la necesidad de manejar los miles de datos que generan las técnicas experimentales actuales y de integrar informaciones y conocimientos previos recogidos en bases de datos de genes, proteínas, genomas y organismos.

La Bioinformática, llamada también Biología Molecular Computacional, puede definirse como la disciplina científica que utiliza tecnología de la información para organizar, analizar, integrar y distribuir información de biomoléculas, con la finalidad de responder a preguntas complejas (123). Al comienzo de la revolución genómica, el concepto de la Bioinformática se refería solo a la creación y mantenimiento de bases de datos donde se almacena información biológica. Sin embargo, toda esa información debía ser combinada para formar una idea lógica sobre los procesos celulares. Por ello, la Bioinformática abarca actualmente el uso de técnicas y herramientas procedentes de tres disciplinas: la Biología Molecular, donde se originan los datos a analizar, la Computación, y el análisis matemático y estadístico de los datos mediante algoritmos.

Entre los análisis más comunes que se pueden hacer con la Bioinformática destacan:

- la obtención de secuencias de DNA o proteínas similares a la secuencia problema,
- búsqueda de motivos funcionales o estructurales en la secuencia problema y obtención de secuencias que contienen los mismos motivos,
- alineamiento múltiple de secuencias y definición de secuencias conservadas y variables,
- ensamblaje de fragmentos de DNA y creación de mapas genómicos,
- predicción de estructura y dinámica de macromoléculas,
- reconstrucción de la filogenia a partir de la comparación de secuencias de genes, proteínas o genomas,
- estudio de todos los genes y proteínas de un organismo (Genómica y Proteómica funcional).

Las bases de datos Bioinformáticas clásicas son las siguientes:

- bases de datos de nucleótidos: GeneBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>),
- bases de datos de proteínas: Entrez Proteins del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/sprot>), TrEMBL (<http://www.expasy.org/sprot>),

- bases de datos de motivos: PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>), BLOCKS (<http://www.blocks.fhcrc.org>), PRINTS (<http://www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS>),
- bases de datos de dominios: Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>), ProDom (<http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>), COG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>).

También conviene mencionar las bases de datos que recogen la información de los genomas de organismos que ya han sido secuenciados. Hasta el momento, se han secuenciado unos 663 genomas y hay en marcha más de dos mil proyectos más (<http://genomesonline.org/>). Entre ellas:

- *Homo sapiens*: Human Genome Database (<http://www.gdb.org/>)
- *Rattus norvegicus*: Rat Genome Database (<http://rgd.mcg.edu/>)
- *Mus musculus*: Mouse Genome database (<http://www.informatics.jax.org/>)
- *Macaca mulatta*: HGSC (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rmacaque/>)
- *Bombix mori*: SilkBase (<http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>)
- *Caenorhabditis elegans*: WormBase (<http://www.wormbase.org/>)
- *Drosophila melanogaster*: FlyBase (<http://flybase.org/>)
- *Trypanosoma cruzi*: TIGR database (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1/>)
- *Aspergillus oryzae*: NITE ([http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME\\_ID=ao](http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao))
- *Gallus gallus*: AvianNet (<http://www.chicken-genome.org/>)
- *Leishmania major*: SANGER ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/L\\_major/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/))

### D3.2 Herramientas bioinformáticas para el análisis de microarrays.

Un estudio de microarrays supone trabajar con varios miles de genes a la vez. El análisis de estos datos pasa por procedimientos de normalización y filtrado, selección de genes diferencialmente expresados, estrategias de agrupamientos, análisis funcionales, obtención de información detallada de genes concretos... para lo cual se necesitan diversas herramientas informáticas para cada una de las etapas informáticas. Básicamente existen dos tipos de análisis de datos de microarrays que son el “análisis supervisado” y el “análisis no supervisado”.

En el análisis no supervisado, los grupos o clases son desconocidos *a priori* y deben ser identificados a partir de los datos. Este tipo de análisis permite, por ejemplo, identificar nuevos grupos entre las muestras (“*descubrimiento de clases*”) (124, 125) o también grupos de genes con un comportamiento similar. Entre los métodos de análisis no supervisado se incluyen el análisis del componente principal -PCA (“*principal component analysis*”)-, agrupamientos jerárquicos, agrupamientos en k-medias o mapas auto-organizativos -SOMs (“*self organizing maps*”)-.

Por otra parte, el análisis supervisado requiere conocer información previa sobre los grupos experimentales (ej. sanos/enfermos) o sobre los genes (ej. categorías funcionales). En este tipo de estrategia se busca, por ejemplo, identificar que es lo que diferencia a dos clases o también, predecir a que clase pertenece una nueva muestra (“*predicción de clases*”) (125, 126).

Entre las herramientas bioinformáticas básicas, se encuentran aquellas que permiten obtener información sobre secuencias, transcritos, funciones, datos de expresión... sobre genes concretos. Si hace unos años las investigaciones se centraban en conocer una función, buscar el gen responsable y estudiar la proteína, al trabajar a escala genómica se hace imposible conocer cada uno de los genes que se están estudiando y por ello, son imprescindibles estas herramientas y bases de datos. Entre ellas destacan:

- base de datos Gene del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),
- GeneCards (<http://www.genecards.org/index.shtml>),
- Genatlas (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>),
- iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>), centrada en información sobre interacciones.

Entre las bases de datos de información de funciones encontramos:

- GeneOntology (<http://www.geneontology.org/>),
- KEGG ([www.genome.jp/kegg/pathway.html](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)), de información sobre rutas metabólicas,
- InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), base de datos de proteínas, dominios y sitios funcionales,
- PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), que aporta información sobre secuencias, funciones y estructura de proteínas,
- Biocarta (<http://www.biocarta.com/>), una base de datos de rutas de señalización,
- PharmGKB (<http://www.pharmgkb.org/>), que contiene información de relaciones entre fármacos, enfermedades y genes.

Otro tipo de herramientas son aquellas que permiten manejar, visualizar y agrupar los datos de microarrays y facilitan mucho su interpretación. Entre las más conocidas se encuentran:

- las herramientas del paquete GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/tools>), con las que, además de la normalización y procesamiento de los datos (*DNMAD*, *Expresso*), se pueden hacer agrupamientos jerárquicos (*Cluster*), agrupamientos en SOMs (*SOM* y *SOM-Tree server*) así como gráficas de visualización de los cambios de expresión (*SotaTree*),
- GEDI ([www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm](http://www.childrenshospital.org/research/ingber/GEDI/gedihome.htm)), que permite agrupar los genes según perfiles de expresión,
- SpotFire Decision Site, con los paquetes Real-Time Statminer y ArrayUnlock (<http://www.integromics.com/>),

- Osprey (<http://biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/Index>), para visualización de redes de interacciones.

El análisis funcional es un paso crucial en los experimentos de microarrays. Ante la imposibilidad de conocer las funciones de cada uno de los genes o de buscarlos uno por uno, se han creado programas que permiten hacer la clasificación funcional de miles de genes a la vez. Los más conocidos son:

- Panther Classification System ([www.panther.appliedbiosystems.com](http://www.panther.appliedbiosystems.com)),
- GoMiner (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/>),
- el conjunto de herramientas de Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/tools.cgi>),
- Ingenuity Pathways Analysis (<https://analysis.ingenuity.com>),
- DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>),
- Onto-Tools (<http://vortex.cs.wayne.edu>),
- BiNGO (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/>),
- GENECODIS (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>).

Finalmente, como ya se mencionó en el apartado D2.2.4, existen bases de datos públicas donde deben depositarse los experimentos de microarrays para poder cumplir así con las recomendaciones MIAME. Las más utilizadas son:

- Gene Expression Omnibus, GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),
- Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Muchas de las herramientas y bases de datos descritas anteriormente han sido utilizadas en el presente trabajo. Sus características y su funcionamiento se describen con más detalle en el apartado de *MÉTODOS*.

# ***MATERIALES***



# MATERIALES

## 1. Animales

Para obtener los modelos animales de inducción química empleamos ratas Wistar, suministradas por el Servicio de Animales de la Universidad de Ganada. Las jaulas con los animales se mantuvieron en una habitación termostatzada con iluminación de 8 a 20 horas y tuvieron acceso libre al agua y comida.

Para el modelo de animales modificados genéticamente se emplearon ratones C57B6/J que fueron suministrados por Charles Rives Laboratories España, S.A. Un grupo de ratones se mantuvo en condiciones convencionales (igual que en el caso anterior) mientras que otro grupo se mantuvo en condiciones SPF (“*specific pathogen free*”, libres de patógenos específicos). Consisten en animales que nacen por cesárea aséptica, es decir, que al nacer son estériles, y a los que se controla que no exista contaminación por estreptococos, neumococos, helmintos, protozoos patógenos y virus. Estos animales se mantuvieron en cajas estériles dotadas de flujo laminar y la comida y agua que recibieron fue previamente esterilizada.

## 2. Productos químicos

Los reactivos químicos generales empleados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., España), Invitrogen (Invitrogen, S.A., España), QIAGEN (Izasa, S.A., España), Panreac (Labortecnic, España), MP Biomedicals LLC, Affymetrix (Santa Clara, California), Promega (Barcelona, España), Ambion y Molecular Probes (Bionova Científica), Pierce, BioWhittaker Molecular Applications, Vector Laboratoires y Applied Biosystems.

## 3. Microarrays y kits comerciales

### Microarrays

Se emplearon los siguientes microarrays de oligonucleótidos de genoma completo:

Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, California).

Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, California).

### Kits

Limpieza del RNA:

*RNeasy MiniKit* (QIAGEN)

Obtención del cRNA marcado:

*One-Cycle cDNA Synthesis Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

*GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix, Santa Clara, California)

*GeneChip IVT Labelling Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

Control de calidad de hibridación:

*GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

Transcripción reversa:

*High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems)

PCR a tiempo real:

*TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)

## Tarjetas TaqMan

*TaqMan Low Density Array (Custom)*, formato 96a (Applied Biosystems, Inc.). Los genes incluidos en las tarjetas se detallan en el Anexo 1.

## 4. Programas informáticos y bases de datos

Paquete Microsoft Office XP (Word, Excel)

Kodak Digital Science (análisis de geles de agarosa)

GeneSpring GX v7.3 (Agilent)

dChip ([www.dchip.org](http://www.dchip.org))

BioConductor, paquete "affyPLM" ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org))

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

GeneCards (<http://www.genecards.org/index.shtml>)

NetAffx Analysis Center (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)

Ingenuity Pathways Analysis v5.0 (<https://analysis.ingenuity.com>)

Panther v6 (<https://www.panther.appliedbiosystems.com>)

DAVID 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

FatiScan (<http://fatiscan.bioinfo.cipf.es>)

GEPAS (herramienta *Tree*) (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/tools>)

PharGKB (<http://www.pharmgkb.org/>)

Spotfire DecisionSite v9.0 (Integromics S.L., Granada, España)

SDS 2.2.2 (Applied Biosystems)

## 5. Equipamientos generales

- Pipetas: Wilson (Wilson, Inc, EEUU) y Labsystems Finnpipette (Thermo Electron Corporation, EEUU).
- Material de plástico: Labortecnic (España).
- Autoclave: Selecta (Eleco, S.A., España).
- Centrifugas: Modelo Centrifuge 5415D (Eppendorf Ibérica, España)  
Modelo Microcentrifuge MC-13 (Amicon, Millipore Ibérica, España).
- Congelador de -20°C: Liebherr (España).
- Congelador de -80°C: -86°C Freezer (Forma Scientific, EEUU).
- Lector de placas: EMS Reader MF (Labsystems, GMI Inc., EEUU).
- Sistema de obtención de imágenes: *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak, España).
- Transiluminador ultravioleta: New Brunswick Scientific, EEUU).
- Termobloque: Thermomixer 5436 (Eppendorf Ibérica).
- Agitador magnético: Asincro (Selecta).
- Espectrofotómetro: DU-70 Spectrophotometer (Beckman Coulter, S.A., España).
- Vortex: Press-to-mix 34524 (Snijders, Holanda).
- Cámara fría: SIFSA, España.
- Medidor de pH: Crison microPH2000 (Crison Instruments, S.A., España).
- Fuente de electroforesis: Model 250 EX (Gibco, Invitrogen).
- Cubeta de electroforesis: Horizon 58 (Gibco, Invitrogen).
- Homogeneizador automático: Polytron T25 Basic (IKA Labortecnic, Alemania).
- Horno de hibridación: GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix, Santa Clara, California).
- Estación de lavado (Fluidics Station 400, Affymetrix)
- Escáner: Affymetrix geneChip Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, California).
- AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)
- Centrifuga de tarjetas Sorvall (Kendro Scientific)
- Selladora de tarjetas TaqMan LDA Stylus Staker (Applied Biosystems)



# *M*ETODOS



## MÉTODOS

### 1. Diseño experimental de los modelos animales de inflamación intestinal

Para los modelos de inducción química partimos de 108 ratas Wistar que fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos diferentes: grupo DSS (n=72), grupo TNBS (n=24) y grupo control (n=12).

Para el modelo de ratones knockout  $IL10^{-/-}$  se emplearon 54 ratones de la cepa C3H/HeJBir divididos en tres grupos: grupo KO (ratones knockout  $IL10^{-/-}$  mantenidos en condiciones normales, n=30), grupo KO-SPF (ratones *knockout*  $IL10^{-/-}$  mantenidos en condiciones SPF, n=15) y grupo control (ratones “wild type”, n=9).

#### 1.1 Inducción de la colitis con sulfato de dextrano sódico

##### Procedimiento

El DSS fue administrado al grupo DSS en el agua de bebida a una concentración del 5% durante 7 días y se redujo al 2%, debido a la elevada mortalidad que presentaban, desde el día 7 al 15. El DSS se retiró y los animales no recibieron el tóxico en los días del 15 al 23, para permitir durante este periodo la recuperación de la colitis. El grupo control solo recibió agua. Los animales se sacrificaron cada dos días empezando el día 1 y terminando el 23.

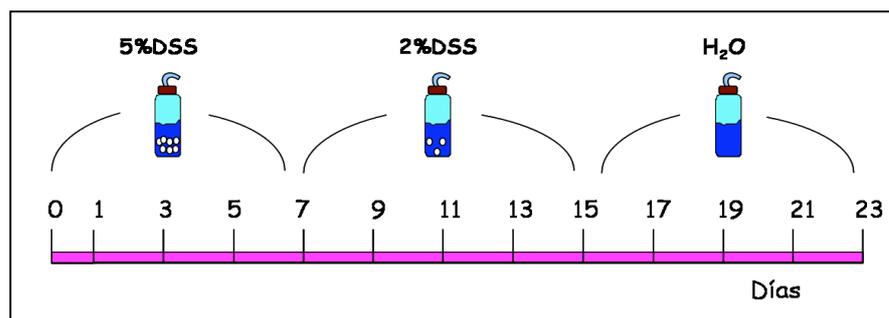


Figura 19. Diseño experimental del modelo de DSS

##### Materiales

Sulfato de dextrano sódico (MP Biomedicals, LLC)

#### 1.2 Inducción de la colitis con ácido trinitrobencenosulfónico

##### Procedimiento

Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche previa y se anestesiaron con halotano. Al grupo TNBS se le administró 10mg de TNBS disuelto en 0,25 ml de etanol al 50% empleando una cánula de

teflón insertada 8 cm a través del ano. Las ratas se mantuvieron bocabajo durante 30 segundos y posteriormente se devolvieron a las jaulas. El grupo control recibió un enema de solución salina.

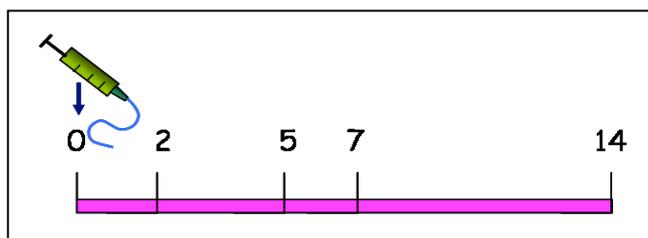


Figura 20. Diseño experimental del modelo de TNBS

### Materiales

Halotano (SIGMA)

Ácido trinitrobencenosulfónico (SIGMA)

Etanol (Panreac)

Cánula de teflón

Solución salina

### 1.3 Colitis en ratones *knockout* IL10<sup>-/-</sup>

#### Procedimiento

Este modelo de inflamación intestinal consiste en emplear ratones que desarrollan la colitis de manera espontánea, sin necesidad de administrar ningún tóxico de manera exógena, como ocurría en los dos modelos anteriores. Tras adquirir los animales, se tomaron muestras a las 7, 9 y 12 semanas.

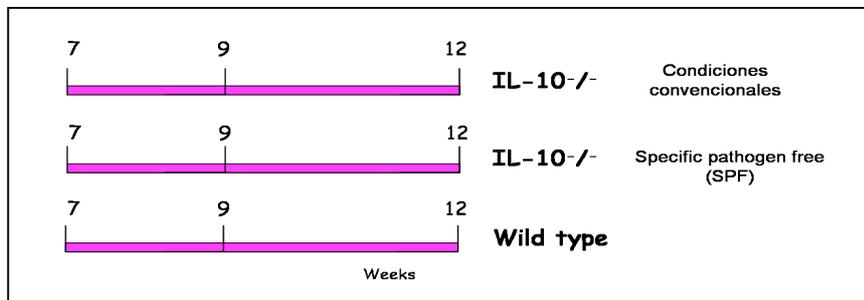


Figura 21. Diseño experimental del modelo de IL10<sup>-/-</sup>. El grupo control (wild type) se mantuvo en condiciones convencionales.

## 2. Recogida de muestras de colon

#### Procedimiento

En los tres modelos los animales se sacrificaron mediante decapitación y se les extrajo el colon completo. Se tomaron muestras de los animales en cada uno de los tiempos indicados en cada modelo.

Sobre una superficie fría se limpiaron de tejido graso y mesenterio y se determinó el peso y la longitud de los mismos. Posteriormente, se abrieron longitudinalmente con un bisturí para determinar el daño macroscópico. Las muestras para el análisis genómico se obtuvieron de la parte distal del colon evitando áreas de necrosis. El colon se dividió en varias tiras longitudinales que se emplearon para la extracción del RNA y para determinaciones bioquímicas. Los fragmentos de intestino se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

### Materiales

Material de disección (bisturí, pinzas, tijeras)

Balanza de precisión (PACISA)

## 3. Seguimiento de la colitis y selección de las muestras

### 3.1 Seguimiento macroscópico de la inflamación

Durante la inducción de los modelos se observaron los signos de daño intestinal como la presencia de sangre en heces, el peso de los animales y diarrea. Durante la recogida de las muestras se tomaron datos de peso y longitud del colon, presencia de sangre en el intestino, presencia de áreas de necrosis y cicatrices.

### 3.2 Medida de la actividad mieloperoxidasa

#### Procedimiento

La mieloperoxidasa (MPO) es el principal componente de los gránulos de los neutrófilos. Es un enzima con actividad microbicida y se libera durante la inflamación, por ello se emplea como marcador de infiltración de neutrófilos. Para determinar la actividad de este enzima en las muestras de colon se empleó el método descrito por Krawitz (127). Este método se basa en la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno por la MPO en presencia de *o*-dianisidina.



Las muestras se homogeneizaron en tampón HTAB en un homogeneizador automático. Luego se congelaron (-20°C) y descongelaron lentamente, 3 veces y a continuación se sonicaron 10 segundos en un sonicador de baño. Se prepararon diluciones seriadas 1:2 del tampón de peroxidasa en tampón de homogenización:

Dilución	Actividad (mU/50 µl)
----------	----------------------

1	2500
2	1250
3	625
4	312.5
5	156.3
6	78.1
7	39.1
8	19.5
9	9.8
10	4.9

Las muestras se centrifugaron a 7000xg, 10 minutos a 4°C. En una placa microtiter se añadieron 50 µl de cada dilución de tampón de peroxidasa (para hacer la recta patrón), 50 µl de tampón de homogenización (blancos) y 50 µl de cada muestra. Finalmente se añadieron 150 µl de tampón de reacción y se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm en un lector de placas ajustado a 37°C.

### **Materiales**

Tampón de homogenización: HTAB (Sigma) 0.5% en tampón fosfato sódico 50 mM

Tampón de reacción (extemporáneo): tampón fosfato sódico 50 mM pH=6, 0,167 mg/ml de o-dianisidina·HCl, 0,06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Patrón de peroxidasa: peroxidasa de rábano (Sigma) (5 UI/50 µl)

Homogenizador automático RZR1 Heidolph

Sonicador de baño

Lector de placas Fluoroscan Ascent FL (Labsystems)

### **3.3 Selección de las muestras para el análisis genómico**

En función de los marcadores de inflamación estudiados en cada modelo se seleccionaron tres réplicas de cada uno de los tiempos indicados:

- días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23, en el modelo de DSS.
- días 2, 5, 7 y 14, en el modelo de TNBS.
- semanas 7, 9 y 12 en el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup>.

Como controles se emplearon:

- 6 réplicas de ratas controles, en los modelos de DSS y TNBS
- tres réplicas de cada tiempo de ratones WT mantenidos en condiciones convencionales.

## 4. Extracción y preparación de las muestras de RNA

La extracción del RNA para el análisis de microarrays y PCR a tiempo real se realizó siguiendo los siguientes protocolos. La limpieza del RNA (ver apartado 4.5) se realizó solo en las muestras empleadas para el estudio de microarrays.

### 4.1 Tratamiento del material con DEPC

#### Procedimiento

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas muy estables que degradan el RNA. Son muy difíciles de inactivar e incluso cantidades muy pequeñas pueden destruir las muestras de RNA, por ello, todo el material de plástico o vidrio, así como las soluciones a emplear cuando se trabaja con RNA deben ser tratadas con DEPC (dietil pirocarbonato). El DEPC es un inhibidor de RNAsas que inactiva estas enzimas por modificación covalente. El material de plástico (puntas de pipetas, tubos eppendorf...) y de vidrio se tratan incubándolos en una solución al 0,1% de DEPC durante 12 horas en agitación. El agua o las soluciones se tratan añadiéndoles el DEPC a una concentración del 0,1% incubándolas igualmente 12 horas. Tras ese tiempo, se esterilizan en autoclave (121°C, 30 minutos) dos veces para inactivar el DEPC.

#### Materiales

DEPC (Sigma-Aldrich)

Agitador magnético (Selecta)

Autoclave (Selecta)

### 4.2 Extracción del RNA

#### Procedimiento

Para la extracción del RNA se empleó el método del Trizol siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se tomaron muestras de 50-100 mg de tejido y se homogeneizaron en 800µl de Trizol® empleando un polytron. Se mantuvieron 5 min a temperatura ambiente y a continuación se añadieron 160µl de cloroformo. Tras incubación durante 3 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 4°C a 12.000xg para conseguir la separación de dos fases. Tras transferir la fase acuosa (superior) a tubos limpios, se añadieron 400µl de isopropanol, se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 10 min a 4°C a 12.000xg. Posteriormente se eliminan los sobrenadantes y se añadieron 800µl de etanol al 70%, para volver a centrifugar 5 min a 4°C a 7.600xg. Con ayuda de una pipeta, se eliminó totalmente el sobrenadante de los tubos y se dejaron secar 5 min a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se resuspendieron en agua tratada con DEPC, se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C.

**Materiales**

Trizol® (Invitrogen)  
Polytron T25 basic (IKA Labortechnik)  
Cloroformo (Sigma-Aldrich)  
Alcohol isopropílico (Panreac)  
Etanol (Panreac)  
H<sub>2</sub>O-DEPC  
Microcentrífuga (Eppendorf)

**4.3 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA****Procedimiento**

La cuantificación del RNA se realizó empleando un método espectrofotométrico que consiste en medir la absorbancia (A) a 260nm, dado que una unidad de absorbancia a esa longitud de onda equivale a 40µg/ml de RNA, usando una cubeta de cuarzo de 1cm de ancho. En la cuantificación de las muestras se empleó 1µl de RNA diluido en 600µl de solución TE pH 7,4. Para determinar la pureza del RNA extraído se midió además la absorbancia a 280nm y se calculó la relación A260/A280. Valores comprendidos entre 1,9 y 2,1 indican una buena pureza. Si dicho valor es menor, es indicativo de contaminación por proteínas.

**Materiales**

Solución TE pH 7,4 (Tris-base 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4)  
Cubeta de cuarzo (Hellma)  
Espectrofotómetro Beckman DU-70

**4.4 Visualización de la integridad del RNA****Procedimiento**

Para comprobar la integridad del RNA extraído es recomendable realizar una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,8% y verificar que la relación de intensidad de las subunidades ribosómicas es de 2:1 entre la 28S y la 18S. Para ello, realizamos una electroforesis de todas las muestras de RNA cargando en el gel 1µl del RNA extraído. Una vez finalizada la electroforesis se tiñó el RNA con bromuro de etidio y se visualizó en una lámpara de luz ultravioleta.

**Materiales**

Agarosa Seakem LE (Cambrex)  
Solución TAE (Tris-base 40mM, ácido acético 20mM, 1mM EDTA, pH 8.3)  
Cubeta de electroforesis Horizon 58 (Life Technologies)  
Bromuro de etidio (SIGMA)

## 4.5 Limpieza del RNA

### Procedimiento

Para limpiar completamente las muestras de RNA y eliminar DNA y otros contaminantes, se emplearon las columnas “*RNeasy MiniKit* de QIAGEN”. Para ello se siguió el siguiente protocolo: se tomaron 50µg de RNA de cada muestra y se ajustó el volumen a 100µl con agua libre de RNAsas. Se añadieron 350µl de solución RLT (al que previamente se le añadió la cantidad correspondiente de β-mercaptoetanol) y se mezcló bien. Se añadieron 250µl de etanol puro y se mezcló bien con ayuda de la pipeta. A continuación se cargaron los 700µl sobre la columna, se centrifugó a 800xg durante 15 segundos y se colocó la columna sobre un tubo nuevo. Se añadieron 500µl de solución RPE y se centrifugó 15 segundos a 8000xg. Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se repitió este último paso, añadiendo otros 500µl de RPE y centrifugando esta vez durante 2 minutos. Se pasó la columna a un tubo nuevo y se centrifugó durante un minuto a velocidad máxima. Finalmente se puso la columna en un tubo de 1,5ml, se añadió 45µl de agua libre de RNAsas y se centrifugó 1 minuto a 8000xg.

Tras la limpieza, se realizó de nuevo la cuantificación, visualización y comprobación de la integridad de todas las muestras de RNA.

### Materiales

H<sub>2</sub>O bidestilada tratada con DEPC

*RNeasy MiniKit* (QIAGEN)

Etanol (Panreac)

Microcentrífuga (Eppendorf)

## 4.6 Envío de las muestras

Las muestras se enviaron congeladas por mensajería urgente, en caja de poliespam con nieve carbónica. Para el análisis genómico, se enviaron a Progenika Biopharma (Bilbao, España) y para el análisis de qPCR se enviaron a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid.

# 5. Análisis genómico

## 5.1 Microarrays

Los microarrays se adquirieron a través de Progenika Biopharma (Bilbao). Los formatos empleados, todos de Affymetrix (Santa Clara, California), son los siguientes: Rat Genome 230 2.0, Mouse Genome 430 2.0. Los dos son microarrays de oligonucleótidos y en ellos están representados los genomas completos de rata y ratón respectivamente. EL chip de rata incluye 31.099 secuencias o sondas que representan aproximadamente 28.000 genes caracterizados en rata. El chip de ratón está compuesto por 45.101

secuencias y representan unos 34.000 genes caracterizados en ratón. En los chips de Affymetrix, lo que llamamos secuencias o sondas, es en realidad un conjunto de 11 pares de oligonucleótidos que representan a un determinado gen, es decir, que realmente son sets de sondas o “probe sets”. Por ejemplo, el set de sondas 1371241\_at corresponde al gen Tpm1 en el chip de rata. También hay que tener en cuenta que, por ejemplo en el caso del chip de rata, las 31.099 secuencias o sets de sondas no son exactamente 31.099 genes, ya que pueden existir varias secuencias que representen al mismo gen. Por ejemplo, las sondas 1368798\_at, 1370498\_at, 1377335\_at y 1393031\_at representan todas al gen Abo. Además, pueden existir secuencias que representen a genes diferentes o a varios genes de una misma familia, lo cual viene identificado por el tipo de sufijo de la sonda. En la siguiente tabla se indican los diferentes sufijos que pueden aparecer:

*Tabla 3. Significado de los sufijos de los nombres de las sondas*

Sufijo	Descripción
_at	Set de sondas correspondiente a un transcrito
_a_at	Set de sondas que hibridan con genes de una misma familia
_s_at	Set de sondas correspondientes a dos o más genes (comparten todas las sondas del set). Pueden representar formas más cortas de transcritos, formas de splicing alternativo o transcritos con alto grado de homología.
_x_at	Set de sondas que comparte algunas sondas con dos o más genes.

Por ello, en el texto de este trabajo no hablaremos de genes, sino de sondas o secuencias, refiriéndonos con dichos términos a cada identificador de Affymetrix, como por ejemplo 1371240\_at. También hay que destacar que no todas las sondas que se incluyen en el chip corresponden a genes conocidos. Esos genes, a medida que se van descubriendo, se van incorporando a la base de datos de Affymetrix. De esa forma, hemos ido re-annotando periódicamente las sondas de los chips para actualizarlas con las últimas anotaciones, empleando para ello la herramienta “Batch Query” del *NetAffx Analysis Center* (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). En este trabajo se han utilizado las anotaciones más actuales disponibles hasta el momento: anotación del 8 de Marzo de 2007, para el chip de rata, y anotación del 11 de Julio de 2007, para el chip de ratón. También es importante tener en cuenta que los identificadores de Affymetrix para un mismo gen son diferentes en cada organismo. Por ejemplo, el gen Ptgs2 se identifica con el número 1368527\_at en el chip de rata, mientras que en el de ratón se identifica como 1417262\_at. Este es un aspecto fundamental en los análisis de comparación de los modelos empleados, ya que están realizados en organismos diferentes. Para poder compararlos se buscaron los ortólogos en rata (herramienta “Batch Query” del *NetAffx Analysis Center*) de los genes de ratón y se reanotaron con los identificadores de esos mismos genes que se emplean en el chip de rata.

En todos los pasos que se detallan a continuación se siguieron los protocolos recomendados por Affymetrix recogidos en el manual “*GeneChip® Expression Analysis, Technical manual*”

(<http://www.affymetrix.com/support/index.affx>). Todos los procedimientos incluidos desde el apartado 5.2 hasta el 5.7 fueron realizados en Progenika Biopharma.

## 5.2 Obtención del cRNA marcado con biotina

El RNA extraído de los tejidos contiene una mezcla de diferentes RNA. Para el estudio de la expresión génica lo que interesa es el RNA mensajero, con lo que primero se transforma el RNA a cDNA empleando cebadores oligo-(dT). El cDNA es luego transformado a cRNA empleando nucleótidos marcados con biotina, obteniéndose así el cRNA marcado.

### 5.2.1 Síntesis del cDNA

A partir del RNA, ya purificado con las columnas de QIAGEN, se sintetizó el cDNA empleando el kit “*One-Cycle cDNA Synthesis Kit*” partiendo de 5µg de cada muestra. Para ello, a cada muestra se le añadieron 2µl de RNA poly-A de los controles *spike in*, 2µl de cebadores T7-oligo(dT) y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 11µl. Las muestras se incubaron 10 minutos a 70°C y posteriormente, 2 minutos a 4°C. A continuación se añadieron 7µl de la mezcla “*First-Strand Master Mix*” y se incubaron a 42°C durante 2 minutos. Posteriormente se añadió 1µl del enzima SuperScript II a cada muestra, se incubaron a 42°C durante 1 hora y a 4°C durante 2 minutos. Una vez enfriadas las muestras, se les añadieron 130µl de la mezcla “*Second-Strand Master Mix*” y se incubaron 2 horas a 16°C. Se añadieron 2µl de DNA-polimerasa de T4 y se mantuvieron 5 minutos a 16°C. Pasado este tiempo se añadieron 10µl de EDTA para finalizar la reacción.

### 5.2.2 Limpieza del cDNA

El cDNA de doble cadena obtenido en el paso anterior se limpió usando el kit “*GeneChip Sample Cleanup Module*”. Para ello, se añadieron a las muestras de cDNA 600µl de tampón de unión. De esta mezcla se transfirieron 500µl sobre una columna y se centrifugó a 8000xg durante 1 minuto. Este paso se repitió cargando en la columna el resto de la muestra. Tras descartar el sobrenadante, la columna se pasó a un tubo nuevo y se le añadieron 750µl de tampón de lavado. Tras centrifugar 1 minuto a 8000xg, se descartó el líquido eluido. Para secar la columna se volvieron a centrifugar 5 minutos a velocidad máxima. Finalmente se colocaron las columnas sobre tubos de 1,5 ml y se añadieron 14µl de tampón de elución, se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente a velocidad máxima durante 1 minuto.

### 5.2.3 Síntesis del cRNA y marcaje con biotina

Este proceso se llevó a cabo con el kit “*GeneChip IVT Labelling Kit*”. Al cDNA limpio se le añadieron: 4 µl de tampón de unión 10X, 12 µl de mezcla NTP, 4 µl de mezcla enzimática y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas hasta un volumen final de 40 µl. Las muestras se incubaron a 37°C durante 16 horas y finalmente se volvieron a purificar empleando el kit anterior (*GeneChip Sample Cleanup Module*). Este cRNA se cuantificó empleando la técnica espectrofotométrica descrita en el apartado 4.2 de *Métodos*.

### 5.2.4 Fragmentación del cRNA

La fragmentación del cRNA como paso previo a la hibridación con los GeneChips® de Affymetrix resulta fundamental para que la sensibilidad de la técnica sea óptima. El protocolo se basa en una reacción de hidrólisis inducida por metales y está optimizado para obtener fragmentos de entre 35 y 200 bases. Al cRNA marcado se le añadió el tampón de fragmentación (incluido en el kit “*GeneChip Sample Cleanup Module*”) y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas hasta un volumen final de 40 µl. Las muestras se incubaron a 94°C durante 35 minutos y se congelaron a -20°C hasta el momento de la hibridación con los chips.

#### Materiales

*One-Cycle cDNA Synthesis Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

*First-Strand Master Mix*: 4µl de tampón 5X, 2µl DTT 0,1 M, 1µl dNTP 10mM

*Second-Strand Master Mix*: 30µl tampón 5X, 3µl dNTP 10mM, 1µl DNA-ligasa de E. Coli, 1µl DNA-polimerasa de E. Coli, 1µl RNasa H, 91µl H<sub>2</sub>O libre de RNAsas

*GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix, Santa Clara, California)

*GeneChip IVT Labelling Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

### 5.3 Hibridación con los chips

Tras fragmentar el cRNA se prepararon las mezclas de hibridación: 0.05µg/µl cRNA fragmentado; 50pM de oligo control B2; 1,5 , 5, 25 y 100 pM de los controles bioB, bioC, bioD y cre respectivamente; 0.1 mg/ml de DNA de esperma de arenque; 0,5mg/ml de BSA; tampón de hibridación 1X; 10% de DMSO. Se calentaron a 99°C durante 5 minutos. Durante este tiempo, se humedecieron los chips con tampón de hibridación 1X y se incubaron a 45°C durante 10 minutos. El cóctel de hibridación incubado a 99°C se transfirió a un termobloque a 45°C durante 5 minutos, se aplicó sobre el chip y se colocaron en un horno de hibridación a 45°C durante 16 horas.

#### Materiales

BSA 50mg/ml (Invitrogen)

DNA de esperma de arenque (Promega)

*GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit* (Affymetrix, Santa Clara, California)

Oligo Control B2 (Affymetrix, Santa Clara, California)

NaCl 5M, libre de RNAsas (Ambion)

MES, hidratado Sigma-Ultra (Sigma-Aldrich)

MES, sal sódica (Sigma-Aldrich)

EDTA 0,5M (Sigma-Aldrich)

DMSO (Sigma-Aldrich)

Tween-20 10% (Pierce)

Tampón de hibridación 1X: MES 100 mM, [Na<sup>+</sup>] 1M, EDTA 20mM, Tween-20 0,01%.

Horno de hibridación “GeneChip Hybridization Oven 640”

Termobloque

## 5.4 Lavado, tinción y escaneado

### 5.4.1 Lavado y tinción

Tras el proceso de hibridación, el lavado de los chips es fundamental para eliminar el RNA que no haya hibridado con las sondas del chip. Los siguientes pasos se realizaron en una estación de lavado. Después de 16 horas de hibridación, se eliminó el cóctel de hibridación y se realizó un primer lavado con “tampón de lavado A” a 25°C y un segundo lavado con “tampón de lavado B” a 50°C. El primer paso de tinción se realizó con “solución SAPE” (la cual contiene la estreptavidina-ficoeritrina, que se une a la biotina del cRNA marcado) a 25°C durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con tampón de lavado A a 25°C. La segunda tinción se realizó con la “solución de anticuerpos” durante 10 minutos a la misma temperatura, al igual que la última tinción, esta vez con solución SAPE. Finalmente, los chips se lavaron con tampón de lavado A a 30°C.

### 5.4.2 Escaneado

Tras lavar los chips, se eliminó el exceso de líquido de los mismos y se introdujeron en el escáner para obtener la imagen. Tras este paso, se obtuvieron los valores de intensidad en todas las muestras para cada una de las sondas que contienen los chips (31.099 en el chip de rata y 45.101 en el de ratón).

#### Materiales

Tampón de lavado A: SSPE 6X, Tween-20 0,01%

Tampón de lavado B: MES 100mM, [Na+] 0.1M, Tween-20 0,01%

Solución SAPE: MES 100mM, [Na+] 1M, Tween-20 0,05%, BSA 2mg/ml, estreptavidina-ficoeritrina 10 µg/ml

Solución de anticuerpos: MES 100 mM, [Na+] 1 M, Tween-20 0,05%, BSA 2 mg/ml, anticuerpo IgG Goat 0,1 mg/ml, anticuerpo biotinilado 3 µg/ml

BSA 50mg/ml (Invitrogen)

R-Ficoeritrina-Estreptavidina (Molecular probes)

NaCl 5M, libre de RNAsas (Ambion)

PBS pH 7,2 (Invitrogen)

20X SSPE: NaCl 3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, EDTA 0,02 M (BioWhittaker Molecular Applications)

Goat IgG (Sigma-Aldrich)

Anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Vector Laboratories)

Tween-20 10% (Pierce)

Estación de lavado (*Fluidics Station 400*, Affymetrix)

Escaner “*Affymetrix geneChip Scanner 3000*”

## 5.5 Controles de calidad

### 5.5.1 Genes domésticos

Los controles de genes domésticos o *housekeeping* son sondas para genes que se expresan constitutivamente en todos los tipos de tejidos. Los chips incluyen sondas correspondientes a las zonas 3', 5' y central de estos genes. La relación entre las señales de hibridación para las sondas 3' respecto de las 5' indica la integridad de los cRNAs sintetizados, siendo ésta reflejo de la calidad del RNA original utilizado para la síntesis. Así, una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica integridad total del RNA y cRNA sintetizado. En función del órgano de procedencia de la muestra y del tratamiento aplicado, y dado que las condiciones no siempre son las ideales, es difícil obtener un cRNA totalmente íntegro, por lo que el criterio para considerar un experimento satisfactorio, siguiendo las recomendaciones de Affymetrix, es que la relación 3'/5' no debe superar un valor de 3. Por otra parte, el carácter constitutivo de los genes representados como *housekeeping* no siempre se cumple para todo tipo de condiciones experimentales, tal y como está ampliamente reflejado en la literatura. Así, entre los genes representados en el chip, el que más frecuentemente se comporta como verdadero *housekeeping* es GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Este análisis se realizó con el programa GeneSpring.

### 5.5.2 Controles *spike*

Los controles *spike* son controles positivos exógenos que sirven para monitorizar los procesos de marcaje, hibridación, revelado y escaneado. La presencia de estos controles indica que dichos procesos han resultado correctos. Los chips contienen sets de sondas de varios genes de *Bacillus subtilis*. Cuando se va a realizar la síntesis y marcaje del cRNA, a cada muestra se le añade una cantidad de mRNA de dichos genes bacterianos, los cuales se amplifican, se marcan e hibridan a la vez que el RNA de la muestra problema. Si los valores de intensidad que presentan esos genes son correctos, significa que los procedimientos se han realizado bien. Los controles *spike* utilizados son: *bioB*, *bioC*, *bioD* y *cre*, y se analizaron con GeneSpring. El control *bioB* es el menos representado en la mezcla, por lo que es el que principalmente se utiliza para valorar la sensibilidad del experimento.

### 5.5.3 P call %

Este parámetro de calidad indica el porcentaje de sondas denominadas "presentes" en cada array. Este valor se utiliza para confirmar la calidad de los experimentos.

### 5.5.4 Array Outlier %

Indica el porcentaje de sets de sondas de un array inconsistentes con los patrones que siguen los mismos sets de sondas en el resto de los chips del experimento. EL programa utilizado, dChip, recomienda tomar con precaución aquellas muestras que superan un valor de 5% y eliminar aquellas que superen el 15%. Un porcentaje elevado puede ser indicativo de una imagen potencialmente contaminada,

principalmente por rastros de burbujas, arañazos o un problema en la preparación o hibridación de la muestra.

### 5.5.5 Gráficas NUSE

Estas gráficas se generaron empleando el paquete BioConductor “affyPLM”, el cual permite ajustar a los chips un modelo lineal robusto que incluye información de sondas y chips. Mediante el ajuste de este modelo se obtiene información acerca de los errores estándar de cada sonda y acerca de los valores de expresión de un “pseudochip” modelado con valores de la mediana. De la misma manera que en los arrays outliers, se deben tomar con precaución aquellas muestras que superen el límite arbitrariamente establecido de 1,05 o 0,95 (5%) y eliminar aquellas muestras que superen el valor de 1,15 o 0,85 (15%).

#### Software

GeneSpring GX v7.3 (Agilent)

dChip ([www.dchip.org](http://www.dchip.org))

BioConductor, paquete “affyPLM” ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org))

## 5.6 Normalización de los datos

### Procedimiento

Para medir la expresión génica de forma precisa y fiable, es importante tener en cuenta la variabilidad experimental y sistemática que puede asociarse a un experimento de estas características. El término normalización hace referencia al proceso llevado a cabo para minimizar dicha variación. Así pueden distinguirse más fácilmente las diferencias biológicas. La normalización es por tanto un paso imprescindible antes de realizar cualquier análisis para asegurar que las diferencias en los valores de intensidad son realmente debidas a diferencias en la expresión y no a variaciones en la eficiencia de hibridación, escaneado, lavados...

Una vez analizados los controles de calidad descritos anteriormente, y considerarlos satisfactorios, se procedió a la normalización de los datos, que se realizó con el programa Bioconductor, empleando el paquete “affyPLM”, a partir de los datos de intensidad obtenidos tras escanear los chips.

Con los datos de intensidad normalizados se obtuvieron los valores de cambio de expresión o “*fold change*” (FC) para cada sonda en cada una de las muestras calculando el  $\log_2$  del ratio (media intensidad réplicas día X / media intensidad controles). En los modelos de DSS y TNBS, los controles fueron 6 réplicas de animales sanos. Para el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup> el FC se calculó en cada uno de los tres tiempos (7, 9 y 12 semanas) empleando tres animales control (“*wild type*”) tomados a esos mismos tiempos, es decir, que cada tiempo posee sus propios controles. Se utilizó el programa Spotfire Decision Site.

## Software

Bioconductor, paquete “affyPLM” (www.bioconductor.org)

Spotfire Decision Site v9.0 (Integromics S.L., Granada, España)

## 5.7 Análisis de agrupamientos

Se han realizado dos tipos de agrupamientos: agrupamiento de muestras y agrupamiento de genes, ambos con el programa Spotfire Decision Site. En el primero de ellos, las muestras se agruparon en *clusters* jerárquicos, aplicando distancia Euclídea como criterio de similitud, aplicando normalización por *Z-score* para ajustar la escala y empleando la media de los FC de las tres réplicas de cada tiempo. En color verde se representan las sondas cuya expresión es menor que en los controles (reprimidos) y en rojo aquellas que presentan una expresión mayor que los animales sanos (sobreexpresados).

Para el agrupamiento de genes según perfiles temporales de expresión se aplicó un agrupamiento en k-medias (“*k-means*”) con distancia Euclídea como medida de similitud.

## Software

Spotfire Decision Site v9.0 (Integromics S.L., Granada, España)

## 5.8 Análisis funcional 1: “*functional enrichment*”

Una vez realizado el filtrado y análisis estadístico de los datos de expresión se obtienen listados de genes que aparecen alterados (sobreexpresados o reprimidos) de manera significativa en distintas comparaciones. El paso siguiente consiste en traducir esos miles de datos en información biológica que permita interpretar los fenómenos que están ocurriendo en la enfermedad o condición estudiada. Existen numerosas fuentes bibliográficas y bases de datos públicas con información sobre genes, pero esta estrategia es totalmente inviable cuando se trata de analizar miles de genes. Por ello, existen programas bioinformáticos que permiten clasificarlos por funciones, rutas de señalización o funciones moleculares en las que intervienen. Este tipo de análisis se conoce como “*functional enrichment*” y consiste en la clasificación de un listado de genes previamente seleccionados en función de umbrales de corte de p-value, FC o ambos. Para ello, en primer lugar empleamos el programa **Panther**, de acceso abierto, que clasifica los genes según procesos biológicos, rutas y funciones moleculares (128). Su funcionamiento (Figura 22) consiste en seguir tres pasos: 1) introducir el listado de genes a clasificar (se introdujeron los símbolos de los genes), 2) seleccionar la lista de referencia con la que se quiere comparar (*Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*...), 3) seleccionar el criterio de clasificación (rutas, proceso biológico o función molecular).

**A**

**PANTHER - Compare Lists - Microsoft Internet Explorer**

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Dirección <http://www.pantherdb.org/tools/compareToRefListForm.jsp>

**PANTHER**  
Classification System

Home Browse Genes Families and HMMs Pathways Ontologies **Tools** Workspace

Expression Analysis | HMM scoring | cSNP analysis | Downloads |

**Compare Classifications of Lists**

Map lists of genes to a PANTHER ontology. For pathways, you can then view the gene expression values overlaid on top of a pathway diagram, where genes will be colored differently for different clusters of genes.

Use the binomial statistics tool to compare classifications of multiple clusters of lists to a reference list to statistically determine over- or under- representation of PANTHER classification categories. Each list is compared to the reference list using the binomial test (Chao & Campbell, [TIGS 2000](#)) for each molecular function, biological process, or pathway term in PANTHER.

**Steps:**

1. Select list(s) to analyze
2. Select reference list

**1. Select Lists to Compare to a Reference List**

For example, each selected list may be a cluster of co-expressed genes under a particular set of conditions.

selected: Lista sig 5 Symbol.txt

**2. Select Reference List**

For example, the reference list may be the set of all genes in the experiment, or the set of all genes in the genome being analyzed.

selected: NCBI: R. norvegicus genes

**Search options**

PANTHER Ontology:

- Pathways
- Biological Process
- Molecular Function

Use the Bonferroni correction for multiple testing

**B**

**PANTHER - Compare lists to reference list - Microsoft Internet Explorer**

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Dirección <http://www.pantherdb.org/tools/compareToRefList.jsp>

**PANTHER**  
Classification System

Home Browse Genes Families and HMMs Pathways Ontologies **Tools** Workspace

Expression Analysis | HMM scoring | cSNP analysis | Downloads |

**Results**

Colors for viewing genes in pathway diagrams:  
Lista sig 5 Symbol.txt:

gray: components only in the reference list

Click on pathway name to see genes highlighted on pathway diagram

View: -- Please select a chart to display --

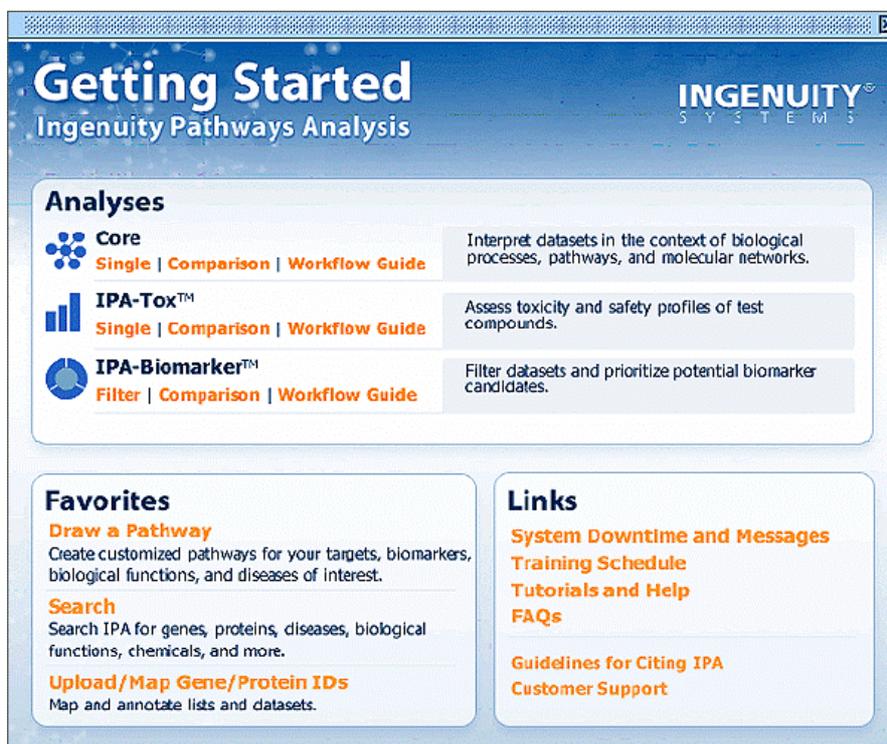
	NCBI: R. norvegicus genes (REF)	Lista sig 5 Symbol.txt		
	#	#	expected	+/- Δ P value
Unclassified	23307	2862	3100.43	- 6.48E-31
<a href="#">Integrin signalling pathway</a>	238	81	31.66	+ 1.71E-11
<a href="#">Ras Pathway</a>	91	44	12.11	+ 1.54E-10
<a href="#">Angiogenesis</a>	222	73	29.53	+ 1.26E-09
<a href="#">T cell activation</a>	117	49	15.56	+ 1.28E-09
<a href="#">PDGF signaling pathway</a>	178	63	23.68	+ 1.79E-09
<a href="#">Parkinson disease</a>	118	47	15.70	+ 1.70E-08
<a href="#">EGF receptor signaling pathway</a>	145	53	19.29	+ 2.39E-08
<a href="#">Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway</a>	318	89	42.30	+ 2.74E-08
<a href="#">Huntington disease</a>	173	57	23.01	+ 2.10E-07

Summary Table:

	Reference list	Lista sig 5 Symbol.txt
Mapped IDs:	26213	3487
Unmapped IDs:	0	901

**Figura 22.** Análisis con el programa Panther. A) Pasos a seguir para realizar el análisis funcional. B) Ejemplo de clasificación de una lista de genes según rutas.

El **Ingenuity Pathways Analysis**, es otro sistema de clasificación de genes (Figura 23). Es también un programa que funciona a través de la web, aunque en este caso no es de acceso gratuito. El análisis con este programa lo realizamos utilizando los identificadores de Affymetrix. Empleamos la función “Core” para realizar el análisis funcional, de donde obtenemos dos tipos de clasificaciones: funciones moleculares y celulares, y enfermedades asociadas con los genes objeto de estudio. También usamos la función de búsqueda de biomarcadores (“IPA-Biomarker”) para obtener un listado de potenciales biomarcadores comunes entre los tres modelos, así como los marcadores de cada modelo individualmente.

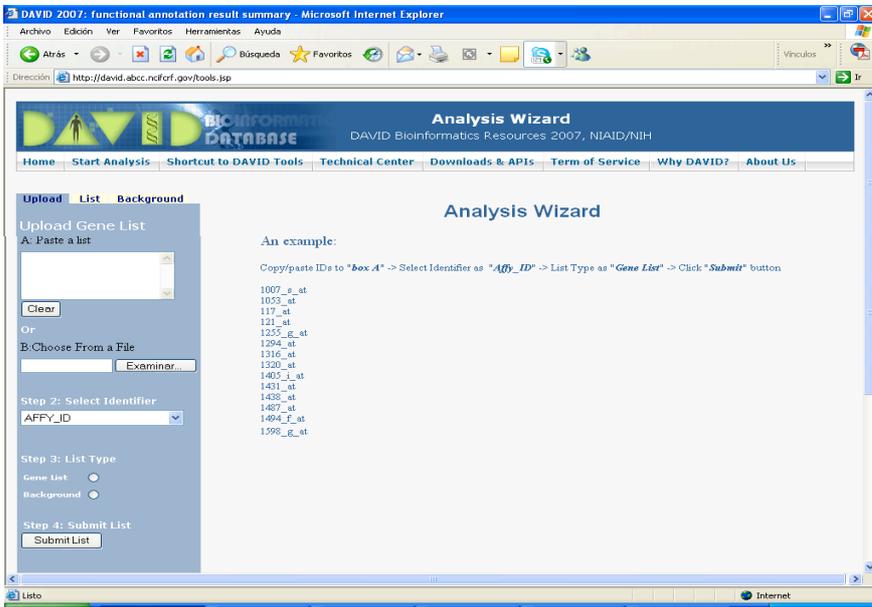


**Figura 23** Análisis con el programa Ingenuity. Las funciones “Core” e “IPA-Biomarker” fueron utilizadas en el análisis funcional.

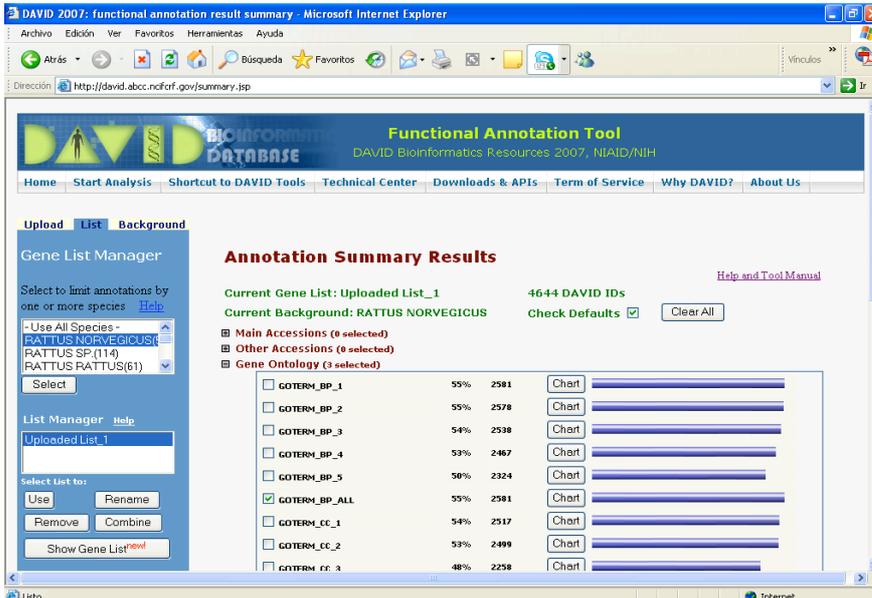
Finalmente, también usamos en programa **DAVID** (de acceso abierto, Figura 24) para clasificar los genes según las categorías del GeneOntology (GO) y KEGG (*Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (129). Esta base de datos clasifica los genes de tres formas: según procesos biológicos, componente celular y función molecular. EL GO se encuentra organizado de una forma peculiar. Mientras que en los dos programas usados anteriormente (Panther e Ingenuity) los términos funcionales usados eran “planos”, es decir, que no están estructurados, en el GO los términos biológicos que utiliza están organizados en forma de árbol, es decir, que existe una jerarquía entre esos términos. Mientras que los términos más superiores se refieren a conceptos más generales, a medida que se desciende en dicha jerarquía, las definiciones son mucho más detalladas. De ahí proceden los “niveles” de clasificación: los niveles más pequeños (comenzando desde el 1) corresponden a clasificaciones más generales, mientras que los más altos (hasta el 9) contienen categorías mucho más específicas. Un ejemplo concreto sería el siguiente: *biological*

*process> physiological process> death> cell death> programmed cell death> apoptosis> neuron apoptosis> regulation of neuron apoptosis> negative regulation of neuron apoptosis.* Para este análisis funcional elegimos el nivel 3 (el más usual), ya que no es ni demasiado general ni demasiado específico, lo cual permite una interpretación más lógica de los resultados y los datos introducidos fueron los identificadores de Affymetrix.

**A**



**B**



Gene Ontology Term	Percentage	DAVID ID	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_BP_1	55%	2581	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_BP_2	55%	2578	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_BP_3	54%	2538	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_BP_4	53%	2467	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_BP_5	50%	2324	Chart
<input checked="" type="checkbox"/> G0TERM_BP_ALL	55%	2581	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_CC_1	54%	2517	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_CC_2	53%	2499	Chart
<input type="checkbox"/> G0TERM_CC_3	48%	2258	Chart

**Figura 24.** Análisis con el programa DAVID. A) Pasos a seguir para realizar el análisis. B) Ejemplo de clasificación de una lista de genes de rata. Nótese los distintos niveles de clasificación.

## Software

Ingenuity Pathways Analysis v5.0 (<https://analysis.ingenuity.com>)

Panther v6(<https://www.panther.appliedbiosystems.com>)

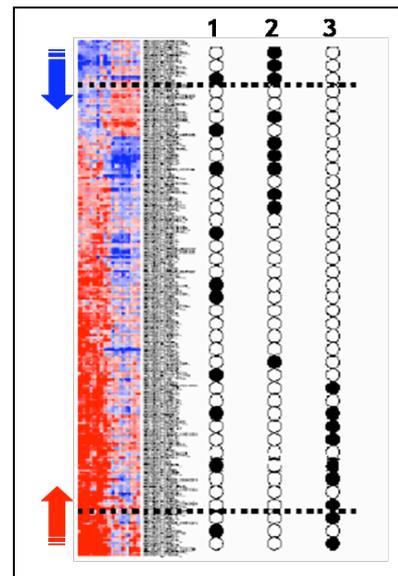
DAVID 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

Spotfire Decision Site v9.0 (Integromics S.L., Granada, España)

## 5.9 Análisis funcional 2: “gene-set enrichment”

Muy recientemente, se han propuesto nuevos métodos para hacer el análisis funcional de experimentos a escala genómica. Los métodos descritos en el apartado anterior (“*functional enrichment*”), presentan el inconveniente de que ignoran el comportamiento coordinado de los genes, ya que los tests aplicados en su clasificación asumen independencia entre los genes estudiados. En cambio, con esta nueva metodología, lo que se busca es descubrir bloques de genes con alguna relación funcional que se activen o desactiven simultáneamente, en vez de aplicar tests a genes individuales. Esta nueva visión, más cercana a la biología de sistemas, está empezando a ser explorada en los estudios de microarrays. Para este análisis empleamos el programa **FatiScan**. La novedad de este nuevo método consiste en que no emplea listas de genes preseleccionados según FC o *p*-value y se basa fundamentalmente en que los genes no actúan de forma independiente y que genes que presentan patrones similares de expresión suelen compartir funciones o estar implicados en procesos relacionados. Las estrategias basadas en analizar solo genes que superen umbrales de corte (que son “artificiales” y totalmente arbitrarios) producen una enorme pérdida de información debido a que generan muchos falsos negativos (107, 130). El fundamento de este programa se representa en la figura 25. Los genes se introducen en el programa de forma ordenada, por ejemplo, según el valor de expresión (los sobreexpresados abajo, y los reprimidos arriba). Las columnas 1, 2 y 3 representan tres categorías del GO (por ejemplo, apoptosis, inmunidad y ciclo celular). En este ejemplo vemos como las categorías 2 y 3 están claramente asociadas a una disminución o a un aumento de la expresión, respectivamente. Las líneas de puntos representan el umbral de corte que se hubiese realizado de haber seguido el otro tipo de estrategia (“*functional enrichment*”). Se puede observar como, en ese caso, no se podrían haber asociado de forma

tan clara las funciones 2 y 3 con los datos del experimento. En la figura 26 se explica su funcionamiento. Otro aspecto novedoso de este programa que consigue mejorar la eficiencia de los test aplicados, se refiere a los niveles del GO. En el GO, los genes están anotados a diferentes niveles. Con los programas tradicionales, como es el caso del DAVID, si elegimos por ejemplo el nivel 4, los genes serán clasificados según la anotación de ese nivel. FatiScan, sin embargo, considera que un gen que esté



**Figura 25.** Fundamento del análisis de “gene-set enrichment” con el programa FatiScan.

claro las funciones 2 y 3 con los datos del experimento. En la figura 26 se explica su funcionamiento. Otro aspecto novedoso de este programa que consigue mejorar la eficiencia de los test aplicados, se refiere a los niveles del GO. En el GO, los genes están anotados a diferentes niveles. Con los programas tradicionales, como es el caso del DAVID, si elegimos por ejemplo el nivel 4, los genes serán clasificados según la anotación de ese nivel. FatiScan, sin embargo, considera que un gen que esté

anotado a un determinado nivel, también lo estará en todos los niveles superiores en la jerarquía del GO (por ejemplo, un gen anotado como “*apoptosis*”, evidentemente también es un gen de “*programmed cell death*”, “*cell death*”... y así hacia arriba en la jerarquía). Por ello, FatiScan realiza lo que llaman “*Nested Inclusive Analysis*” (107) en el que los tests son aplicados a los diferentes niveles hasta el nivel más avanzado en la jerarquía (es decir, más detallado) en el que se alcanza un valor estadísticamente significativo. El tipo de test estadístico que aplica es el “*two-tailed Fisher exact test*”.

Los análisis con este programa los realizamos incluyendo todas las sondas anotadas de los chips (22.663 sondas en el chip de rata y 41.227 en el chip de ratón).

**Figura 26.** Funcionamiento del programa FatiScan: seleccionar el organismo (rata, ratón...), introducir la lista de genes, seleccionar el tipo de test estadístico y seleccionar el tipo de clasificación funcional, ya sea por GO u otras bases de datos disponibles, como KEEG, Biocarta, SwissProt...

## Software

FatiScan (<http://fatiscan.bioinfo.cipf.es>)

### 5.10 Visualización de genes en árboles

La representación de los genes identificados como biomarcadores de colitis del apartado 4.3 de *RESULTADOS*, se realizó con una herramienta denominada Tree, incluida en el conjunto de herramientas del GEPAS (*Figura 27*) (131). Al introducir los genes con sus correspondientes valores de expresión (FC) se obtiene una representación donde los colores varían gradualmente según el FC. En azul se representan los genes reprimidos y en rojo los sobreexpresados. A medida que el color, en ambos casos, es más claro, se significa que el FC es más pequeño.

**Figura 27.** Funcionamiento del programa Tree (GEPAS): introducir la lista de genes con sus correspondientes valores de FC ( Profile file) y seleccionar la escala de valores entre los que oscilan los FC ( Max scale).

## Software

GEPAS (herramienta Tree) (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/tools>).

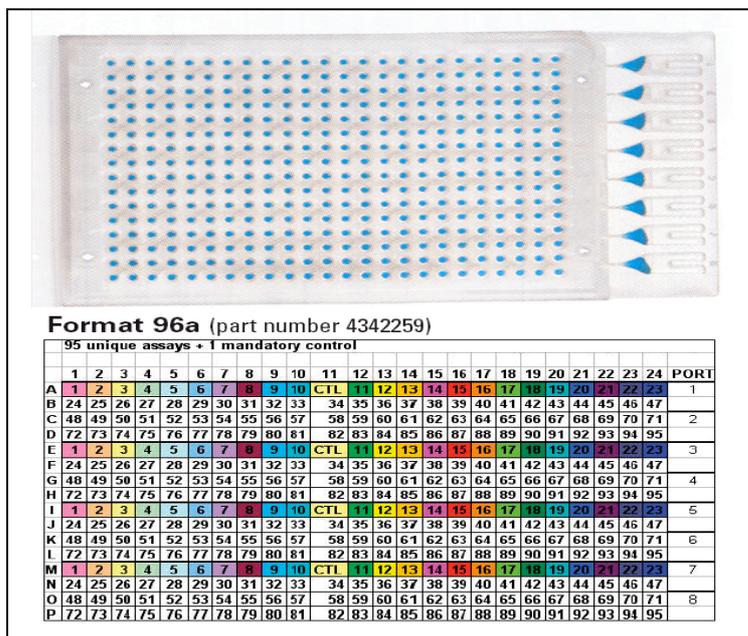
## 5.11 Análisis de dianas terapéuticas

Este análisis se realizó consultando los genes seleccionados en la base de datos PharmGKB (“*Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base*”, <http://www.pharmgkb.org/>).

## 6. Análisis postgenómico

### 6.1 Sistema de tarjetas “TaqMan® Low Density Array” de Applied Biosystems

Para realizar las qPCR, utilizamos el sistema de tarjetas que ofrece Applied Biosystems que permite realizar de manera simultánea hasta 384 reacciones de PCR. Este sistema consiste en unos soportes con 384 pocillos y 8 canales para la carga de las muestras (*Figura 27*). En cada pocillo se incluyen



*Figura 28.* A) Tarjeta TaqMan Low Density Array. B) Diseño del formato 96a

los reactivos, sondas y cebadores necesarios para la amplificación de cada gen. Las tarjetas empleadas corresponden al formato 96a en la que se representan 96 genes cuatro veces, es decir, que se pueden analizar 96 genes en cuatro muestras diferentes, utilizando dos canales de carga para cada muestra. Hemos analizado los días 3, 5 y 7, en el modelo de DSS y el día 7 en el modelo de TNBS, es decir, las etapas agudas de cada uno de los modelos en rata. Los genes analizados se detallan en el *Anexo 1*.

### 6.2 Protocolo de transcripción inversa.

Los experimentos de cuantificación de la expresión génica con el sistema de tarjetas *Low Density Array* (LDA) se realizan en dos pasos. El primero consiste en generar el cDNA a partir de RNA total mediante una reacción de transcripción inversa (RT, *reverse transcription*). Este paso se realizó siguiendo el protocolo del kit *High Capacity cDNA Archive Kit*, de Applied Biosystems, usando 2µg de RNA total.

#### Materiales

*High Capacity cDNA Archive Kit*

## 6.2 Protocolo de PCR

Una vez obtenido el cDNA, se procedió a preparar la mezcla de PCR que se carga en las tarjetas. Dicha mezcla se preparó mezclando 50ng de cDNA (en un volumen final de 50µl con agua libre de RNAsas) y 50µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2X*. Los 100µl de la mezcla se cargaron en las tarjetas y se centrifugaron durante 1 minuto, dos veces consecutivas. Posteriormente se sellaron las tarjetas y se realizó la PCR siguiendo el siguiente protocolo: 50°C - 2 min/ 94,5°C - 2 min/97°C - 30 min (40 ciclos)/59,7°C - 10 min.

### Materiales

*TaqMan Universal PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems)

Centrifuga de tarjetas Sorvall (Kendro Scientific)

Selladora de tarjetas: *TaqMan LDA Stylus Staker* (Applied Biosystems)

AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)

### Software

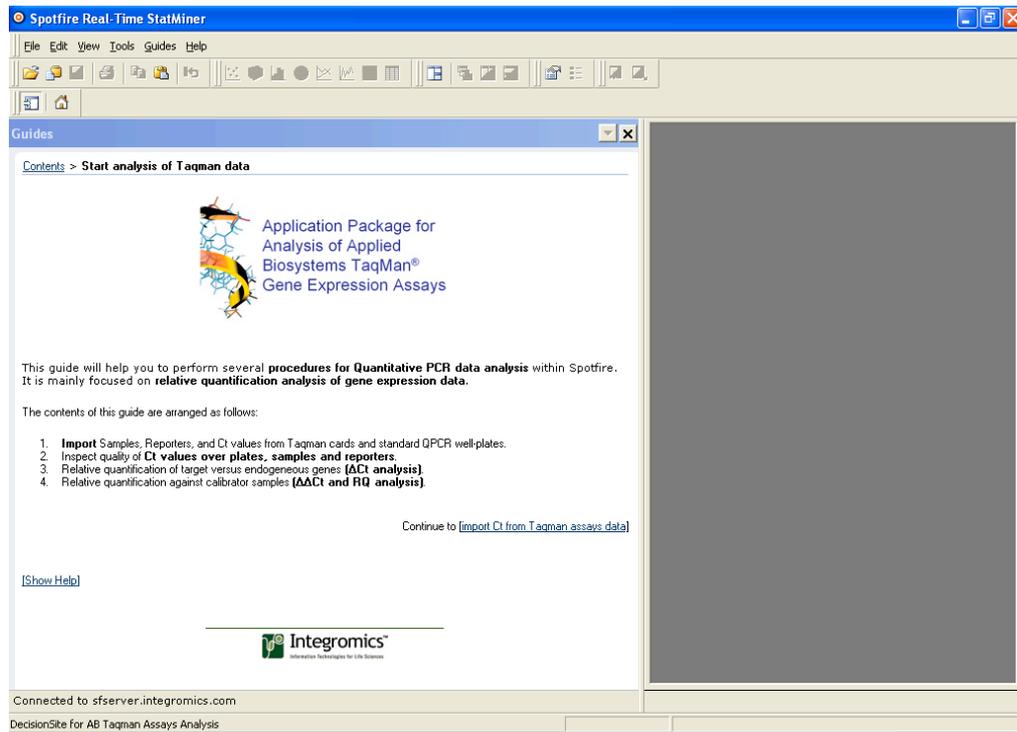
SDS 2.2.2 (Applied Biosystems)

## 6.2 Análisis de datos

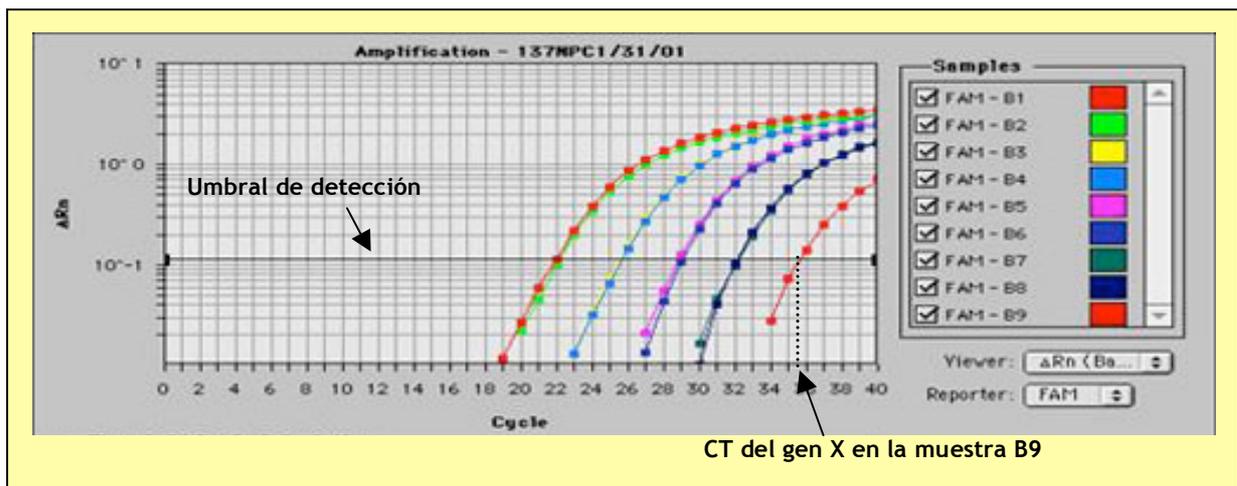
Los datos obtenidos de la qPCR se analizaron con el programa Spotfire, empleando el paquete StatMiner y la guía “*Guide to analyze AB Real time PCR data*” proporcionada por Integromics (*Figura 29B*). El programa funciona de la siguiente manera: en primer lugar se introducen los datos de  $C_T$  de todos los genes y todas las muestras, que corresponden al número de ciclo en el que la señal supera el umbral establecido (*Figura 29A*).

Posteriormente se estudia la calidad de los resultados (distribución de los  $C_T$ , homogeneidad de las réplicas...). En el siguiente paso se analizan los genes endógenos y se determina cual es el más adecuado para el experimento y finalmente se realiza la normalización y obtención de los valores de cambio de expresión ( $FC = \log_{10}RQ$ , donde  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (129).

A



B



**Figura 29.** A) Guía para el análisis de datos de PCR a tiempo real del paquete StatMiner del programa SpotFire. B) Ejemplo de amplificación de un determinado gen (X) en nueve muestras diferentes. Las muestras B1 y B2 superan el umbral antes ( $C_T=22$ ), lo que significa que en esas muestras, la cantidad inicial de RNA de dicho gen era superior. EL  $C_T$  de la muestra B9 es 35,5, es decir, que esta muestra es la que presenta menor expresión del gen X de todas, puesto que alcanza el umbral más tarde.



# *R*ESULTADOS

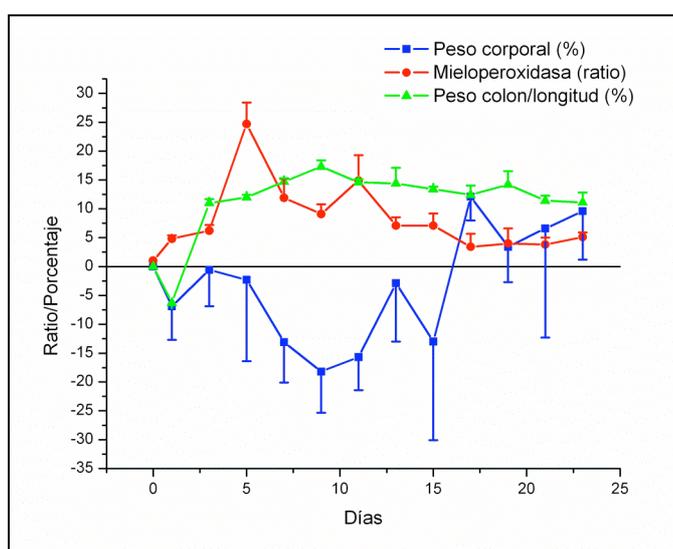


## RESULTADOS

### 1. Resultados del modelo de sulfato de dextrano

#### 1.1 Desarrollo y evolución de la colitis

La administración oral de DSS al 5% indujo inflamación aguda en todas las ratas tratadas. Los animales presentaron pérdida de peso, diarrea, acortamiento del colon y engrosamiento de la pared intestinal. La evaluación macroscópica del colon mostró úlceras en la mucosa, edema, hiperemia y sangrado intestinal. La actividad mieloperoxidasa, indicativa de infiltración de neutrófilos, se incrementó sobre todo en la fase más aguda (DSS al 5%). Como muestra la figura 30, la pérdida de peso corporal, el engrosamiento del colon y la infiltración por neutrófilos fue más acusada en los días en los que se administró DSS (al 5% en los días 1-7 y al 2% en los días 9-15), al igual que los signos de diarrea y sangrado intestinal y se observa una importante mejoría de estos signos al retirar el DSS del agua de bebida (días 17-23).



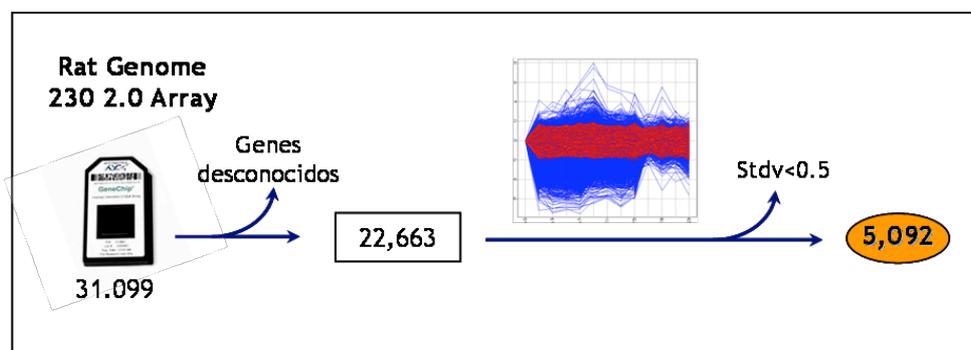
**Figura 30.** Cambios en marcadores de inflamación intestinal durante la colitis inducida por DSS. Los animales recibieron DSS al 5% en los días 1-7 y al 2% en los días 9-15. Entre los días 17-23 los animales no recibieron DSS.

#### 1.2 Análisis temporal

##### 1.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes

Como ya indicamos previamente, realizamos el análisis genómico empleando tres réplicas de cada uno de los 12 tiempos estudiados en este modelo, comparadas con 6 controles, lo que hacen un total de 42 chips. De cada uno de ellos, obtuvimos los datos de expresión de las 31.099 sondas que contienen los chips de rata. Para poder analizar este volumen de datos es necesario un paso previo de filtrado y selección de secuencias diferencialmente expresadas.

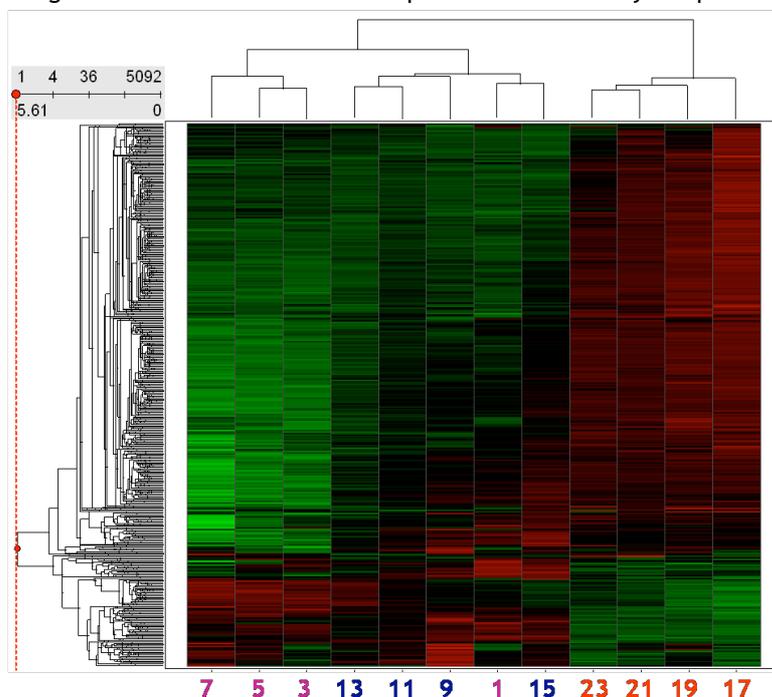
Para el análisis temporal (Figura 31), en el que el objetivo se centra en estudiar los diferentes perfiles o comportamientos de los genes a lo largo de los 23 días del estudio, se eliminaron, en primer lugar, aquellas sondas “desconocidas”, es decir, secuencias no anotadas incluidas en el chip (que son un total de 8.436). Posteriormente, se eliminaron aquellas sondas que presentasen una desviación estándar menor a 0,5 entre todos los puntos temporales (desde el día 1 al 23), lo cual significa que la expresión es igual o muy parecida entre todos los puntos y por tanto no hay variación, es decir, que tienen un perfil “plano”. El resultado tras el filtrado son 5.092 secuencias.



**Figura 31.** Proceso de filtrado de genes para el análisis temporal realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (8.436) y a continuación se eliminaron aquellos que no presentan variación a lo largo de todos los tiempos (marcados en rojo). Las secuencias seleccionadas según estos criterios son 5.092 (marcadas en azul).

### 1.2.2 Análisis de agrupamiento de muestras

Este tipo de análisis permite comprobar la homogeneidad de las muestras así como obtener una visión general de los cambios en la expresión detectados y en qué muestras se producen dichos cambios.



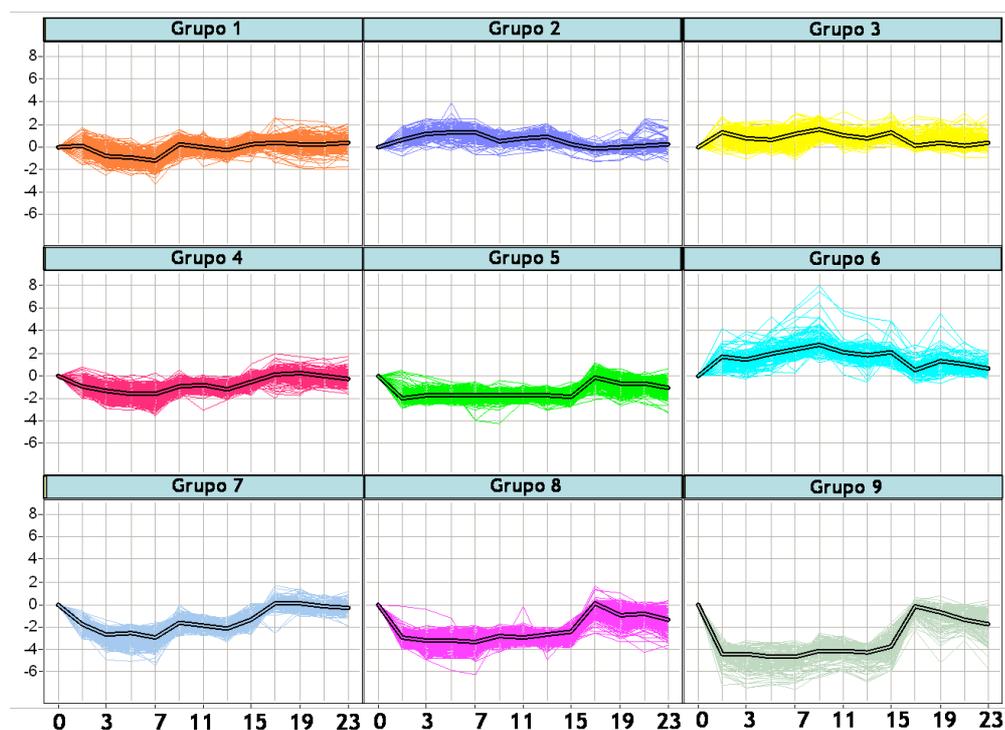
**Figura 32.** Cluster jerárquico representando los 12 tiempos incluidos en el modelo y las 5.092 secuencias. El dendograma superior muestra la similitud entre las muestras, es decir, que cada muestra aparece emparejada con aquella a la que más se parece. El dendograma lateral agrupa los genes en función de la similitud de su perfil de expresión a lo largo de los 12 tiempos. El color rojo representa las secuencias sobreexpresadas y el verde las reprimidas. Cada tiempo representa la media del FC de las tres réplicas incluidas en cada uno. Este análisis se realizó con el programa Spotfire.

La figura 32 muestra claramente la separación de las muestras que fueron tratadas con DSS (1-15) de las que solo recibieron agua (17-23). Además, las muestras correspondientes al grupo que recibió DSS al 5% también se separan de las del 2%. Estos datos nos permitieron comprobar la buena concordancia en los resultados y la reproducibilidad del modelo de DSS. Únicamente la muestra 1 aparece incluida en el grupo del 2%. Sin embargo, no es de extrañar ya que, aunque estaban recibiendo DSS al 5%, el tratamiento en el día 1 acababa de iniciarse y la inflamación era mucho menor, por ello se asemeja más a las muestras del 2% de DSS.

La figura 31 también nos muestra que la mayoría de los genes durante la inflamación están reprimidos, mientras que solo unos pocos se sobreexpresan, y que la retirada del DSS produce una notable mejoría y además de forma muy rápida.

### 1.2.3 Agrupamiento de genes

En el siguiente abordaje realizamos el agrupamiento de las 5.092 secuencias en función del perfil de expresión que siguen los genes a lo largo de los 12 tiempos. Este tipo de agrupamiento permite identificar los diferentes tipos de patrones que siguen los genes y a veces, relacionarlos con determinadas funciones biológicas o tipos celulares concretos.



**Figura 33.** Agrupamiento en *k*-medias de las 5.092 secuencias incluidas en el análisis temporal. El número de genes incluidos encada grupo es: grupo 1 (734), grupo 2 (335), grupo 3 (606), grupo 4 (1.322), grupo 5 (761), grupo 6 (145), grupo 7 (542), grupo 8 (475), grupo 9 (172).

Con el programa SpotFire obtuvimos 9 grupos (agrupamiento en k-medias) - ver figura 33-. Un hallazgo muy interesante es que algunos genes siguen un patrón muy dependiente de la concentración de DSS (grupos 1, 2, 4 y 7), ya que mejoran cuando la concentración de DSS se reduce del 5 al 2%, mientras que otros genes no se afectan al rebajar la dosis, aunque sí al retirar el tóxico completamente (grupos 5 y 9). Los grupos 3 y 6, aunque de forma no tan evidente, tampoco parecen estar influenciados por la reducción de la concentración del 2 al 5%. Así mismo, estos perfiles nos muestran como la mayoría de los genes retornan a valores normales cuando se retira el DSS, lo que nos indica una fuerte dependencia de la presencia del tóxico.

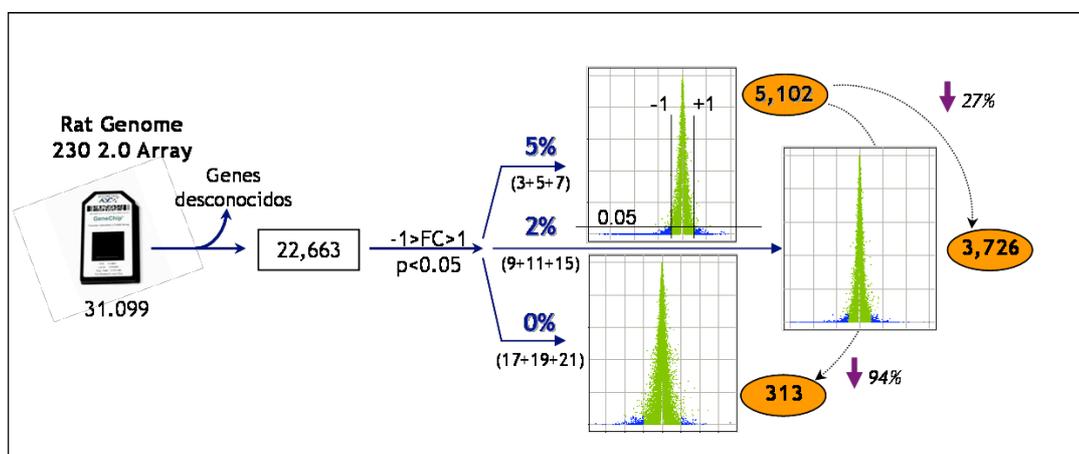
### 1.3 Análisis de expresión diferencial

#### 1.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

El análisis de expresión diferencial lo dividimos en tres grupos en función del diseño experimental del modelo. Según los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento de muestras (*Apartado 1.2.2, Figura 32*), seleccionamos los tres días más representativos de cada fase y los agrupamos para definir tres grupos:

- fase en la que recibieron DSS al 5%: días 3+ 5 + 7, que llamaremos grupo DSS5%
- fase en la que recibieron DSS al 2%: días 9+11+15, que llamaremos grupo DSS2%
- fase en la que los animales solo recibieron agua: días 17+19+21, que llamaremos grupo DSS 0%.

El grupo DSS5% corresponde por tanto a la colitis más grave, el grupo DSS2% a una colitis más leve y el grupo DSS0% corresponde a la fase de recuperación de la inflamación.



**Figura 34.** Proceso de filtrado de genes para el análisis de expresión diferencial realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (8.436) y a continuación se seleccionaron las secuencias que presentasen un cambio de expresión mayor o menor que 1 y un valor de  $p < 0,05$ .

En el primer paso de filtrado (*Figura 34*) se eliminaron las secuencias no anotadas (8.436). Posteriormente, para cada una de las fases, se aplicó una *t* de Student entre las tres réplicas de los tres días de cada fase (n=9) y los 6 controles. A continuación, para cada uno de los grupos, se seleccionaron las secuencias que cumplieran con dos criterios: tener un cambio de expresión (media de los FC de los tres días) de al menos 1 (o -1, para los reprimidos), y que el valor de *p* fuese <0,05. Estos filtros nos dan como resultado 5.102 secuencias diferencialmente expresadas (1.257 sobreexpresadas y 3.845 reprimidas) en el grupo DSS5%, 3.726 (1.074 sobreexpresadas y 2.652 reprimidas) en el grupo DSS2% y 313 (237 sobreexpresadas y 76 reprimidas) en el grupo DSS0%. Esto nos indica que los cambios de expresión son fuertemente dependientes de la concentración de DSS. La disminución de la concentración del DSS del 5% al 2% supone una reducción de 1.326 genes (un 27%) y la retirada completa del tóxico produce una recuperación del 94% en el número de genes afectados.

Las secuencias que presentan mayor cambio durante la etapa más aguda (grupo DSS5%) se representan en las tablas 4 y 5. Entre los 50 genes con mayor expresión se encuentran genes relacionados con inflamación, como las citocinas *Cxcl2*, *Il6*, *Il1b*, *S100a8*, *S100a9*, o proteasas como *Mmp13* o *Ctsc*. Por otro lado, los 50 genes que presentan una expresión más baja incluyen *Gpx4*, implicado en el estrés oxidativo, *Klf5*, que interviene en la proliferación del epitelio intestinal, o el gen *Rhoa*, que interviene en la reorganización del citoesqueleto.

Tabla 4. 50 genes con mayor expresión en el grupo DSS5%.

ProbeID	Symbol	Gene Title	FC DSS5%	Chromosomal Location	GO Biological Process
1367794_at	A2m	alpha-2-macroglobulin	2.38	chr4q42	intracellular protein transport
1368223_at	Adamts1	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	3.46	---	ovulation (sensu Mammalia)
1388924_at	Angptl4	angiopoietin-like 4	2.30	chr7q12	angiogenesis
1368266_at	Arg1	arginase 1	2.30	chr1p12	urea cycle
1382441_at	Arid1b	AT rich interactive domain 1B (Swi1 like)	2.18	chr1q11	chromatin modification
1387029_at	Cfh	complement component factor H	2.13	chr13q13	regulation of complement activation
1392171_at	Chi3l1	chitinase 3-like 1	2.21	chr13q13	carbohydrate metabolism
1393954_at	Chrdl2	chordin-like 2	2.45	chr1q32	cell differentiation
1368420_at	Cp	ceruloplasmin	2.71	chr2q24	ion transport
1388142_at	Cspg2	chondroitin sulfate proteoglycan 2	2.21	chr2q12	physiological response to wounding
1397808_at	Ctsc	Cathepsin C	2.73	chr1q32	proteolysis
1368760_at	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3.01	chr14p22	chemotaxis
1373196_at	Efha2	EF hand domain family, member A2	2.27	chr16q12.1	---
1384100_at	Ensa	Endosulfine alpha	2.42	chr2q34	transport
1372002_at	Gja1	gap junction membrane channel protein alpha 1	2.21	chr20q11	neuron migration
1394919_at	Hgf	Hepatocyte growth factor	2.28	chr4q12	activation of MAPK activity
1375183_at	Id4	Inhibitor of DNA binding 4	2.14	chr17p14	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
1398256_at	Il1b	interleukin 1 beta	2.16	chr3q36	regulation of progression through cell cycle
1369191_at	Il6	interleukin 6	2.32	chr4q11	neutrophil apoptosis
1376632_at	Lmcd1	LIM and cysteine-rich domains 1	2.54	chr4q42	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
1393555_at	LOC291871	similar to heat shock protein 1, beta	2.14	chr19q11	protein folding
1382311_at	LOC310877	TRAF2 binding protein	2.69	chr2q42	---
1389600_at	LOC363306	hypothetical protein LOC363306	2.40	14q11	---
1385397_at	LOC499991	Ab1-219	2.48	chr4q12	fat cell differentiation
1395590_at	LOC501485	hypothetical LOC501485	2.66	---	---
1385965_at	LOC679725	Similar to MASK-4E-BP3 protein	2.39	chr18p11	---
1386258_at	LOC686263	Similar to RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3	2.11	---	---
1384329_at	LOC690164	Similar to F57G4.9	2.10	chr3q24	proteolysis
1376568_at	Map4k4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	2.55	chr9q21	protein amino acid phosphorylation
1373333_at	MGC109340	similar to Microsomal signal peptidase 23 kDa subunit	2.44	chrXq35	signal peptide processing
1388204_at	Mmp13	matrix metallopeptidase 13	3.24	chr8q11	ossification
1385702_at	Mnda	myeloid cell nuclear differentiation antigen	2.21	chr13q24	cellular defense response
1388267_a_at	Mt1a	metallothionein 1a	2.48	chr19p12	metal ion homeostasis
1383517_at	Mtap7	Microtubule-associated protein 7	3.56	chr1p12	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis

RESULTADOS

1394181_at	<b>Ndn12</b>	Necdin-like 2	2.25	chr1q22	regulation of transcription, DNA-dependent
1368238_at	<b>Pap</b>	pancreatitis-associated protein	3.82	chr4q33-q34	acute-phase response
1375921_at	<b>Rcn1</b>	Reticulocalbin 1	3.09	chr3q32	---
1393643_at	<b>Rcn1</b>	reticulocalbin 1	2.42	chr3q32	---
1393917_at	<b>RGD1306073</b>	Similar to sallimus CG1915-PC	2.60	chr9q33	---
1376645_at	<b>RGD1307396</b>	Similar to RIKEN cDNA 6330406115	2.85	chr12p11	---
1383874_at	<b>RGD1560812</b>	RGD1560812	2.20	chr6q16	---
1382365_at	<b>RGD1561602</b>	Similar to nemo like kinase	2.95	chr10q25	---
1391152_at	<b>RGD1563862</b>	similar to RIKEN cDNA 4930555G01	3.18	chr9q11	---
1374157_at	<b>Rgs8</b>	Regulator of G-protein signaling 8	2.14	chr13q21	G-protein coupled receptor protein signaling
1368494_at	<b>S100a8</b>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	3.43	chr2q34	chemotaxis
1387125_at	<b>S100a9</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	3.88	chr2q34	inflammatory response
1387134_at	<b>Slfn3</b>	schlafen 3	2.80	chr10q26	T cell differentiation
1385241_at	<b>Stag1</b>	Stromal antigen 1	2.23	chr8q31	---
1377340_at	<b>Tfpi2</b>	tissue factor pathway inhibitor 2	2.39	chr4q13	blood coagulation
1382192_at	<b>Xlkd1</b>	extracellular link domain-containing 1	2.46	chr1q33	glycosaminoglycan catabolism

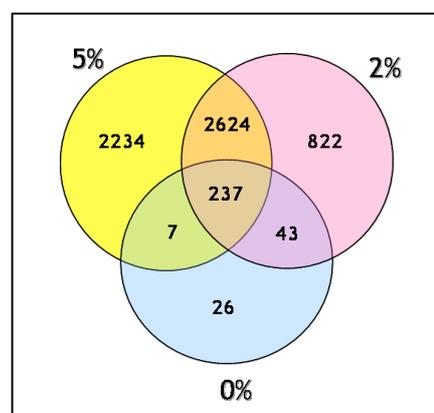
Tabla 5. 50 genes con menor expresión en el grupo DSS5%.

ProbeID	Symbol	Gene Title	Media FC 5%	Chromosomal Location	GO Biological Process
1387335_s_at	Abo	ABO blood group	-5.87	3p13	---
1398836_s_at	Actb	actin, beta	-6.93	chr12p11	axonogenesis
1386869_at	Actg2	actin, gamma 2	-5.70	chr4q34	muscle development
1375424_at	Actr2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	-5.75	chr14q22	cell motility
1367560_at	Arbp	acidic ribosomal phosphoprotein P0	-5.91	chr12q16	translational elongation
1398817_at	Arf1	ADP-ribosylation factor 1	-5.56	chr10q22	intracellular protein transport
1375137_at	Arpc2	actin related protein 2	-5.32	chr9q33	cell motility
1367585_a_at	Atp1a1	ATPase, Na <sup>+</sup>	-6.49	chr2q34	ATP catabolism
1369953_a_at	Cd24	CD24 antigen	-5.65	chr20q13	humoral immune response
1369215_a_at	Cpd	carboxypeptidase D	-5.67	chr10q26	proteolysis
1370057_at	Csrp1	cysteine and glycine-rich protein 1	-5.41	chr13q13	nervous system development
1367600_at	Des	desmin	-6.79	chr9q33	muscle development
1375881_at	Dstn	destrin	-5.15	chr3q41	---
1370003_at	Eef2	eukaryotic translation elongation factor 2	-5.86	chr7q11	translational elongation
1397520_at	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	-5.44	chr9q21	protein biosynthesis
1398846_at	Eif5	eukaryotic translation initiation factor 5	-5.25	chr6q32	protein biosynthesis
1367575_at	Eno1	enolase 1, alpha	-5.24	chr5q36	glycolysis
1390049_at	Fhl1	four and a half LIM domains 1	-5.46	chrXq36	---
1367559_at	Ftl1	ferritin light chain 1	-6.91	chr1q22	iron ion homeostasis
1370804_at	Gabarap	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein	-5.82	chr10q24	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
1398822_at	Gdi2	GDP dissociation inhibitor 2	-5.55	chr17q12.3	small GTPase mediated signal transduction
1386871_at	Gpx4	glutathione peroxidase 4	-5.32	chr7q11	electron transport
1398664_at	Gramd3	GRAM domain containing 3	-5.32	chr18q12.1	---
1390019_at	H3f3b	H3 histone, family 3B	-5.65	chr10q32.3	nucleosome assembly
1367895_at	Hnrpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	-5.34	chr17p14	mRNA processing
1387631_at	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	-5.58	chr16p11	prostaglandin metabolism
1375336_at	Hspcb	heat shock 90kDa protein 1, beta	-5.90	chr9q12	protein folding
1368363_at	Klf5	Kruppel-like factor 5	-6.18	chr15q21	angiogenesis
1368055_a_at	Lmna	lamin A	-5.28	chr2q31-q34	nuclear membrane organization and biogenesis
1371302_at	LOC502663	similar to Small EDRK-rich factor 2	-5.08	chr3q35	---
1386785_a_at	LOC680227	LRRGT00193	-5.54	chrXq31	---
1375535_at	Lpin1	Lipin 1	-5.90	chr6q15	lipid metabolism
1398324_at	MGC72957	similar to 60S ribosomal protein L18a	-5.78	chr16p14	protein biosynthesis
1388300_at	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3	-6.37	chr13q24	lipid metabolism
1375119_at	Nedd4a	neural precursor cell expressed	-5.44	chr8q24	protein modification
1367635_at	P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	-5.74	chr10q32.3	peptidyl-proline hydroxylation to 4-hydroxy-L-proline
1367605_at	Pfn1	profilin 1	-6.26	chr10q24	neural tube closure

1393281_at	RGD1560745	Similar to OTTHUMP00000018508	-5.57	chr15q21	JNK cascade
1388705_at	RGD1565037	similar to selenoprotein SelM	-5.49	chr14q21	---
1370130_at	Rhoa	ras homolog gene family, member A	-5.16	chr16q12.5	cell adhesion
1368211_at	Rps14	ribosomal protein S14	-5.77	chr18q12.1	protein biosynthesis
1367639_a_at	Rps2	ribosomal protein S2	-6.53	chr10q12	protein biosynthesis
1370428_x_at	RT1-Aw2	RT1 class Ib, locus Aw2	-7.24	chr20p12	antigen processing and presentation of endogenous antigen
1370296_at	Scp2	sterol carrier protein 2	-5.17	chr5q35	acyl-CoA metabolism
1372123_at	Sdhb	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	-5.44	chr5q36	tricarboxylic acid cycle
1383085_at	Sh3bgr1	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like	-5.65	chrXq31	---
1390048_at	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2	-5.32	chr10q12	---
1367570_at	Tagln	transgelin	-6.21	chr8q24	smooth muscle contraction
1370288_a_at	Tpm1	tropomyosin 1, alpha	-7.30	chr8q24	cell motility
1370168_at	Ywhaq	tyrosine 3-monooxygenase	-5.31	chr6q16	regulation of progression through cell cycle

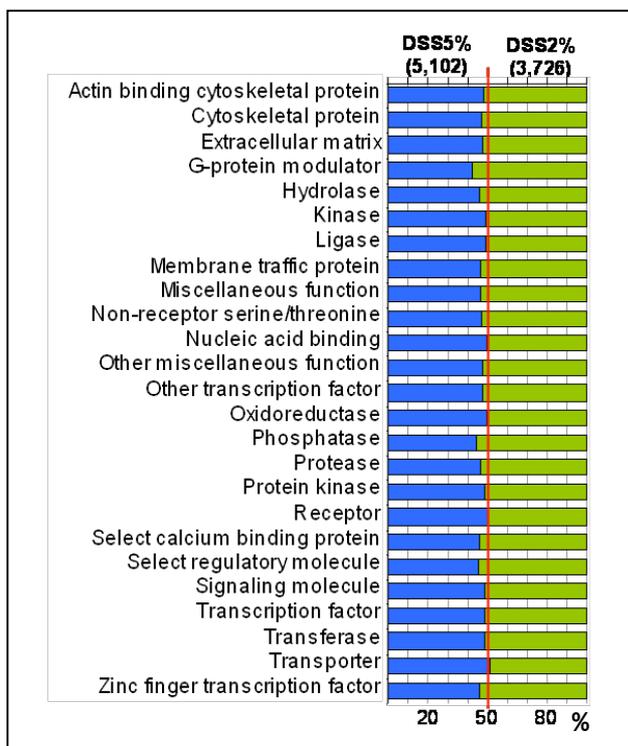
### 1.3.2 Comparación de las tres fases

La comparación de los tres grupos (*Figura 35*) muestra listas de genes muy interesantes. Por ejemplo, la lista de 2.624 secuencias corresponde a genes que están afectados independientemente de la concentración de DSS, que podríamos considerarlos como los genes más directamente relacionados con la colitis, ya que entre ellos se encuentran genes como *Il6*, *Mmp10*, *Mmp13* o *S100a8*. Por otro lado, hay 2.234 secuencias que solo se alteran a elevadas concentraciones de DSS (al 5% y no al 2%) como la aldolasa b (*Aldob*), aquaporinas 11 y 2 (*Aqp11*, *Aqp2*), el factor estimulador de colonias 1 (*Csf1*) o las catepsinas B, F, H y M (*Ctsb*, *Ctsf*, *Ctsh* y *Ctsm*). Este punto es importante, junto con las observaciones del apartado anterior, a considerar en este modelo, ya que, con frecuencia, diferentes investigadores emplean concentraciones distintas de DSS, y sin embargo estos resultados muestran que existen grandes diferencias, tanto cualitativas como cuantitativas, en los genes afectados. Sin embargo, a pesar del elevado número de genes que aparecen afectados exclusivamente en uno u otro grupo (DSS5% o DSS2%), al estudiar las funciones más representativas de dichos genes (*Figura 36*), no se aprecian estas diferencias, es decir, que en ambos casos la colitis presenta características similares, donde los procesos afectados son similares. La reducción de la concentración produce, por tanto, una



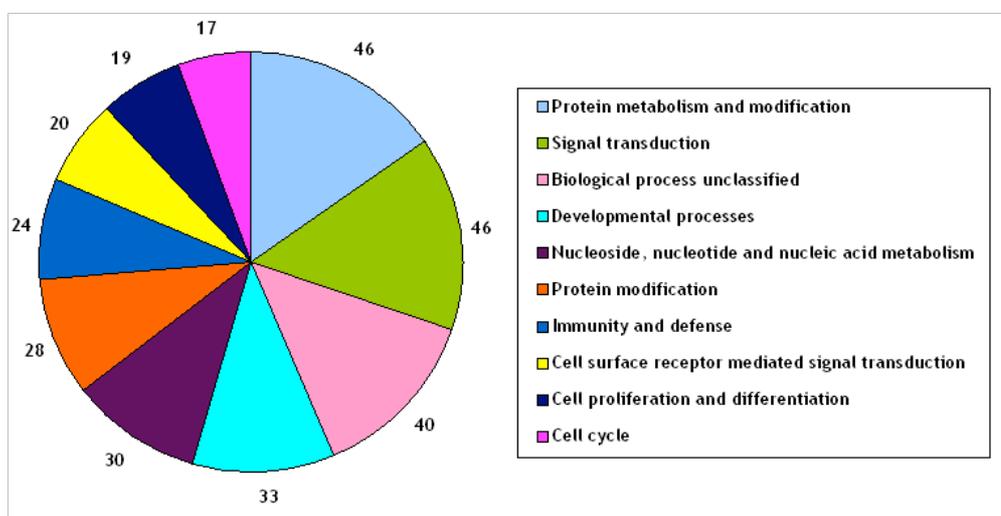
*Figura 35.* Diagrama de Venn, comparando las tres fases: fase 5% (5.102 secuencias), fase 2% (3.726 secuencias) y fase 0% (313 secuencias).

recuperación de forma paralela en los diferentes procesos afectados. También identificamos un grupo de 237 genes “crónicos” ya que aparecen alterados en las tres fases del modelo, incluso cuando el DSS ha sido retirado. Entre ellos: *Il1a*, *Il1b*, *Klf5*, el factor de transcripción *Sp1*, *Mmp12* o el gen de la lamina A (*Lmna*). La figura 37 muestra los procesos biológicos más representativos de este grupo de genes. Finalmente, también resulta interesante para un estudio más detallado, la lista de 26 secuencias, ya que



podrían ser genes implicados en los mecanismos de reparación del daño intestinal. Entre ellos, destaca la sobreexpresión de tres genes del complejo mayor de histocompatibilidad, *RT1-A3*, *RT1-Aw2* y *RT1-Bb*.

**Figura 36.** Análisis de las funciones moleculares de los grupos DSS5% y DSS2%. Cada barra representa la contribución de una función en cada grupo (azul, DSS5%; verde, DSS2%). Por ejemplo, en el grupo 5%DSS hay un 3,27% de genes de transportadores, mientras que en el grupo 2% son un 3,17%. Como la contribución de este proceso en ambos grupos es casi igual, la línea que separa ambos grupos aparece cercana al 50% en este tipo de representaciones. Como se puede observar, en todos los casos la separación está muy cercana al 50%, lo que indica que el porcentaje de genes de cada proceso en ambos grupos es muy similar.



**Figura 37.** Procesos biológicos según en programa Panther más representativos en el grupo de 237 genes comunes entre los grupos DSS5%, DSS2% y DSS0%. Los números indican el número de genes incluidos en cada categoría.

### 1.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda (grupo DSS5%)

Para poder interpretar los listados de genes obtenidos en el apartado anterior, es necesario realizar un análisis de las funciones y procesos en los que intervienen dichos genes. Para ello existen diversas herramientas informáticas que permiten esa traducción de los datos en conocimiento biológico. En este trabajo hemos centrado este análisis en la fase de colitis aguda (grupo DSS5%) y presentamos dos tipos de estrategias diferentes para el realizar el estudio funcional de datos a escala genómica.

#### 1.3.3.1 Análisis tradicional: “*functional enrichment*”

El análisis funcional de una lista preseleccionada de genes se conoce como “*functional enrichment*” (ver apartado 5.8 de *Métodos*). Existen numerosos programas para ello que se suelen diferenciar entre sí en los tipos de tests que aplican (ver *Anexo 2*) y en las bases de datos de las cuales toman la información para hacer la clasificación. El análisis de las secuencias seleccionadas tras el proceso de filtrado en el grupo DSS5% (5.102 secuencias) lo hemos realizado de tres formas diferentes empleando los siguientes programas:

- Panther: la base de datos que utiliza es el la del NCBI.
- Ingenuity: emplea la base de datos IPA Knowledge Base.
- DAVID: emplea para la clasificación las categorías del GeneOnotology.

De esta manera, usando diferentes criterios y diferentes bases de datos, podremos identificar resultados comunes de los tres programas.

#### Análisis con el programa Panther

Este programa realiza tres clasificaciones de los genes: según rutas (*Tabla 6*), procesos biológicos (*Tabla 7*) y funciones moleculares (*Tabla 8*). En las tablas se representan las 45 categorías más importantes según el número de genes. En la clasificación según rutas, acorde con el modelo, encontramos varias relacionadas con la inflamación, como inflamación mediada por citokinas y quimiokinas, angiogénesis o ruta de señalización por interleukinas. Más novedoso resultan las 7 rutas relacionadas con procesos neuronales que aparecen en la lista: señalización por receptores nicotínicos, receptores muscarínicos, rutas del receptor de glutamato y rutas de señalización por receptores de la serotonina. En la clasificación según procesos biológicos volvemos a encontrar la alteración de la actividad neuronal, con 111 genes alterados, y neurogénesis, con 102. Entre los procesos biológicos ya conocidos se incluyen la proliferación y diferenciación celular, la respuesta al estrés, apoptosis e inmunidad y defensa. Otros procesos interesantes identificados en este análisis son la alteración del metabolismo lipídico y de carbohidratos. Finalmente, la clasificación por funciones moleculares nos muestra la alteración de 300 factores de transcripción, 246 receptores, 167 transportadores y 72 proteínas de matriz extracelular, entre otros.

**Tabla 6.** Clasificación en rutas según el programa Panther. La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría, y la segunda son los genes de cada categoría que están en la lista de 5.102 secuencias. Los procesos nombrados en el texto aparecen marcados en gris.

Pathways	NCBI: R. norvegicus genes	Grupo 5% (5.102 secuencias)
Unclassified	23307	2862
Inflammation mediated by chemokine and cytokine	318	89
Integrin signalling pathway	238	81
Wnt signaling pathway	370	74
Angiogenesis	222	73
PDGF signaling pathway	178	63
Huntington disease	173	57
EGF receptor signaling pathway	145	53
T cell activation	117	49
Parkinson disease	118	47
Apoptosis signaling pathway	176	46
Interleukin signaling pathway	167	45
Ras Pathway	91	44
FGF signaling pathway	140	43
p53 pathway	135	40
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha	175	40
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	114	39
TGF-beta signaling pathway	155	39
Alzheimer disease-presenilin pathway	139	37
PI3 kinase pathway	126	36
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha	148	36
Ubiquitin proteasome pathway	108	35
B cell activation	95	34
Endothelin signaling pathway	104	33
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	72	31
VEGF signaling pathway	84	28
p53 pathway feedback loops 2	70	24
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	94	24
Cadherin signaling pathway	176	24
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	92	22
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	79	21
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	60	20
Toll receptor signaling pathway	87	20
Axon guidance mediated by semaphorins	48	19
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	57	19
Insulin/IGF pathway	41	18
Blood coagulation	60	18
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	64	18
5HT2 type receptor mediated signaling pathway	75	18
FAS signaling pathway	37	17
Ionotropic glutamate receptor pathway	58	17
Oxidative stress response	78	16
Hedgehog signaling pathway	39	15
5HT1 type receptor mediated signaling pathway	49	15
Cell cycle	26	14

**Tabla 7.** Clasificación en procesos biológicos según el programa Panther. La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría, y la segunda son los genes de cada categoría que están en la lista de 5.102 secuencias. Los procesos nombrados en el texto aparecen marcados en gris.

Biological Process	NCBI: R. norvegicus genes	Grupo 5% (5.102 secuencias)
Biological process unclassified	10908	843
Protein metabolism and modification	3538	760
Signal transduction	4044	643
Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	3221	578
Developmental processes	2141	400
Protein modification	1266	316
Transport	1353	314
mRNA transcription	1718	304
Immunity and defense	1505	294
Cell surface receptor mediated signal transduction	2287	269
Cell structure and motility	1100	267
Intracellular protein traffic	984	262
Cell cycle	978	222
Proteolysis	1070	222
Cell communication	1163	215
Intracellular signaling cascade	875	209
mRNA transcription regulation	1266	206
Cell proliferation and differentiation	898	201
Lipid, fatty acid and steroid metabolism	835	199
Protein phosphorylation	736	184
Cell structure	685	157
Carbohydrate metabolism	588	155
Other metabolism	608	149
Apoptosis	577	141
Protein biosynthesis	870	136
Ion transport	636	135
Cell adhesion	594	124
Ectoderm development	677	113
Mesoderm development	566	112
Cell cycle control	439	111
Neuronal activities	688	111
G-protein mediated signaling	1517	110
Cation transport	497	107
Neurogenesis	589	102
Oncogenesis	423	87
Endocytosis	256	85
Cell motility	331	84
Mitosis	351	81
Pre-mRNA processing	318	76
Electron transport	334	76
Ligand-mediated signaling	390	72
General vesicle transport	288	70
Stress response	228	63
Cell adhesion-mediated signaling	386	62
Amino acid metabolism	234	61

**Tabla 8.** Clasificación en funciones moleculares según el programa Panther. La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría, y la segunda son los genes de cada categoría que están en la lista de 5.102 secuencias. Los procesos nombrados en el texto aparecen marcados en gris.

Molecular Function	NCBI: R. norvegicus genes	Grupo 5% (5.102 secuencias)
Molecular function unclassified	10535	836
Nucleic acid binding	3175	529
Transcription factor	1816	300
Select regulatory molecule	1206	249
Receptor	2222	246
Transferase	917	195
Kinase	780	192
Oxidoreductase	732	180
Cytoskeletal protein	840	175
Transporter	662	167
Signaling molecule	773	167
Hydrolase	736	160
Miscellaneous function	876	159
Protein kinase	611	145
Protease	617	128
Actin binding cytoskeletal protein	371	100
Other miscellaneous function protein	443	96
Membrane traffic protein	326	94
Ligase	431	88
Other transporter	335	83
Non-receptor serine/threonine protein kinase	387	83
Ribosomal protein	744	82
Other transcription factor	371	81
Ion channel	346	78
Transfer/carrier protein	384	77
Dehydrogenase	232	76
Phosphatase	270	72
Select calcium binding protein	281	72
Extracellular matrix	364	72
Zinc finger transcription factor	616	72
Cell adhesion molecule	416	71
G-protein	276	67
Defense/immunity protein	428	65
Other signaling molecule	244	64
G-protein modulator	382	64
Other receptor	284	62
Synthase and synthetase	235	61
Other hydrolase	194	59
Reductase	197	57
Lyase	166	56
Other RNA-binding protein	196	55
Small GTPase	203	52
Non-motor actin binding protein	169	50
Cation transporter	170	48
G-protein coupled receptor	1212	47

### Análisis con el programa Ingenuity

Con este segundo método de clasificación obtenemos de nuevo los procesos biológicos afectados en el grupo DSS5%, aunque esta vez disponemos de un valor de significancia (ver Anexo 2) que nos permite identificar los procesos significativos (Figura 38). Podemos observar aspectos comunes identificados con el programa anterior, como la proliferación celular, metabolismo de carbohidratos y lípidos, síntesis de proteínas o ciclo celular. Este programa, además, nos identifica la alteración del metabolismo mineral y de vitaminas, de aminoácidos y de drogas.

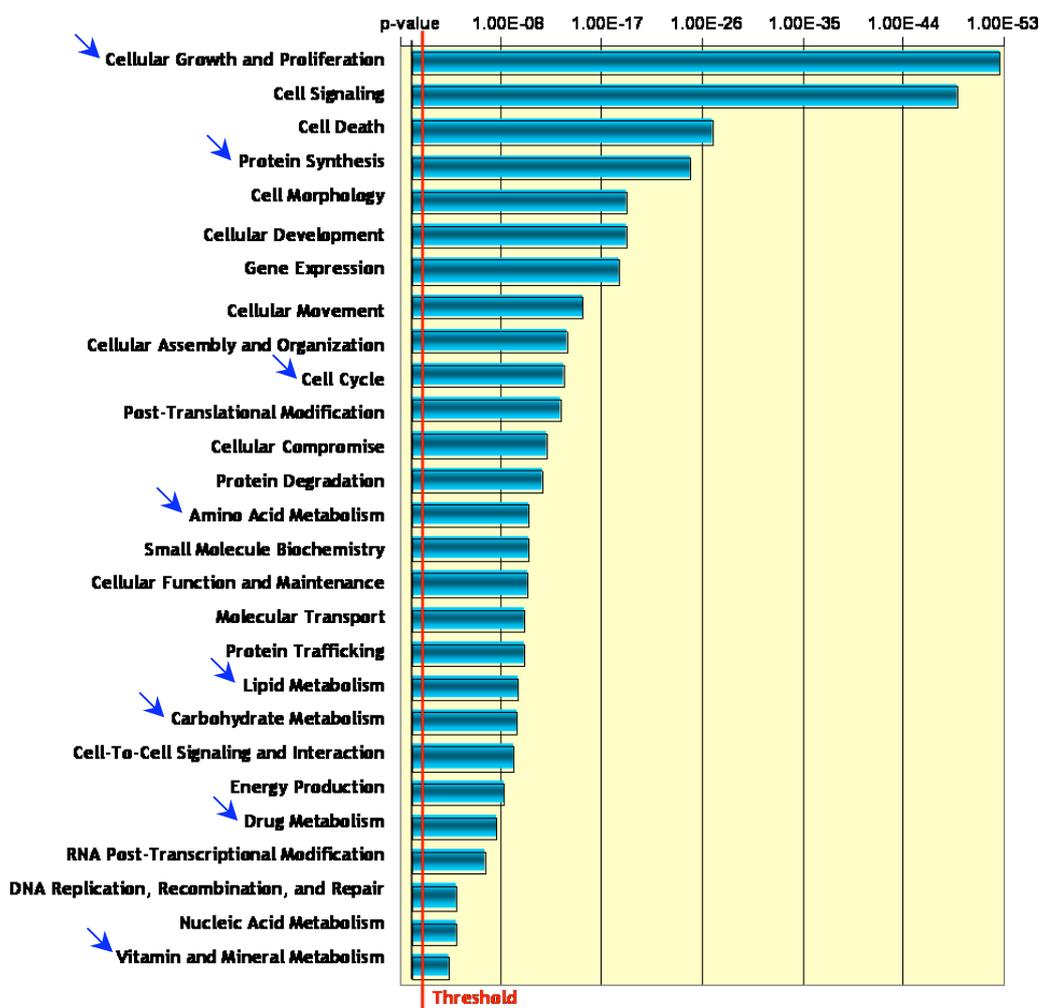


Figura 38. Clasificación de las 5.102 secuencias del grupo DSS5% según funciones moleculares y celulares realizado con el programa Ingenuity. Las flechas señalan los procesos comentados en el texto

El programa Ingenuity nos permite realizar una clasificación de los genes en función de en qué enfermedades están implicados (Figura 39). Las alteraciones del tejido conectivo aparece como la más significativa, lo que concuerda con la hipótesis en cuanto a la patogénesis de esta modelo que propone que la colitis se inicia por una alteración en la función barrera de la mucosa intestinal. De nuevo, identificamos

como significativas las alteraciones neurológicas y metabólicas. Lógicamente, inflamación y enfermedad gastrointestinal aparecen significativas. Otra categoría interesante es el cáncer, que nos indica que este modelo podría ser útil para el estudio de las alteraciones tempranas que conducen al cancer asociado a procesos inflamatorios.

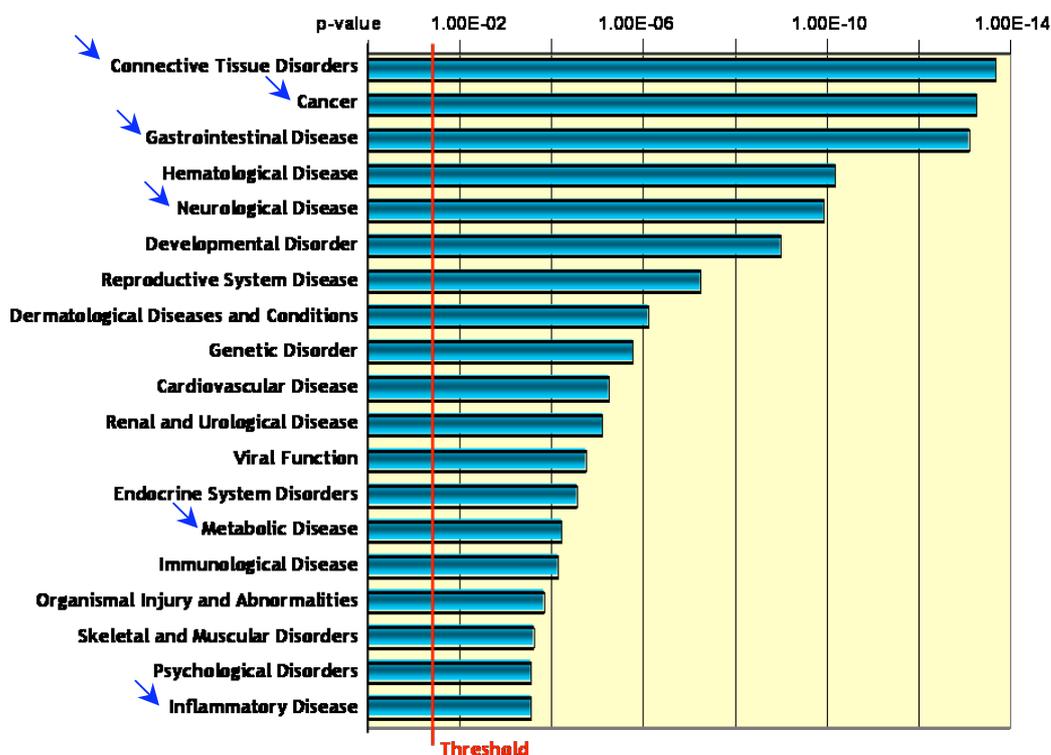


Figura 39. Clasificación de las 5.102 secuenciass del grupo DSS5% según enfermedades realizado con el programa Ingenuity. Las flechas señalan las enfermedades comentadas en el texto

### Análisis con el programa DAVID

En la tabla 9 se muestran las 15 categorías más significativas de procesos biológicos, funciones moleculares de GeneOntology y rutas del KEGG, identificadas con el programa DAVID, seleccionando el nivel 3 de clasificación (ver apartado 5.8 de MÉTODOS). A pesar de ser la base de datos más conocida y más utilizada, la clasificación funcional que obtenemos según GO presenta dificultades en la interpretación, posiblemente debido a la necesidad de seleccionar un nivel de clasificación. Como se puede observar, muchas de las categorías que obtenemos son demasiado generales como para extraer conclusiones (regulación de procesos celulares, biosíntesis, regulación de procesos fisiológicos, metabolismo celular...). Sí obtenemos, sin embargo, varios de los procesos que ya identificamos previamente con los programas Panther e Ingenuity, como transporte, muerte celular, factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto y metabolismo de ácidos grasos.

**Tabla 9.** Clasificación según categorías de GO y KEGG realizado con el programa DAVID. Count: número de genes en cada categoría; %: porcentaje de genes en cada categoría respecto a las 5.102 secuencias; p-value: valor de significancia.

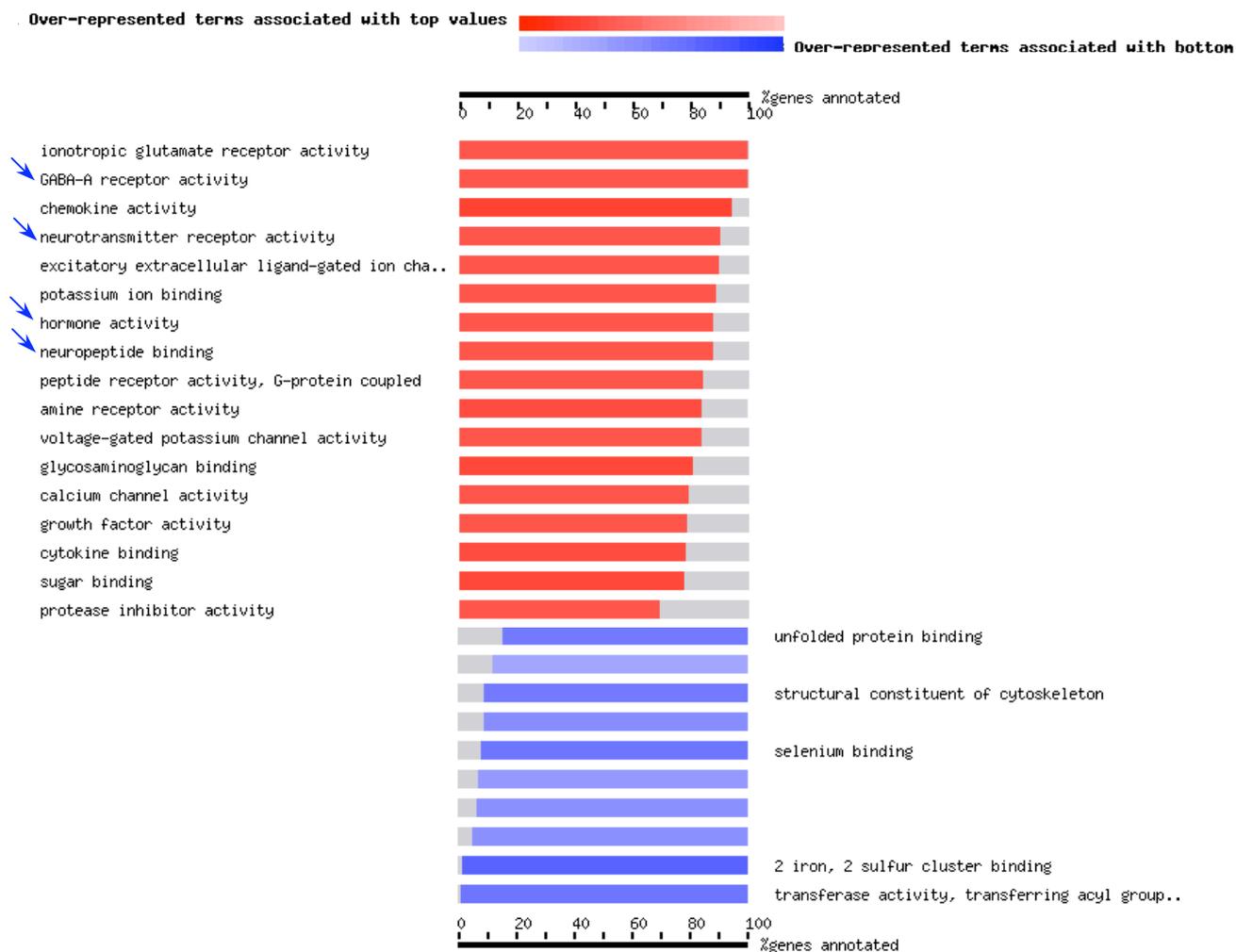
<b>Biological Process</b>	<b>Count</b>	<b>%</b>	<b>PValue</b>
Cellular metabolism	1476	31.78%	5.11E-41
Primary metabolism	1426	30.71%	5.58E-40
Macromolecule metabolism	943	20.31%	4.45E-29
Biosynthesis	384	8.27%	7.74E-22
Cell organization and biogenesis	475	10.23%	5.97E-19
Establishment of localization	735	15.83%	3.62E-18
Cellular localization	217	4.67%	1.11E-17
Transport	644	13.87%	1.45E-16
Protein localization	184	3.96%	7.64E-13
Regulation of cellular physiological process	646	13.91%	5.70E-12
Catabolism	173	3.73%	6.84E-09
Negative regulation of physiological process	224	4.82%	8.52E-09
Negative regulation of cellular process	238	5.12%	3.34E-08
Cell death	185	3.98%	9.23E-08
Positive regulation of cellular process	213	4.59%	1.62E-05
<b>Molecular Function</b>	<b>Count</b>	<b>%</b>	<b>PValue</b>
RNA binding	153	3.29%	6.03E-14
Translation factor activity, nucleic acid binding	49	1.06%	7.61E-14
Purine nucleotide binding	296	6.37%	5.54E-12
Translation initiation factor activity	32	0.69%	4.60E-11
Hydrolase activity, acting on acid anhydrides	146	3.14%	9.50E-07
Transcription factor binding	99	2.13%	8.13E-06
Cytoskeletal protein binding	100	2.15%	1.19E-05
Metal ion binding	468	10.08%	2.56E-05
Carbon-carbon lyase activity	20	0.43%	2.66E-05
Unfolded protein binding	39	0.84%	5.99E-05
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	222	4.78%	1.19E-04
Enzyme binding	62	1.34%	2.78E-04
Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	42	0.90%	4.28E-04
Signal sequence binding	11	0.24%	7.06E-04
Protein domain specific binding	41	0.88%	0.00130728
<b>KEGG</b>	<b>Count</b>	<b>%</b>	<b>PValue</b>
Proteasome	18	0.39%	1.73E-05
Ribosome	31	0.67%	1.87E-04
Valine, Leucine And Isoleucine degradation	22	0.47%	1.90E-04
Citrate cycle (TCA Cycle)	14	0.30%	2.22E-04
Fatty acid metabolism	23	0.50%	3.12E-04
Oxidative phosphorylation	47	1.01%	0.002326741
Carbon fixation	13	0.28%	0.002749746
Adherens junctions	33	0.71%	0.003900382
Ribosome	10	0.22%	0.006734798
Huntington's disease	14	0.30%	0.008234076
Glutamate metabolism	14	0.30%	0.008234076
Focal adhesion	74	1.59%	0.012286949
Insulin signalling pathway	49	1.06%	0.014929198
Cholera-infection	6	0.13%	0.015117997
ECM-Receptor interaction	31	0.67%	0.019840103

### 1.3.3.2 Nuevas propuestas: “*gene-set enrichment*”

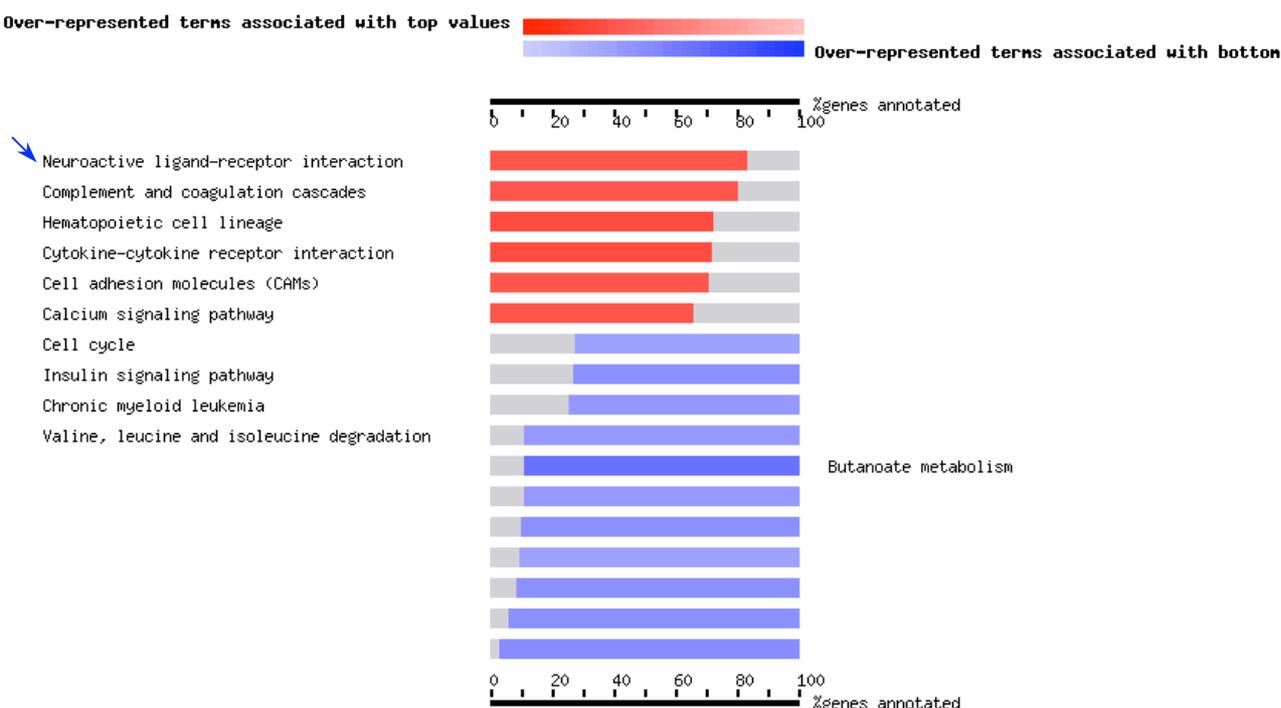
Este tipo de estrategia consiste en realizar el análisis funcional de los datos de microarrays sin hacer ninguna preselección de genes según criterios como superar un determinado FC o valor de  $p$ , como ocurría en los análisis tradicionales. La herramienta informática empleada para este análisis es el programa FatiScan, que además de no eliminar genes que no superen un umbral de corte elegido de manera arbitraria, aproximándose así al enfoque de la Biología de Sistemas, no requiere tampoco una selección del nivel de clasificación de las categorías de GO, sino que las analiza todas, eligiendo posteriormente aquella que sea más significativa en cada caso (ver apartado 5.9 de *Métodos*). De esta forma, podemos observar como, utilizando la misma base de datos que utiliza el programa DAVID (GeneOntology), el resultado tiene mucho más sentido para la enfermedad que estamos estudiando. La figura 40, que representa los procesos biológicos significativos identificados por FatiScan, claramente indica que los animales sufren un proceso inflamatorio (incremento en la producción y metabolismo de quimiokinas, respuesta de fase aguda, quimiotaxis de leucocitos, coagulación...). Además, encontramos alteración en los procesos digestivos, no identificado con ninguno de los programas anteriores, y de nuevo alteración en procesos neurológicos (ruta de señalización por neuropéptidos, regulación de los niveles de neurotransmisores, actividad del receptor GABA...) -ver figuras 40, 41 y 42-. Un proceso llamativo es también la alteración de la síntesis y actividad hormonal (*Figuras 40 y 41*), que parece estar sobreexpresada. Entre los procesos que parecen estar desactivados destaca la respuesta al estrés oxidativo, previamente descrito (133). También llama la atención que, a pesar de que hay más genes con menor expresión que aquellos sobreexpresados, la mayoría de los procesos significativos que identificamos están sobreexpresados, y solo unos pocos reprimidos. Esto podría indicar que, aunque haya muchos genes reprimidos, puede que no encajen en ningún proceso concreto de manera significativa.



**Figura 40.** Clasificación de los procesos biológicos identificados con el programa FatiScan en el modelo de DSS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a procesos asociados con genes sobreexpresados. Los que aparecen junto a las barras azules, contiene los procesos asociados con los genes reprimidos.



**Figura 41.** Clasificación de las funciones moleculares identificadas con el programa FatiScan en el modelo de DSS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a funciones asociadas con genes sobreexpresados. Las que aparecen junto a las barras azules, contiene las funciones asociadas con los genes reprimidos.



**Figura 42.** Clasificación de las rutas significativas identificadas con el programa FatiScan en el modelo de DSS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a rutas asociadas con genes sobreexpresados. Las que aparecen junto a las barras azules, contiene las rutas asociadas con los genes reprimidos.

### 1.4 Validación de genes por PCR a tiempo real

Los análisis funcionales realizados en el apartado anterior, nos dan como resultado los procesos, funciones o rutas que están afectados de manera significativa en la fase aguda de la colitis inducida por DSS (grupo DSS5%). Para poder obtener resultados de cuáles son los genes concretos que están implicados en dichos procesos, es necesaria la comprobación de los cambios detectados mediante otras técnicas. Dicha validación la realizamos mediante PCR a tiempo real, para lo cual se seleccionaron varios genes en función de su cambio de expresión, o porque fuesen interesantes para ser estudiados en este modelo. La tabla 11 muestra los genes cuyo cambio de expresión ha sido confirmado (ver Anexo 3). Entre ellos encontramos genes cuya implicación en la colitis ya se conoce, como *Il1a*, *Il6*, *Nos2*, *Ccl2* o *Tnf*. Otros genes interesantes son el *Cd68*, que es un marcador de macrófagos, el gen *Cdx2*, que codifica un factor de transcripción esencial para el desarrollo y mantenimiento de la célula epitelial intestinal, el gen *Faah* que hidroliza amidas de ácidos grasos incluyendo compuestos neuromoduladores como la anandamida, y el gen *Htrb2*, que codifica para un receptor de la serotonina.

Símbolo	Título	Microarrays	qPCR
---------	--------	-------------	------

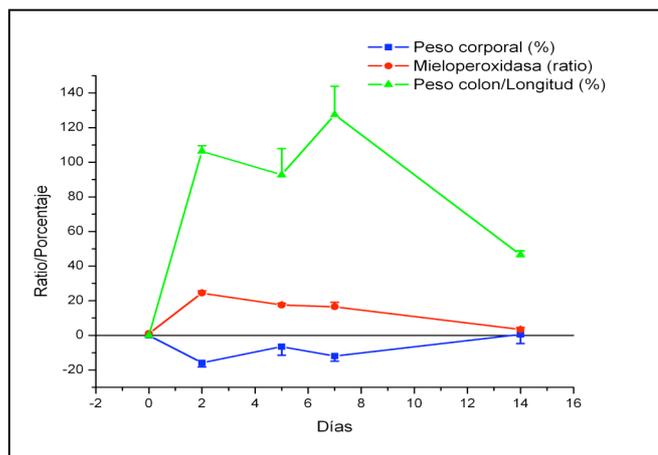
Tabla 10. Genes confirmados por PCR a tiempo real, en el modelo de DSS.

		FC	p-value	Log10RQ	p-value
A2m	alpha-2-macroglobulin	2.38	2.29E-03	0.78	2.82E-02
Adk	adenosine kinase	-3.17	6.70E-10	-0.3	1.05E-02
Adora1	adenosine A1 receptor	1.07	5.84E-06	0.57	1.65E-03
Card9	caspase recruitment domain family, member 9	0.74	1.29E-04	0.34	2.81E-04
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1.68	4.72E-02	0.64	1.24E-02
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	1.58	5.48E-07	1.29	2.95E-03
Cd68	CD68 antigen	1.02	3.08E-06	0.47	1.23E-03
Cdx2	caudal type homeo box 2	-2.25	2.03E-08	-0.33	3.93E-02
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	1.50	2.34E-02	1.95	1.05E-04
Faah	fatty acid amide hydrolase	-0.77	5.73E-04	-0.39	5.01E-03
Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	0.91	2.80E-02	0.52	3.53E-03
Il10	interleukin 10	0.32	1.06E-03	0.76	5.81E-03
Il10ra	interleukin 10 receptor, alpha	1.23	1.08E-05	0.37	1.90E-03
Il11	interleukin 11	1.09	6.38E-05	1.26	8.16E-03
Il18bp	interleukin 18 binding protein	0.65	7.77E-03	0.36	5.98E-03
Il1a	interleukin 1 alpha	1.98	2.01E-04	1.07	1.56E-05
Il1b	interleukin 1 beta	2.16	2.46E-05	0.94	5.87E-04
Il1r1	interleukin 1 receptor, type I	0.57	9.43E-05	0.31	2.41E-02
Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	0.65	1.26E-01	0.59	4.10E-02
Il1rl2	interleukin 1 receptor-like 2	0.74	1.75E-04	0.54	1.58E-02
Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	0.76	6.98E-04	0.92	1.76E-05
Il2ra	interleukin 2 receptor, alpha chain	0.43	9.92E-05	0.62	1.28E-05
Il6	interleukin 6	2.32	3.19E-03	1.19	1.82E-03
Il8rb	interleukin 8 receptor, beta	0.66	1.66E-03	1.09	3.64E-03
Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	-2.16	1.54E-10	-0.45	4.48E-03
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	0.52	9.25E-04	1.74	2.13E-04
Npr1	natriuretic peptide receptor 1	0.94	3.76E-03	0.51	2.97E-03
Ripk3	receptor-interacting serine-threonine kinase 3	0.57	3.13E-02	0.42	1.91E-03
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	3.43	1.16E-02	1.48	1.60E-02
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	3.88	6.88E-04	1.47	1.73E-03
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	0.42	1.21E-05	0.8	7.06E-04
Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	0.89	3.44E-04	0.78	5.45E-05
Tnf	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	0.60	1.57E-03	0.67	8.49E-04

## 2. Resultados del modelo de ácido trinitrobenzenosulfónico

## 2.1 Desarrollo y evolución de la colitis

Los animales tratados con TNBS presentaron signos de anorexia, pérdida de peso y diarreas, consistentes con las características descritas en este modelo. El daño en la mucosa estaba caracterizado por edema, hemorragia y necrosis epitelial. También se observó un intenso infiltrado celular inflamatorio, como muestra el incremento en la actividad mieloperoxidasa así como un fuerte acortamiento de la longitud del colon y engrosamiento de la pared intestinal (Figura 43). La regeneración epitelial ocurrió de forma gradual aproximadamente desde el día 7 hasta el 14.

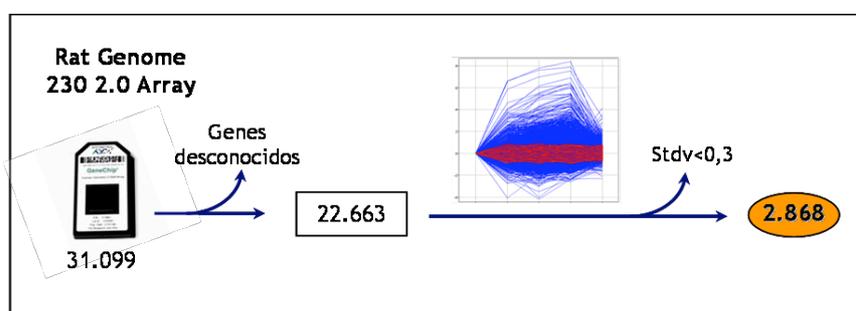


**Figura 43.** Cambios en marcadores de inflamación intestinal durante la colitis inducida por TNBS. Los animales recibieron un único enema de TNBS (día 0). La colitis aguda aparece entre los días 2-7 y posteriormente los animales se recuperan de forma gradual.

## 2.2 Análisis genómico temporal

### 2.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes

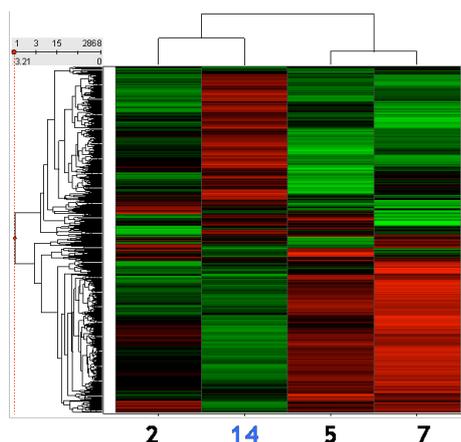
Realizamos el proceso de filtrado (Figura 44) eliminando primero las sondas no anotadas y seleccionando después aquellas con una desviación estándar mayor de 0,3 entre todos los tiempos, obteniendo así una lista de 2.868 secuencias para realizar el análisis temporal.



**Figura 44.** Proceso de filtrado de genes para el análisis temporal realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (8.436) y a continuación, aquellos que no presentan variación a lo largo de todos los tiempos (marcados en rojo). Las secuencias seleccionadas según estos criterios son 2.868 (marcadas en azul).

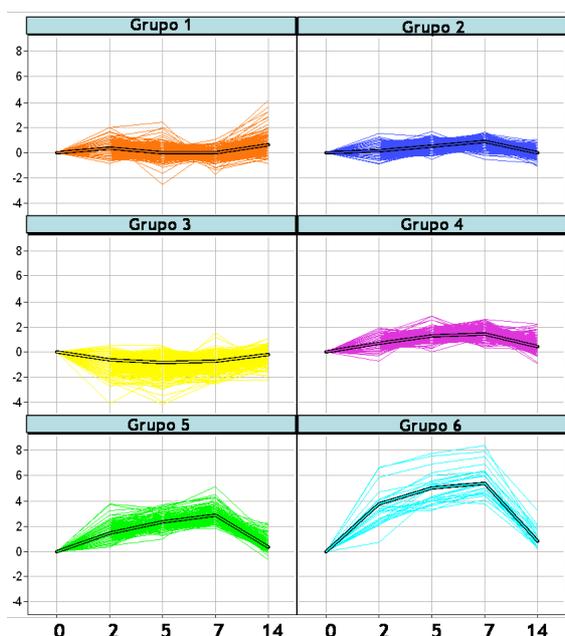
### 2.2.1 Análisis de agrupamiento de muestras

En el agrupamiento jerárquico (Figura 45) se observan dos grupos, uno compuesto por los días 5 y 7, y un segundo grupo que incluye los días 2 y 14. Al igual que ocurría en el modelo de DSS con el día 1, el día 2 en el modelo de TNBS, es decir, al comienzo de la inflamación, el daño es aún leve ya que aparece emparejado con el día de recuperación (día 14). Este es un dato muy importante a tener en cuenta en el estudio de expresión diferencial de la fase de colitis aguda, en el que habrá que descartar el día 2 e incluir solo los días 5 y 7.



**Figura 45.** Cluster jerárquico representando los 4 tiempos incluidos en el modelo y las 2.868 secuencias. Este análisis se realizó con el programa Spotfire.

### 2.2.2 Agrupamiento de genes



**Figura 46.** Agrupamiento en *k*-medias de las 2.868 secuencias incluidas en el análisis temporal. El número de genes incluidos en cada grupo es: grupo 1 (276), grupo 2 (685), grupo 3 (1.194), grupo 4 (540), grupo 5 (147), grupo 6 (26).

La figura 46 muestra el agrupamiento en *k*-medias de las 2.868 secuencias a lo largo de los 14 días del experimento. En general no se observan perfiles llamativos, únicamente vemos que la expresión se afecta de manera gradual (aumenta o disminuye) durante la fase aguda (hasta el día 7) y que tienden a valores normales hacia el día 14. Sin embargo, en el grupo 1 se aprecian algunos genes que parecen incrementarse principalmente el día 14, los cuales podrían estar implicados en los mecanismos de reparación, mientras que en el grupo 4 aparecen genes con una expresión más o menos crónica ya que se alteran tanto en la fase aguda de la inflamación como en el día 14. El grupo 6 contiene los genes con mayor cambio en la expresión y como se muestra en la tabla 12, incluye numerosos genes de inflamación, como *Il1a*, *Il1b*, *S100a8*, *S100a9*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl3*, componente 3 del complemento (*C3*), receptor del factor estimulante de colonias 3 (*Csf3r*)...

Tabla 11. 26 genes incluidos en el grupo 6.

ProbelD	Símbolo	Título	Localización cromosómica
1367794_at	A2m	Alpha-2-macroglobulin	chr4q42
1382680_at	Anp32e	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	chr2q34
1368000_at	C3	Complement component 3	chr9q11
1369815_at	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	chr10q26
1392171_at	Chi3l1	Chitinase 3-like 1	chr13q13
1386009_at	Csf3r	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	chr5q36
1387316_at	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	chr14p22
1368760_at	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	chr13q22
1367850_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	chr13q24
1398246_s_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	chr13q24
1368187_at	Gpnmb	Glycoprotein (transmembrane) nmb	chr4q24
1385590_at	Gpr109a	G protein-coupled receptor 109A	chr12q15
1370080_at	Hmox1	Heme oxygenase (decycling) 1	chr19p11
1376908_at	Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	chr1q52
1387687_at	Igsf6	Immunoglobulin superfamily, member 6	chr1q36
1398256_at	Il1b	Interleukin 1 beta	chr3q36
1387180_at	Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II	chr9q21
1387011_at	Lcn2	Lipocalin 2	chr3p11
1390687_at	Plek	Pleckstrin	chr14q22
1368527_at	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	chr13q21
1393978_at	RGD1560676	Similar to stefin A2 (predicted)	chr11q22
1368494_at	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	chr2q34
1387125_at	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	chr2q34
1387134_at	Slfn3	Schlafen 3	chr10q26
1367998_at	Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	chr3q42
1370051_at	Tgm1	Transglutaminase 1	chr15p13

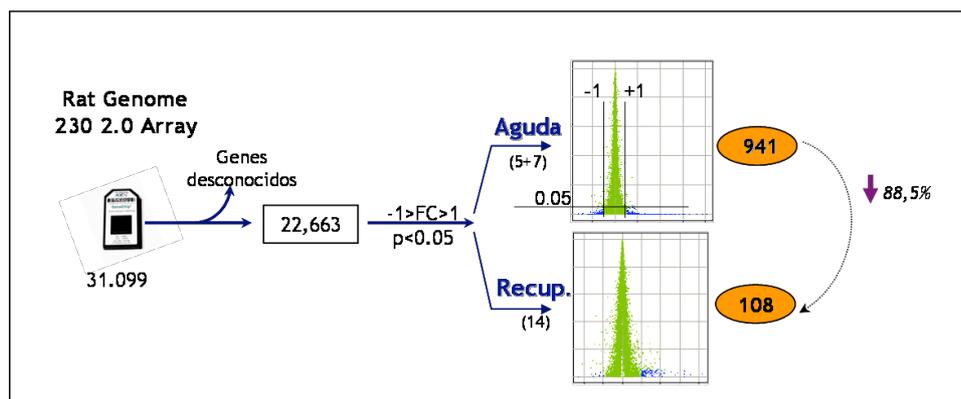
## 2.3 Análisis de expresión diferencial

### 2.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

Siguiendo los mismos criterios que en el modelo de DSS, en primer lugar definimos los grupos de muestras, en función de los resultados obtenidos en el agrupamiento jerárquico:

- grupo TNBS-colitis: días 5+7
- grupo TNBS-recuperación: día 14

A continuación, para cada uno de los grupos se realizó el filtrado eliminando las sondas no anotadas y aquellas con un FC entre -1 y 1 o con un valor de  $p > 0,05$ . Como resultado se obtuvieron 941 secuencias significativas en la fase de colitis aguda (grupo TNBS-colitis), de las cuales 711 estaban sobreexpresadas y 230 reprimidas, y 108 secuencias significativas en la fase de recuperación de la inflamación (grupo TNBS-recuperación) -con 99 secuencias sobreexpresadas y 9 reprimidas-. Como se puede observar en la figura 47, el día 14 tras la administración del TNBS, la recuperación ocurre en el 88,5% de los genes alterados en la colitis aguda.



**Figura 47.** Proceso de filtrado de genes para el análisis de expresión diferencial realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (8.436) y a continuación se seleccionaron las secuencias que presentasen un cambio de expresión mayor o menor que 1 y un valor de  $p < 0,05$ .

Los genes que presentan un cambio más acusado se resumen en las tablas 12 (con los 50 genes con mayor expresión) y 13 (50 genes con menor expresión). En la primera de ellas lógicamente aparecen numerosos marcadores de inflamación y genes de inmunidad, como interleukinas, quimiocinas, receptores de inmunoglobulinas (*Fcgr1*, *Fcgr2b*), óxido nítrico sintasa (*Nos2*) o el inhibidor de metaloproteasas *Timp1*. Entre los genes que presentan disminución de la expresión hay varios relacionados con el metabolismo lipídico, como *Acaa2*, *Apoa1* y *Scd1*, o la anhidrasa carbónica 2 (*Ca2*), relacionada con la morfogénesis epitelial. Además destacan cuatro sondas diferentes para el mismo gen, la osteoglycina (*Ogn*), que interviene en la inducción de formación de hueso.

Tabla 12. 50 genes con mayor expresión en el grupo TNBS-colitis.

ProbeID	Gene Symbol	Gene Title	Media FC TNBSaguda	Chromosomal Location	GO Biological Process
1367794_at	A2m	alpha-2-macroglobulin	5.66	chr4q42	intracellular protein transport
1388924_at	Angptl4	angiopoietin-like 4	3.31	chr7q12	angiogenesis
1382680_at	Anp32e	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	4.11	chr2q34	---
1368266_at	Arg1	arginase 1	4.15	chr1p12	urea cycle
1368482_at	Bcl2a1	B-cell leukemia	3.05	chr8q31	anti-apoptosis
1369294_at	Bst1	bone marrow stromal cell antigen 1	3.17	chr14q21	---
1368000_at	C3	complement component 3	5.05	chr9q11	positive regulation of type IIa hypersensitivity
1367973_at	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.50	chr10q26	positive regulation of endothelial cell proliferation
1369815_at	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	4.90	chr10q26	calcium ion homeostasis
1379935_at	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	3.50	chr10q26	transport
1370083_at	Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	3.11	chr8q32	inflammatory response
1375010_at	Cd68	CD68 antigen	3.21	chr10q24	---
1392171_at	Chi3l1	chitinase 3-like 1	4.31	chr13q13	carbohydrate metabolism
1386009_at	Csf3r	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	4.75	chr5q36	neutrophil chemotaxis
1388054_a_at	Cspg2	chondroitin sulfate proteoglycan 2	3.17	chr2q12	physiological response to wounding
1387316_at	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	5.70	chr14p22	inflammatory response
1368760_at	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	8.08	chr14p22	chemotaxis
1393038_at	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	3.29	chr2q34	antibody-dependent cellular cytotoxicity
1371079_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	3.56	chr13q24	negative regulation of type I hypersensitivity
1367850_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	4.55	chr13q24	antibody-dependent cellular cytotoxicity
1398246_s_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	4.14	chr13q24	antibody-dependent cellular cytotoxicity
1368693_at	Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog	3.05	chr5q36	protein amino acid phosphorylation
1375917_at	Gp49b	glycoprotein 49b	3.96	chr1q12	---
1368187_at	Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	3.69	chr4q24	osteoblast differentiation
1385590_at	Gpr109a	G protein-coupled receptor 109A	5.58	chr12q15	signal transduction
1370080_at	Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1	3.85	chr19p11	angiogenesis
1376908_at	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	4.81	chr1q52	---
1387687_at	Igsf6	immunoglobulin superfamily, member 6	4.37	chr1q36	immune response
1368592_at	Il1a	interleukin 1 alpha	3.94	chr3q36	regulation of progression through cell cycle
1398256_at	Il1b	interleukin 1 beta	6.55	chr3q36	regulation of progression through cell cycle
1387180_at	Il1r2	interleukin 1 receptor, type II	5.99	chr9q21	immune response
1387011_at	Lcn2	lipocalin 2	5.95	chr3p11	apoptosis
1373575_at	LOC498279	similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	3.42	chr13q24	positive regulation of type IIa hypersensitivity
1391453_at	LOC680609	similar to Interleukin-27	3.22	---	---

RESULTADOS

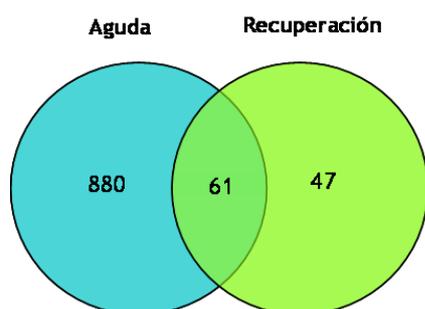
		beta chain precursor (IL-27B)			
1374626_at	<b>Lrg1</b>	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	3.61	---	---
1387667_at	<b>Nos2</b>	nitric oxide synthase 2, inducible	3.49	chr10q25	response to hypoxia
1387422_at	<b>Pglyrp1</b>	peptidoglycan recognition protein 1	3.97	chr1q21	immune response
1390687_at	<b>Plek</b>	pleckstrin	6.16	chr14q22	intracellular signaling cascade
1368527_at	<b>Ptgs2</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5.25	chr13q21	regulation of progression through cell cycle
1393978_at	<b>RGD1560676</b>	similar to stefin A2	4.07	chr11q22	---
1382692_at	<b>RGD1565140</b>	similar to Clecsf12 protein	3.80	chr4q42	---
1382603_at	<b>RGD1566211</b>	Similar to PD-1-ligand precursor	3.05	chr1q52	---
1392754_at	<b>RGD1566394</b>	similar to cysteine-rich glycoprotein	3.98	chr1q41	---
1368494_at	<b>S100a8</b>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	7.23	chr2q34	chemotaxis
1387125_at	<b>S100a9</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	7.75	chr2q34	inflammatory response
1387134_at	<b>Slfn3</b>	schlafen 3	5.35	chr10q26	T cell differentiation
1367998_at	<b>Slpi</b>	secretory leukocyte peptidase inhibitor	4.37	chr3q42	---
1370051_at	<b>Tgm1</b>	transglutaminase 1	4.28	chr15p13	protein modification
1367712_at	<b>Timp1</b>	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	3.04	chrXq12	cell activation
1374730_at	<b>Txnrd3</b>	Thioredoxin reductase 3	3.11	4q34	---

Tabla 13. 50 genes con menor expresión en el grupo TNBS-colitis.

ProbeID	Gene Symbol	Gene Title	Media FC TNBSaguda	Chromosomal Location	GO Biological Process
1390783_at	<b>Abca8a</b>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a	-1.76	chr10q32.1	transport
1391279_at	<b>Acaa2</b>	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	-1.78	chr18q12.3	lipid metabolism
1368780_at	<b>Adrb3</b>	adrenergic receptor, beta 3	-1.52	chr16q12.3	diet induced thermogenesis
1394681_at	<b>Akr1c1</b>	aldo-keto reductase family 1, member C-like 1	-1.91	chr17q12.3	---
1370299_at	<b>Aldob</b>	aldolase B	-2.46	chr5q22	fructose metabolism
1391409_at	<b>Amn</b>	amniotic membrane	-2.42	chr6q32	excretion
1368335_at	<b>Apoa1</b>	apolipoprotein A-I	-3.26	chr8q23-q24	lipid metabolism
1372065_at	<b>Art3</b>	ADP-ribosyltransferase 3	-1.93	chr14p22	protein amino acid ADP-ribosylation
1386922_at	<b>Ca2</b>	carbonic anhydrase 2	-1.75	chr2q23	morphogenesis of an epithelium
1367733_at	<b>Ca2</b>	carbonic anhydrase 2	-1.69	chr2q23	morphogenesis of an epithelium
1368034_at	<b>Chgb</b>	chromogranin B	-1.67	chr3q36	---
1380432_at	<b>Cmah</b>	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	-2.19	chr17p11	electron transport
1384476_at	<b>Cmah</b>	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	-1.62	chr17p11	electron transport
1368281_at	<b>Dpep1</b>	dipeptidase 1 (renal)	-2.16	chr19q12	proteolysis
1368282_at	<b>Dpep1</b>	dipeptidase 1 (renal)	-2.04	chr19q12	proteolysis
1369536_at	<b>Edn2</b>	endothelin 2	-1.92	chr5q36	ovarian follicle rupture
1390112_at	<b>Efemp1</b>	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-1.88	chr14q22	visual perception
1387631_at	<b>Hpgd</b>	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	-1.69	chr16p11	prostaglandin metabolism
1391765_at	<b>Lrrc48</b>	leucine rich repeat containing 48	-2.30	chr10q22	---
1375983_at	<b>Mamdc2</b>	MAM domain containing 2	-1.67	chr1q51	---
1368236_at	<b>Mep1a</b>	mepirin 1 alpha	-1.63	chr9q12	proteolysis
1384818_at	<b>Mylk</b>	myosin, light polypeptide kinase	-1.64	chr11q22	protein amino acid phosphorylation
1369717_at	<b>Nmu</b>	neuromedin U	-1.66	---	regulation of smooth muscle contraction
1370816_at	<b>Nr1d1</b>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	-2.26	chr10q31	regulation of transcription, DNA-dependent
1376749_at	<b>Ogn</b>	osteoglycin	-2.16	chr17p14	---
1385248_a_at	<b>Ogn</b>	osteoglycin	-2.07	chr17p14	---
1383263_at	<b>Ogn</b>	osteoglycin	-1.73	chr17p14	---
1390450_a_at	<b>Ogn</b>	osteoglycin	-1.63	chr17p14	---
1372264_at	<b>Pck1</b>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	-1.58	chr3q42	gluconeogenesis
1368358_a_at	<b>Ptprr</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	-1.81	chr7q22	embryonic development (sensu Mammalia)
1371260_at	<b>RGD1304927</b>	Similar to KIAA1411 protein	-1.78	chr9q13	---
1398365_at	<b>RGD1305061</b>	similar to RIKEN cDNA 2700055K07	-1.50	chr19q11	---
1370157_at	<b>RGD1305633</b>	Similar to RIKEN cDNA 2600005C20	-1.56	chr20p12	---
1372646_at	<b>RGD1305645</b>	similar to RIKEN cDNA 1500015O10	-1.55	chr9q22	---
1371677_at	<b>RGD1307150</b>	similar to Esophagus cancer-related gene-2 protein precursor	-1.66	chr8q32	---
1389690_at	<b>RGD1311103</b>	similar to RIKEN cDNA 2410146L05	-1.62	chr8q31	---
1378675_at	<b>RGD1561831</b>	similar to transglutaminase E3	-1.56	chr3q36	---

1372296_at	<b>RGD1563599</b>	similar to putative SH3BGR protein	-1.74	chr11q11	---
1396304_at	<b>RT1-Aw2</b>	RT1 class Ib, locus Aw2	-2.90	chr20p12	antigen processing and presentation of endogenous antigen
1370355_at	<b>Scd1</b>	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	-2.41	chr1q54	fatty acid biosynthesis
1388051_at	<b>Slc26a3</b>	solute carrier family 26, member 3	-1.57	chr6q16	anion transport
1367989_at	<b>Slc2a4</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	-1.52	chr10q24	carbohydrate metabolism
1387542_at	<b>Slc9a3</b>	solute carrier family 9 (sodium	-2.87	chr1p11	regulation of sodium ion transport
1396885_at	<b>Smtn</b>	smoothelin	-1.75	chr14q21	smooth muscle contraction
1369770_at	<b>Sstr1</b>	somatostatin receptor 1	-2.35	chr6q23	signal transduction
1387754_at	<b>Tacr2</b>	tachykinin receptor 2	-1.71	---	muscle contraction
1371400_at	<b>Thrsp</b>	thyroid hormone responsive protein	-1.76	chr1q32	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
1372195_at	<b>Tnnc2</b>	troponin C type 2 (fast)	-1.58	chr3q42	regulation of muscle contraction
1388145_at	<b>Tnxa</b>	tenascin XA	-1.59	---	muscle development
1370881_at	<b>Tst</b>	thiosulfate sulfurtransferase	-1.54	chr7q34	cyanate catabolism

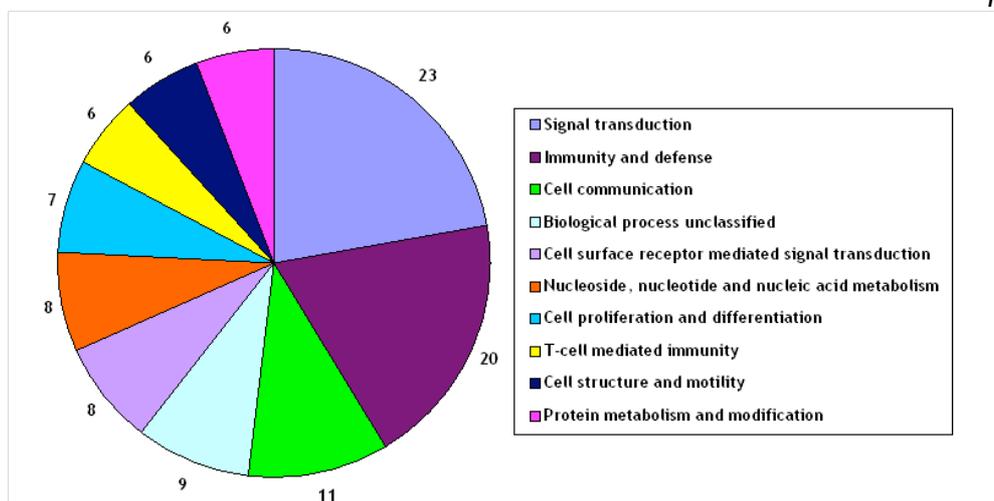
### 2.3.2 Comparación de las fases



**Figura 48.** Diagrama de Venn, comparando el grupo TNBS-colitis (días 5+7; 941 secuencias) y el grupo TNBS-recuperación (día 14; 108 secuencias).

La figura 48 muestra la comparación de los genes diferencialmente expresados en los grupos TNBS-colitis (941 secuencias) y TNBS-recuperación (108 secuencias). Se puede observar que de las 941 secuencias significativas en la fase de colitis aguda, solo 61 siguen alteradas el día 14. Entre estos genes crónicos se incluyen la lipocalina 2 (*Lcn2*), lisozima (*Lyz*), calgranulinas A y B (*S100a8*, *S100a9*), la metaloproteasa 12 (*Mmp12*), varias quimiocinas y algunos marcadores de linfocitos como *Lcp1* y *Ly86*. La figura 49 muestra los 10 procesos biológicos mayoritarios en los que están implicados dichos genes. Aparece también un grupo de 47 secuencias que solo se desregulan en el

grupo TNBS-recuperación que, al igual que ocurría con la lista de 26 secuencias identificadas en el modelo de DSS (apartado 1.3.2 de Resultados), podrían intervenir en los procesos de reparación. Muchos de estos genes están implicados en la respuesta inmune, como varios antígenos CD3 (*Cd3d*, *Cd3g*, *Cde*, *Cdz*), genes de inmunoglobulinas (*Igh-1a*, *Igha*), linfotóxina B (*Ltb*) o el péptido trébol 2 (*Tff2*).



**Figura 49.** Procesos biológicos según en programa Panther más representativos en el grupo de 61 genes comunes entre los grupos TNBS-colitis y TNBS-recuperación. Los números indican el número de genes incluidos en cada categoría.

### 2.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda (grupo TNBS-colitis)

El análisis funcional de la colitis aguda en el modelo de TNBS se realizó siguiendo la misma estrategia que en el modelo de DSS: primero un análisis funcional de tipo tradicional, empleando listas de genes seleccionadas tras el proceso de filtrado (“*functional enrichment*”), y en segundo lugar, un análisis funcional global de tipo “*gene-set enrichment*”.

#### 2.3.3.1 Análisis tradicional: “*functional enrichment*”

##### Análisis con el programa Panther

Las tablas 14, 15 y 16 muestran el análisis de rutas, procesos biológicos y funciones moleculares de las 941 secuencias diferencialmente expresadas en el grupo TNBS-colitis. Podemos observar la alteración en procesos inmunes (Inflamación mediada por quimiocinas y citocinas, ruta de señalización por interleucinas, angiogénesis, procesos de inmunidad y defensa...), así como funciones interesantes que también identificamos en el modelo de DSS, como el metabolismo lipídico y de carbohidratos y procesos de neurogénesis y actividad neuronal. El modelo de TNBS muestra además una importante implicación de la proteólisis, con 17 metaloproteasas, proteínas de la matriz extracelular (55 genes) y citoesqueleto (36 genes) y la alteración en 13 genes relacionados con péptidos hormonales.

**Tabla 14.** Clasificación en rutas según el programa Panther. La primera columna de números representa los genes incluidos en la base de datos NCBI para cada categoría, y la segunda son los genes de cada categoría que están en la lista de 941 secuencias. Las rutas nombradas en el texto están marcadas en gris.

PathwayS	NCBI: R. novergicus genes	Fase TNBS-aguda (941 secuencias)
Unclassified	23307	544
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	318	36
Integrin signalling pathway	238	23
Blood coagulation	60	15
Angiogenesis	222	15
Wnt signaling pathway	370	15
T cell activation	117	12
Interleukin signaling pathway	167	11
Apoptosis signaling pathway	176	11
Plasminogen activating cascade	17	10
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha	175	10
Cadherin signaling pathway	176	9
Alzheimer disease-presenilin pathway	139	7
TGF-beta signaling pathway	155	7
Parkinson disease	118	7
PDGF signaling pathway	178	7
B cell activation	95	7
p53 pathway	135	6
VEGF signaling pathway	84	6
Toll receptor signaling pathway	87	6
Endothelin signaling pathway	104	6
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha	148	5
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	114	5
Axon guidance mediated by Slit/Robo	35	4
Axon guidance mediated by semaphorins	48	4
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	92	4
Pyrimidine Metabolism	14	3
Ionotropic glutamate receptor pathway	58	3
Huntington disease	173	3
EGF receptor signaling pathway	145	3
Axon guidance mediated by netrin	43	2
Ubiquitin proteasome pathway	108	2
PI3 kinase pathway	126	2
Oxidative stress response	78	2
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	60	2
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	79	2
JAK/STAT signaling pathway	23	2
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	94	2
Ras Pathway	91	2
Glycolysis	44	2
General transcription by RNA polymerase I	22	2
FGF signaling pathway	140	2
Salvage pyrimidine ribonucleotides	17	2
Enkephalin release	37	2
Circadian clock system	15	2

**Tabla 15.** Clasificación en procesos biológicos según el programa Panther. Los procesos nombrados en el texto aparecen marcados en gris.

Biological process	NCBI: R. novergicus genes	Fase TNBS-aguda (941 secuencias)
Signal transduction	4044	249
Immunity and defense	1505	158
Biological process unclassified	10908	136
Developmental processes	2141	132
Protein metabolism and modification	3538	125
Cell communication	1163	120
Cell surface receptor mediated signal transduction	2287	118
Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	3221	79
Cell structure and motility	1100	74
Intracellular signaling cascade	875	66
Cell proliferation and differentiation	898	61
Proteolysis	1070	60
Transport	1353	58
Cell adhesion	594	56
mRNA transcription	1718	49
Lipid, fatty acid and steroid metabolism	835	48
Protein modification	1266	48
Ligand-mediated signaling	390	47
Mesoderm development	566	46
Ectoderm development	677	43
Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	238	40
G-protein mediated signaling	1517	40
Cell structure	685	39
mRNA transcription regulation	1266	39
Cell adhesion-mediated signaling	386	38
Protein phosphorylation	736	36
Intracellular protein traffic	984	36
Cell motility	331	34
Cell cycle	978	33
Neurogenesis	589	32
Apoptosis	577	31
Oncogenesis	423	27
Macrophage-mediated immunity	160	24
Other metabolism	608	24
T-cell mediated immunity	296	23
Cell cycle control	439	23
Neuronal activities	688	23
Carbohydrate metabolism	588	21
Ion transport	636	21
Blood clotting	83	20
Stress response	228	20
Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	205	19
Other receptor mediated signaling pathway	209	18
Homeostasis	214	17
Cation transport	497	17

**Tabla 16.** Clasificación en funciones moleculares según el programa Panther. Las funciones nombradas en el texto aparecen marcadas en gris.

Molecular Function	NCBI: R. novergicus genes	Fase TNBS-aguda (941 secuencias)
Molecular function unclassified	10535	137
Receptor	2222	106
Signaling molecule	773	93
Select regulatory molecule	1206	57
Extracellular matrix	364	55
Nucleic acid binding	3175	53
Transcription factor	1816	53
Defense/immunity protein	428	46
Miscellaneous function	876	45
Protease	617	43
Cell adhesion molecule	416	36
Cytoskeletal protein	840	36
Oxidoreductase	732	35
Transferase	917	33
Transporter	662	32
Kinase	780	31
Other miscellaneous function protein	443	29
Other signaling molecule	244	28
Other receptor	284	28
Actin binding cytoskeletal protein	371	26
Protein kinase	611	25
G-protein coupled receptor	1212	24
Hydrolase	736	22
Select calcium binding protein	281	21
Extracellular matrix glycoprotein	91	19
Extracellular matrix structural protein	79	18
Transfer/carrier protein	384	18
Other transcription factor	371	18
Cytokine receptor	82	17
Metalloprotease	178	17
Serine protease	230	16
G-protein modulator	382	16
Calmodulin related protein	158	15
Non-motor actin binding protein	169	15
Protease inhibitor	182	15
Complement component	49	14
Other transporter	335	14
Peptide hormone	111	13
Cytokine	113	13
Membrane traffic protein	326	12
Other extracellular matrix	37	11
Other cell adhesion molecule	144	11
Phosphatase	270	11
Other G-protein modulator	230	11
Chemokine	36	10

### Análisis con el programa Ingenuity

La figura 50 muestra los procesos celulares y moleculares estadísticamente significativos, identificados con el programa Ingenuity. Entre ellos se encuentran procesos de señalización e interacción entre células, muerte celular, crecimiento y proliferación celular o transporte de moléculas. Resulta interesante que, de nuevo, aparece como significativo el metabolismo lipídico, lo que podría indicar que este proceso es un proceso común en la inflamación intestinal, ya que también se alteraba en el modelo de DSS, de patogénesis muy diferente a la del modelo de TNBS.

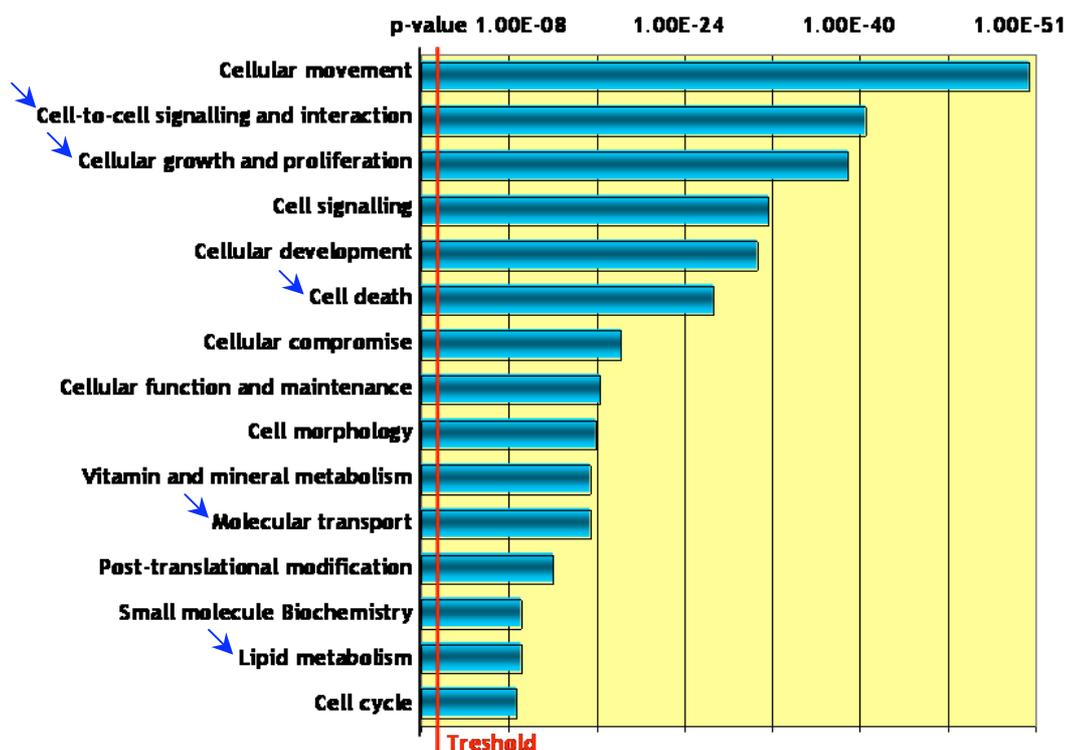


Figura 50. Clasificación de las 941 secuencias del grupo TNBS-colitis según funciones moleculares y celulares realizado con el programa Ingenuity. Las flechas señalan los procesos comentados en el texto

Lo mismo parece ocurrir con los aspectos neurológicos. En el análisis de enfermedades (Figura 51) encontramos enfermedad neurológica como significativa, además de otras que eran de esperar como enfermedad inflamatoria, enfermedad inmunológica y enfermedad gastrointestinal. De nuevo, identificamos la categoría cáncer como un proceso muy significativo, otro aspecto en común con el modelo de DSS.

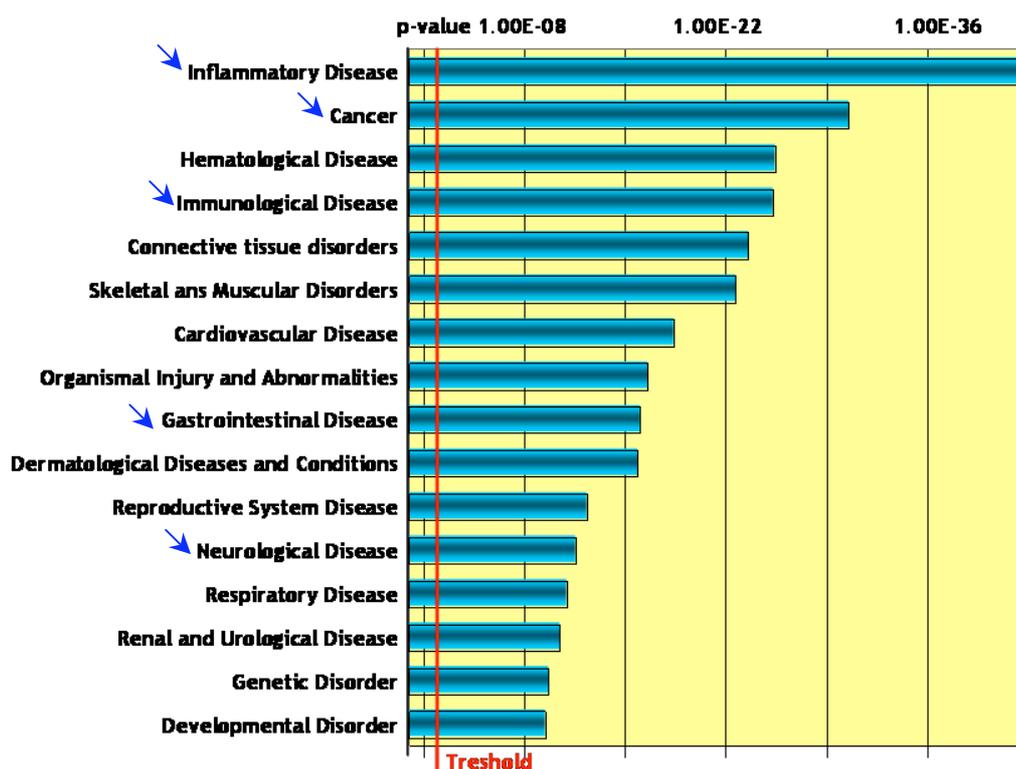


Figura 51. Clasificación de las 941 secuencias del grupo TNBS-colitis según enfermedades realizado con el programa Ingenuity. Las flechas señalan las enfermedades comentadas en el texto.

#### Análisis con el programa DAVID

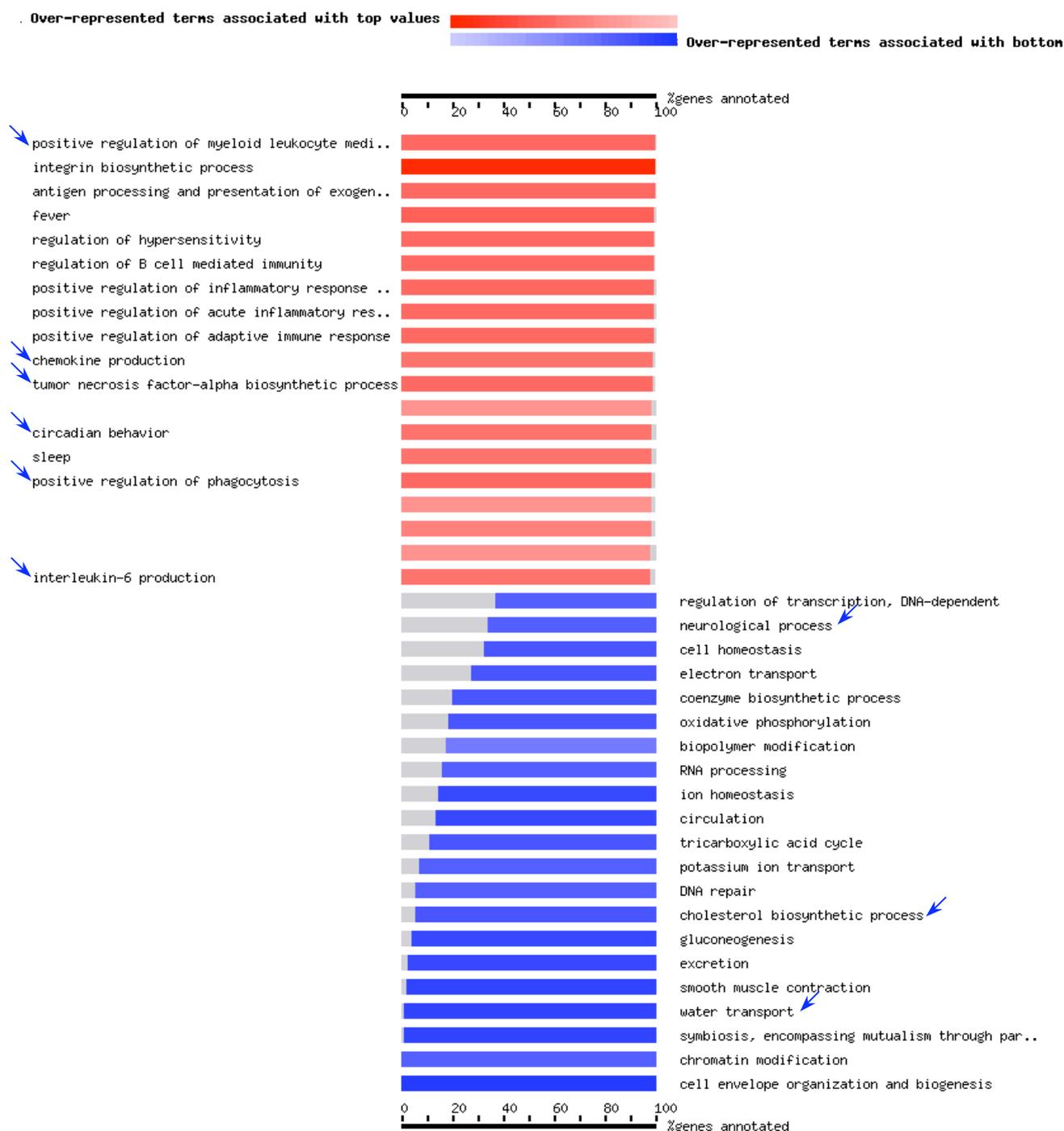
El análisis funcional a partir de las bases de datos GO y KEGG muestra aspectos similares a los identificados con los programas anteriores: respuesta inmune, proliferación celular, actividad de citocinas, angiogénesis, activación del complemento, genes de matriz extracelular o moléculas de adhesión (Tabla 17).

**Tabla 17.** Clasificación según categorías de GO y KEGG realizado con el programa DAVID. Los procesos nombrados en el texto aparecen marcados en gris. Count: número de genes en cada categoría; %: porcentaje de genes en cada categoría respecto de las 941secuencias; p-value: valor de significancia.

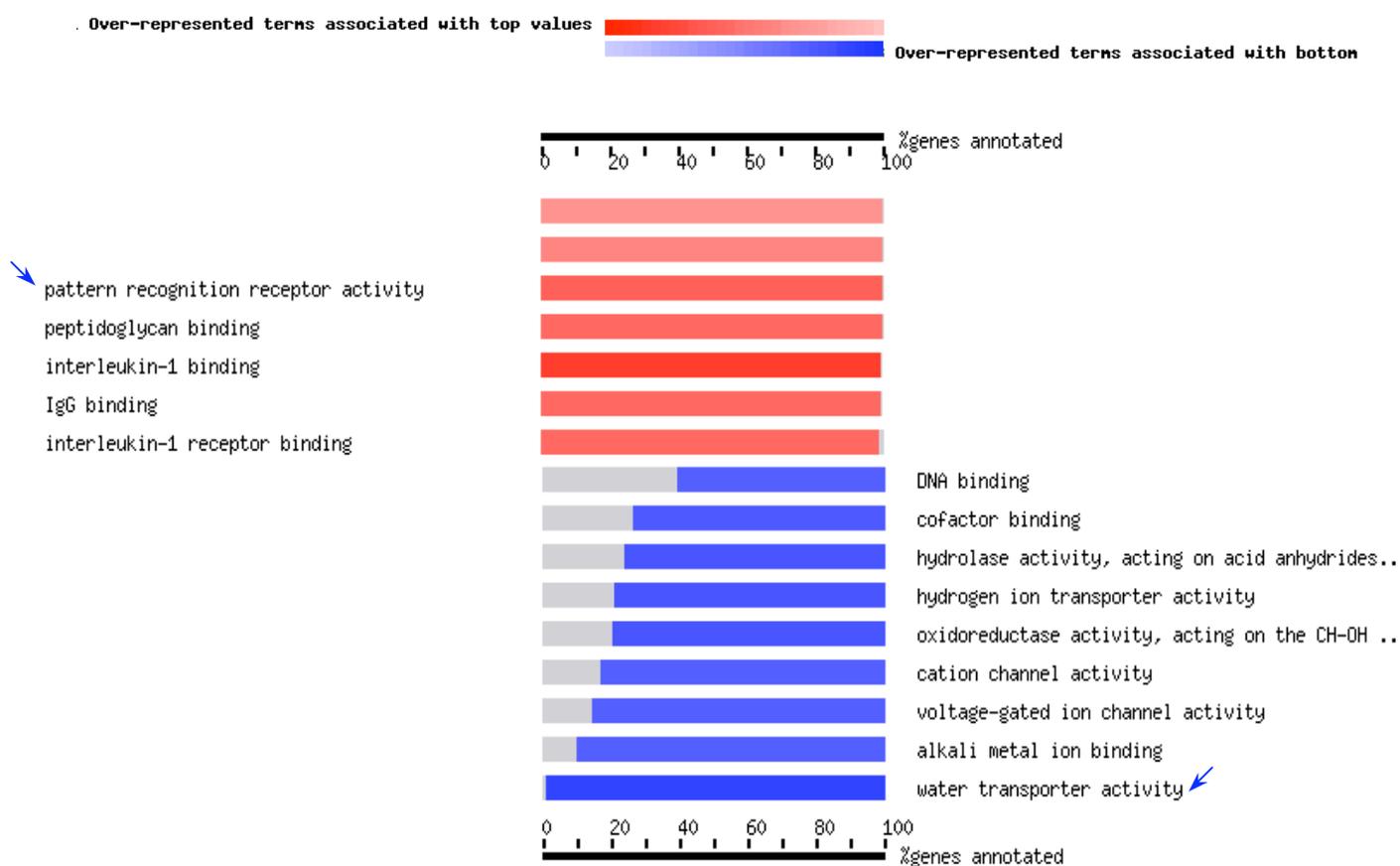
Biological Process	Count	%	PValue
Immune response	146	16.70%	8.79E-52
Defense response	148	16.93%	6.50E-48
Response to pest, pathogen or parasite	99	11.33%	2.95E-38
Response to other organism	100	11.44%	1.54E-37
Response to wounding	85	9.73%	2.15E-32
Taxis	32	3.66%	2.55E-17
Localization of cell	57	6.52%	4.48E-16
Cell motility	57	6.52%	4.48E-16
Locomotory behavior	33	3.78%	1.68E-12
Regulation of organismal physiological process	41	4.69%	9.49E-12
Cell activation	30	3.43%	2.53E-09
Vasculature development	26	2.97%	4.48E-09
Hemopoietic or lymphoid organ development	29	3.32%	2.43E-08
Cell proliferation	60	6.86%	1.51E-07
Establishment of localization	165	18.88%	1.66E-05
Molecular Function	Count	%	PValue
Receptor binding	71	8.12%	4.41E-12
Cytokine activity	32	3.66%	5.34E-10
G-protein-coupled receptor binding	19	2.17%	7.24E-10
Cytokine binding	17	1.95%	3.07E-07
Growth factor binding	13	1.49%	3.15E-06
Polysaccharide binding	15	1.72%	2.01E-05
Growth factor activity	18	2.06%	2.56E-04
Cation binding	101	11.56%	5.42E-04
Metal ion binding	116	13.27%	7.36E-04
Sugar binding	15	1.72%	0.001181536
Integrin binding	8	0.92%	0.00264738
Peptidase activity	40	4.58%	0.002897084
Collagen binding	5	0.57%	0.006624524
Protease inhibitor activity	13	1.49%	0.007859214
Protein dimerization activity	18	2.06%	0.011505998
KEGG	Count	%	PValue
Complement and coagulation cascades	17	1.95%	2.10E-06
Cell adhesion molecules (CAMs)	29	3.32%	1.19E-05
Cytokine-cytokine receptor interaction	27	3.09%	3.86E-05
Hematopoietic cell lineage	17	1.95%	1.15E-04
Antigen processing and presentation	17	1.95%	0.001098439
ECM-receptor interaction	15	1.72%	0.001116227
Type I diabetes mellitus	14	1.60%	0.002195895
Cell communication	18	2.06%	0.003706604
Leukocyte transendothelial migration	16	1.83%	0.031493275
Focal adhesion	23	2.63%	0.0526659
Toll-like receptor signalling pathway	10	1.14%	0.094826902

### 2.3.3.2 Análisis de “gene-set enrichment”

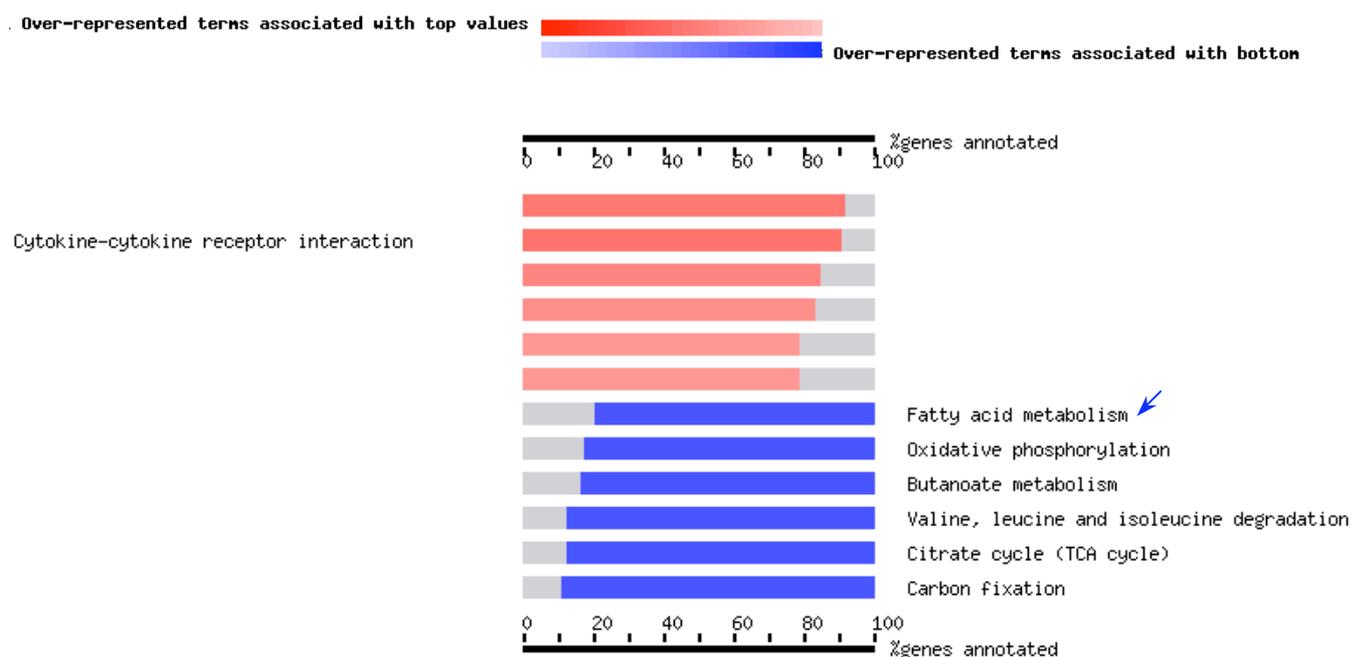
El siguiente análisis, realizado con los valores obtenidos de todas las secuencias del chip, es decir, siguiendo una estrategia global, no basada en selección de genes con umbrales de corte, nos vuelve a mostrar mayor facilidad en la interpretación de los resultados. Las categorías obtenidas (ver cuadro de la izquierda en *Figura 52*) muestran con gran claridad que los animales lo que sufren es un proceso inflamatorio donde interviene por ejemplo leucocitos, quimiokinas,  $TNF\alpha$ , IL6 y procesos de fagocitosis. Resulta muy interesante la alteración de procesos relacionados con el ritmo circadiano. La proliferación de las células de las criptas está regulada por este proceso y se sabe que alteraciones en el ritmo circadiano, como por ejemplo, las que se producen en el “*jet-lag*”, pueden provocar alteraciones intestinales. Entre los procesos que incluyen los genes cuya expresión está reprimida encontramos los procesos neurológicos. Así, vemos otra gran ventaja de este programa con respecto a los anteriores ya que nos permite distinguir entre los procesos que incluyen genes sobreexpresados y los que contienen genes reprimidos. Otros procesos a destacar serían la biosíntesis del colesterol y el transporte de agua. En la figura 53, encontramos también una función muy interesante que es la actividad de receptores PRR (“*pattern recognition receptor*”), donde se incluyen por ejemplo, los receptores Toll y las proteínas NOD (ver apartado B2.3 de *Introducción*). El análisis de las rutas de KEGG (*Figura 54*) identifica muy pocas rutas alteradas, aunque ratifica la alteración en aspectos relacionados con el metabolismo de lipídico.



**Figura 52.** Clasificación de los procesos biológicos identificados con el programa FatiScan en el modelo de TNBS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a procesos asociados con genes sobreexpresados. Los que aparecen junto a las barras azules, contiene los procesos asociados con los genes reprimidos.



**Figura 53.** Clasificación de las funciones moleculares identificadas con el programa FatiScan en el modelo de TNBS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a funciones asociadas con genes sobreexpresados. Las que aparecen junto a las barras azules, contiene las funciones asociadas con los genes reprimidos.



**Figura 54.** Clasificación de las rutas significativas identificadas con el programa FatiScan en el modelo de TNBS. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a rutas asociadas con genes sobreexpresados. Las que aparecen junto a las barras azules, contiene las rutas asociadas con los genes reprimidos.

## 2.4 Validación de genes por PCR a tiempo real

La tabla 18 muestra los genes cuyo cambio de expresión se ha confirmado por PCR a tiempo real. Entre ellos encontramos numerosos genes relacionados con la inflamación, como *Ccl2*, *Ccl3*, *Icam1*, *Nos2* o las calgranulinas *S100a8* y *S100a9*. Otros genes confirmados en este modelo incluyen el *Myd88*, que interviene en la cascada de señalización por TLRs, el gen *Birc2*, inhibidor de la apoptosis y el transportador de nucleósidos CNT2 (*Slc28a2*). Además, resultan muy interesantes varios genes de receptores de neurotransmisores como *Chrm3*, *Chrna3*, *Htr2b* y *Htr4*.

En la tabla 15 se muestran además los genes que también fueron confirmados en el modelo de DSS. Destaca el gen de la alfa-2 macroglobulina (*A2m*), inhibidor de proteasas y transportador de citocinas, confirmado en ambos modelos y que además, aparecía en las listas de los 50 genes con mayor expresión en los dos modelos. También se confirman en los dos modelos otros genes como el *Htr2b*, receptor de la serotonina, la *Il11*, el receptor del péptido natriurético *Npr1* o el supresor de la señalización por citocinas *Socs3*.

**Tabla 18.** Genes confirmados por PCR a tiempo real, en el modelo de TNBS. Los genes marcados con un asterisco son aquellos que también han sido confirmados por PCR a tiempo real en el modelo de DSS.

Símbolo	Título	Microarrays		qPCR	
		FC	p-value	Log10RQ	p-value
A2m *	alpha-2-macroglobulin	5.66	7.22E-07	2.21	3.28E-05
Adora2a	adenosine A2a receptor	0.26	1.66E-08	0.88	2.78E-04
Adrb3	adrenergic receptor, beta 3	-1.52	1.05E-03	-0.77	9.59E-03
Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2	0.73	4.15E-06	0.23	2.74E-02
Card9 *	caspase recruitment domain family, member 9	0.33	1.64E-08	0.73	6.03E-05
Ccl2 *	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.50	5.60E-06	1.01	7.23E-04
Ccl3 *	chemokine (C-C motif) ligand 3	4.90	2.11E-08	2.79	4.75E-07
Cd68 *	CD68 antigen	3.21	1.30E-08	1.00	3.84E-05
Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	0.54	1.23E-04	0.63	6.58E-03
Chrm3	Cholinergic receptor, muscarinic 3	-0.07	2.77E-05	-0.38	2.97E-03
Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	-0.32	6.90E-03	-0.30	5.27E-02
Ctsc	Cathepsin C	0.66	8.85E-07	0.39	8.10E-03
Cxcl1 *	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	5.70	5.61E-09	2.56	2.15E-07
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.25	9.82E-06	0.67	2.31E-02
Ela1	elastase 1, pancreatic	-0.79	2.68E-02	-0.39	2.96E-02
Expi	extracellular peptidase inhibitor	2.06	3.48E-05	1.24	1.28E-03
Fetub	fetuin beta	1.26	1.38E-03	1.25	1.47E-03
Htr2b *	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	1.02	2.91E-04	0.56	6.76E-04
Htr4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4	-0.70	6.16E-04	-0.51	3.23E-03
Icam1	intercellular adhesion molecule 1	2.43	1.08E-06	0.96	2.14E-04
Il10 *	interleukin 10	0.18	9.78E-07	1.21	4.53E-03
Il10ra *	interleukin 10 receptor, alpha	0.31	2.77E-05	0.90	6.69E-04
Il11 *	interleukin 11	0.35	1.05E-06	1.10	5.30E-04
Il11ra1	interleukin 11 receptor, alpha chain 1	-0.56	3.92E-02	-0.21	3.39E-03
Il1a *	interleukin 1 alpha	3.94	6.50E-06	1.70	1.59E-06
Il1b *	interleukin 1 beta	6.55	7.36E-10	2.39	6.08E-07
Il1r2 *	interleukin 1 receptor, type II	5.99	6.35E-09	2.10	4.07E-06
Il1rap	interleukin 1 receptor accessory protein	1.97	3.73E-06	0.55	1.61E-04
Il1rl2 *	interleukin 1 receptor-like 2	0.01	2.58E-04	1.33	5.89E-05
Il1rn *	interleukin 1 receptor antagonist	2.91	8.60E-07	1.97	1.64E-07
Il23a	Interleukin 23, alpha subunit p19	0.55	1.08E-04	1.39	2.83E-04
Il2ra *	interleukin 2 receptor, alpha chain	0.23	3.99E-06	0.82	6.24E-03
Il4ra	interleukin 4 receptor, alpha	1.13	1.91E-08	0.41	8.61E-03
Il6 *	interleukin 6	2.45	2.82E-04	1.87	1.34E-06
Il6ra	interleukin 6 receptor, alpha	1.71	2.20E-07	0.64	2.62E-03
Il6st	Interleukin 6 signal transducer	0.57	1.04E-06	0.34	5.18E-03
Il8rb *	interleukin 8 receptor, beta	1.18	3.69E-04	2.40	2.37E-07
Jak2	Janus kinase 2	0.71	1.69E-07	0.28	3.68E-03
Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88	0.57	4.41E-08	0.22	6.19E-03
Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	0.93	5.04E-09	0.28	4.10E-02
Nos2 *	nitric oxide synthase 2, inducible	3.49	1.93E-05	3.75	9.05E-09
Npr1 *	natriuretic peptide receptor 1	1.26	8.09E-06	0.57	1.22E-02
Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	2.88	7.68E-06	0.67	2.89E-04
Plau	plasminogen activator, urokinase	1.17	8.99E-06	0.59	3.22E-03

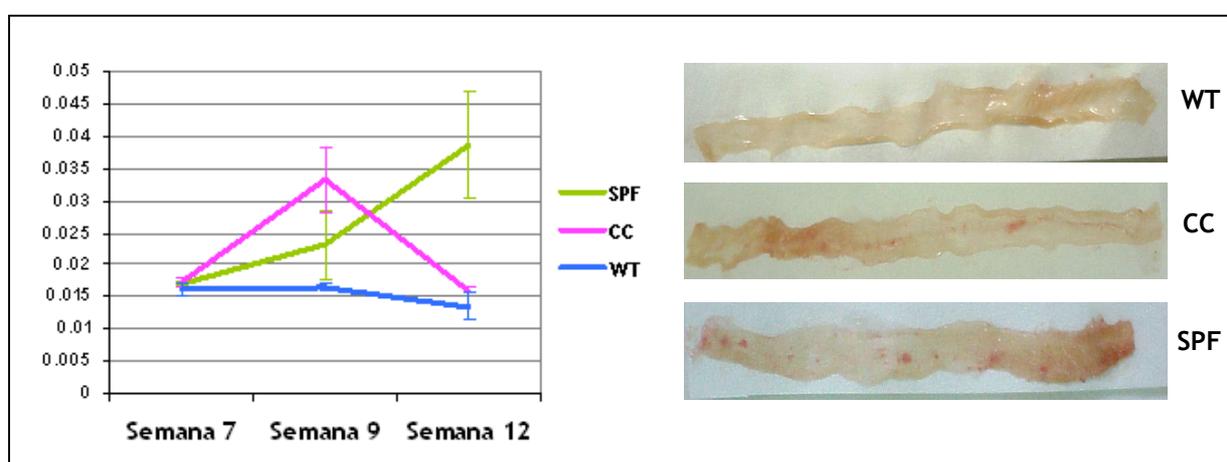
RESULTADOS

<b>Ptpn1</b>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	1.06	1.58E-08	0.51	1.90E-03
<b>Ptprc</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.12	3.72E-04	0.63	4.42E-02
<b>Ripk3 *</b>	receptor-interacting serine-threonine kinase 3	2.51	1.54E-06	0.64	1.60E-02
<b>S100a8 *</b>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	7.23	2.52E-10	2.82	3.08E-06
<b>S100a9 *</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	7.75	3.03E-11	2.77	3.00E-07
<b>Serpinc1</b>	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	-0.13	2.88E-06	-0.52	4.15E-02
<b>Serpine1 *</b>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	2.82	3.03E-06	1.42	5.22E-05
<b>Slc28a2</b>	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	1.76	1.93E-07	0.77	3.28E-03
<b>Socs3 *</b>	suppressor of cytokine signaling 3	2.40	2.78E-05	1.52	3.88E-06
<b>Sts</b>	steroid sulfatase	1.73	2.96E-04	0.54	8.23E-04
<b>Tacr2</b>	tachykinin receptor 2	-1.71	4.51E-02	-0.62	1.23E-04
<b>Tnf *</b>	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	0.23	6.05E-06	1.30	6.76E-05
<b>Tnfrsf1a</b>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	0.78	1.08E-06	0.26	4.61E-03

### 3. Resultados del modelo de ratones *IL10<sup>-/-</sup>*

#### 3.1 Desarrollo y evolución de la colitis

El desarrollo y evolución de la colitis en el modelo de ratones *IL10<sup>-/-</sup>* se evaluó midiendo la relación peso/longitud del colon y el daño macroscópico. La figura 55A muestra cómo la colitis generada en condiciones convencionales (CC) alcanza un máximo en la semana 9 y posteriormente se recupera. En cambio, cuando los animales son mantenidos en condiciones libres de patógenos (“*specific pathogen free*”, SPF), el daño va en aumento de manera gradual desde la semana 7 hasta la 12. Estos datos nos muestran que existen diferencias importantes según las condiciones en que se induzca la colitis. Mientras que en condiciones CC la colitis es más aguda en la semana 9 y tiende a resolverse a las 12 semanas, las condiciones SPF parece que retrasan la aparición de la colitis, alcanzando un valor más alto en la semana 12 y no en la 9. En los animales control (“*wild type*”, WT) no se aprecian cambios en la relación peso/longitud del colon a lo largo del estudio.



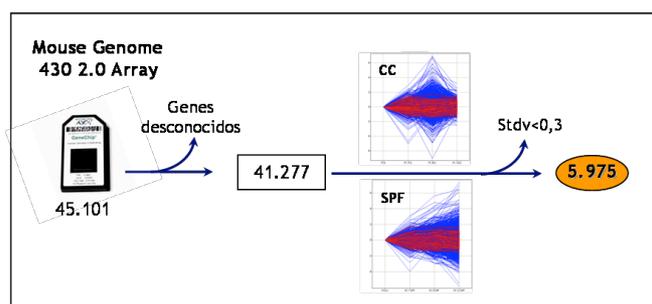
**Figura 55.** (A) Cambios en la relación longitud del colon/peso del colon en animales controles wild type (WT), animales mantenidos en condiciones convencionales (CC) y animales mantenidos libres de patógenos específicos (SPF). (B) Imágenes representativas del daño macroscópico en cada grupo.

#### 3.2 Análisis temporal

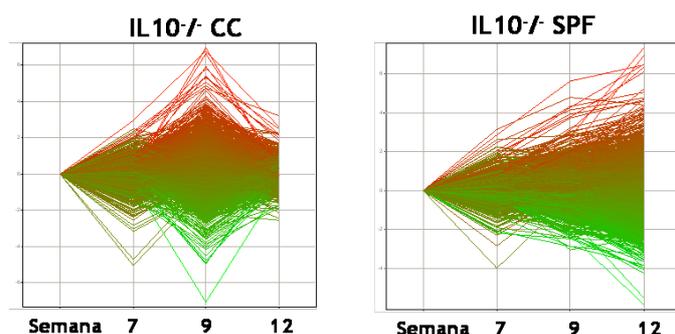
##### 3.2.1 Proceso de filtrado y selección de genes

El proceso de selección de genes realizado en este modelo es idéntico al de los modelos anteriores: eliminar en primer lugar las secuencias no anotadas (3.824 secuencias, muchas menos que el chip de rata, ya que el genoma de ratón se encuentra mucho mejor anotado), y a continuación, descartar aquellas que no presentan cambios entre los tres tiempos, es decir, que presentan un perfil plano (Figura 56). Se obtuvieron así 5.975 secuencias que se representan en la figura 57. En ella se puede observar exactamente el mismo comportamiento que se observaba en la relación peso/longitud del colon (Figura 55):

las condiciones SPF retrasan la aparición de los cambios más agudos, mientras que las condiciones CC favorecen la recuperación de los animales, tras una etapa de colitis aguda en la semana 9.



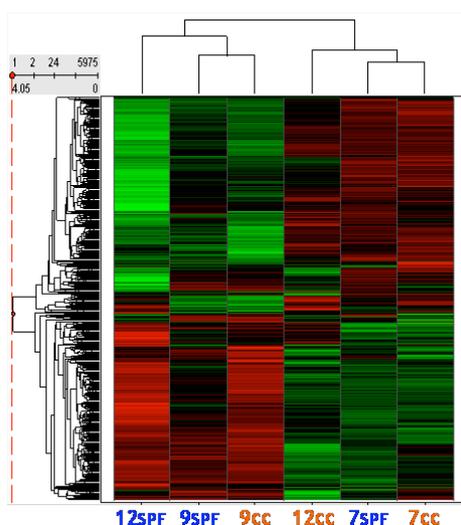
**Figura 56.** Proceso de filtrado de secuencias para el análisis temporal realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (3.824) y a continuación, aquellos que no presentan variación a lo largo de todos los tiempos (marcados en rojo). Las secuencias seleccionadas según estos criterios son 5.975 (marcadas en azul).



**Figura 57.** Evolución en el cambio de expresión (FC) de las 5.975 secuencias seleccionadas tras el proceso de filtrado para el análisis temporal. (A) Colitis en animales mantenidos en condiciones convencionales. (B) Colitis en animales mantenidos en ambiente libre de patógenos específicos.

### 3.2.2 Análisis de agrupamiento de muestras

La gravedad de la colitis parece ser el factor que separa los dos bloques de muestras, y no las condiciones (CC y SPF) en las que se mantienen los animales. La figura 57 mostraba como la colitis es menos grave en la semana 7 de ambos grupos y la semana 12 de las condiciones CC. Estas tres muestras se localizan juntas en el agrupamiento jerárquico. Aparte, se agrupan los tiempos que presentaban cambios más agudos: 9CC, 9SPF y 12SPF. En función de estos resultados y los obtenidos en el apartado anterior, consideraremos los tiempos 9CC y 12SPF como los más agudos y más relevantes para realizar análisis adicionales.

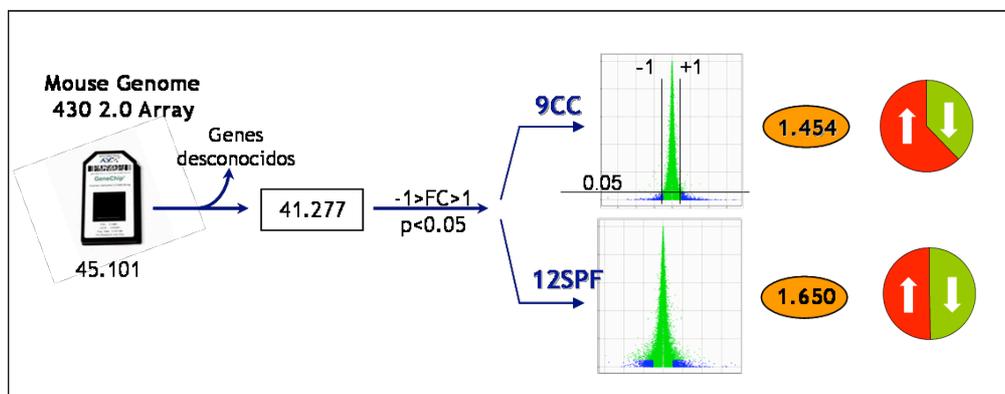


**Figura 58.** Cluster jerárquico representando los 3 tiempos de cada condición (CC y SPF) y las 5.975 secuencias. El color rojo representa las secuencias sobreexpresadas y el verde las reprimidas. Cada tiempo representa la media del FC de las tres réplicas incluidas en cada uno. Este análisis se realizó con el programa Spotfire.

### 3.3 Análisis de expresión diferencial

#### 3.3.1 Proceso de filtrado y selección de genes significativos

El análisis de expresión diferencial se realizó en las condiciones 9CC y 12SPF. Como muestra la figura 59, seleccionamos los genes en función de criterios de anotación, FC y significancia, al igual que en los modelos anteriores.



**Figura 59.** Proceso de filtrado de genes para el análisis de expresión diferencial realizado con el programa SpotFire. En primer lugar se eliminaron los genes no anotados (3.824) y a continuación se seleccionaron las secuencias que presentasen un cambio de expresión mayor o menor que 1 y un valor de  $p < 0,05$ . Los quesitos muestran el porcentaje de genes sobreexpresados (rojo) y reprimidos (verde).

Se obtuvieron así 1.454 secuencias significativas en la condición 9CC, de las cuales el 62,2% corresponde a genes sobreexpresados y el 37,8% a genes reprimidos. En la condición 12SPF obtuvimos 1.650 secuencias diferencialmente expresadas, pero en cambio, los porcentajes de genes sobreexpresados y reprimidos son prácticamente idénticos (50,7% y 49,7% respectivamente). Las tablas 19-22 muestran los 50 genes con mayor y menor expresión en ambas condiciones. En ambos casos destaca la activación de numerosos genes relacionados con la respuesta inmune como las quimiocinas *Ccl8*, *Cxcl1*, *Cxcl10*, *Cxcl9*, la interleukina 1b, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, como *H2-DMb1*, varios genes relacionados con el interferón (*Ifi47*, *Igtp*, *Igtp1*) o marcadores de linfocitos T, como el gen *Tgtp*. Entre los genes que presentan menor expresión en ambas condiciones cabe destacar la colipasa (*Clips*), implicada en la digestión, o la transtiterina (*Ttr*), una proteína plasmática relacionada con la amiloidosis aunque también se han encontrado niveles bajos de esta proteína en muestras de cáncer colorrectal.

Tabla 19. 50 genes con mayor expresión en el grupo 9CC.

Probes	Gene Symbol	Gene Title	FC 9 CC	Chromosomal Location	GO Biological Process
1431008_at	<b>0610037M15Rik</b>	RIKEN cDNA 0610037M15 gene	3.27	---	---
1454254_s_at	<b>1600029D21Rik</b>	RIKEN cDNA 1600029D21 gene	3.25	chr9 B	---
1418776_at	<b>5830443L24Rik</b>	RIKEN cDNA 5830443L24 gene	3.31	chr5 E5	immune response
1437176_at	<b>AI451557</b>	expressed sequence AI451557	3.97	chr8 C5	---
1439796_at	<b>AI747448</b>	expressed sequence AI747448	6.80	chr3 H2	cell adhesion
1419684_at	<b>Ccl8</b>	chemokine (C-C motif) ligand 8	3.37	chr11 C 11 47.0 cM	chemotaxis
1420330_at	<b>Clec4e</b>	C-type lectin domain family 4, member e	3.21	chr6 F3 6 59.6 cM	immune response
1420699_at	<b>Clec7a</b>	C-type lectin domain family 7, member a	3.57	---	response to yeast
1419209_at	<b>Cxcl1</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3.27	chr5 E-F 5 51.0 cM	regulation of progression through cell cycle
1418930_at	<b>Cxcl10</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.80	chr5 E2 5 53.0 cM	electron transport
1419728_at	<b>Cxcl5</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	5.93	chr5 E2 5 53.0 cM	chemotaxis
1418652_at	<b>Cxcl9</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	5.83	chr5 E2 5 53.0 cM	inflammatory response
1456907_at	<b>Cxcl9</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	4.13	chr5 E2 5 53.0 cM	inflammatory response
1439831_at	<b>EG240327</b>	Predicted gene, EG240327	4.19	chr18 D3	---
1422953_at	<b>Fpr-rs2</b>	formyl peptide receptor, related sequence 2	3.88	chr17 A3.2	chemotaxis
1435906_x_at	<b>Gbp2</b>	guanylate nucleotide binding protein 2	3.15	chr3 H1 3 67.4 cM	immune response
1417898_a_at	<b>Gzma</b>	granzyme A	3.60	chr13 D 13 64.0 cM	proteolysis
1419060_at	<b>Gzmb</b>	granzyme B	3.45	chr14 D3 14 20.5 cM	proteolysis
1418638_at	<b>H2-DMb1</b>	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3.38	chr17 B1 17 18.58 cM	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II
1449580_s_at	<b>H2-DMb1 /// H2-DMb2</b>	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3.30	chr17 B1 17 18.57 cM /// chr17 B1 17 18.58 cM	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II
1423555_a_at	<b>Ifi44</b>	interferon-induced protein 44	3.09	chr3 H3	---
1417292_at	<b>Ifi47</b>	interferon gamma inducible protein 47	3.62	chr11 B1.2	defense response
1417141_at	<b>Igtp</b>	interferon gamma induced GTPase	3.79	chr11 B1.3 11 32.0 cM	---
1419043_a_at	<b>Ilgp1</b>	interferon inducible GTPase 1	5.32	chr18 D3	cytokine and chemokine mediated signaling pathway
1419042_at	<b>Ilgp1</b>	interferon inducible GTPase 1	5.06	chr18 D3	cytokine and chemokine mediated signaling pathway
1449399_a_at	<b>Il1b</b>	interleukin 1 beta	3.45	chr2 F 2 73.0 cM	regulation of progression through cell cycle
1420437_at	<b>Indo</b>	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	5.38	chr8 A2	defense response
1427747_a_at	<b>Lcn2</b>	lipocalin 2	4.32	chr2 A3 2 27.0 cM	transport
1438676_at	<b>LOC626578 /// LOC673101 /// Mpa2l</b>	macrophage activation 2 like	3.10	chr5 E5	immune response
1418536_at	<b>LOC630509 /// LOC674192</b>	similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor	3.61	---	---
1448025_at	<b>LOC668101</b>	similar to SIRP beta 1 isoform 2	3.34	chr3 A1	intracellular signaling cascade
1417290_at	<b>Lrg1</b>	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	5.40	chr17 D 17 10.0 cM	---
1428223_at	<b>Mfsd2</b>	major facilitator superfamily	3.89	chr4 D1	transport

RESULTADOS

1428223_at	<b>Mfsd2</b>	major facilitator superfamily domain containing 2	3.89	chr4 D1	transport
1420450_at	<b>Mmp10</b>	matrix metalloproteinase 10	3.75	chr9 A1	peptidoglycan metabolic process
1449478_at	<b>Mmp7</b>	matrix metalloproteinase 7	3.43	chr9 A1 9 1.0 cM	peptidoglycan metabolic process
1447927_at	<b>Mpa2l</b>	macrophage activation 2 like	3.66	chr5 E5	immune response
1449071_at	<b>Myl7</b>	myosin, light polypeptide 7, regulatory	3.57	chr11 A1 11 0.75 cM	smooth muscle contraction
1450128_at	<b>Pla2g2a</b>	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	3.28	chr4 D3 4 68.0 cM	regulation of cell growth
1448872_at	<b>Reg3g</b>	regenerating islet-derived 3 gamma	4.75	chr6 C3	acute-phase response
1419394_s_at	<b>S100a8</b>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	6.98	chr3 F1-F2 3 43.6 cM	chemotaxis
1448756_at	<b>S100a9</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	6.65	chr3 F1-F2 3 43.6 cM	leukocyte chemotaxis
1450826_a_at	<b>Saa3</b>	serum amyloid A 3	3.55	chr7 B3 7 23.5 cM	acute-phase response
1424923_at	<b>Serpina3g</b>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	3.71	chr12 E	apoptosis
1455899_x_at	<b>Socs3</b>	suppressor of cytokine signaling 3	3.44	chr11 E2	regulation of cell growth
1422240_s_at	<b>Sprr2h</b>	small proline-rich protein 2H	4.78	chr3 F1 3 45.2 cM	embryo implantation
1416016_at	<b>Tap1</b>	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	3.14	chr17 B1 17 18.6 cM	transport
1449009_at	<b>Tgtp</b>	T-cell specific GTPase	4.87	chr11 B1.2	immune response
1451916_s_at	<b>Trim15</b>	tripartite motif protein 15	3.70	chr17 B1	---
1419762_at	<b>Ubd</b>	ubiquitin D	4.59	chr17 B3	protein modification process
1448562_at	<b>Upp1</b>	uridine phosphorylase 1	3.18	chr11 A1-2	pyrimidine nucleotide

Tabla 20. 50 genes con menor expresión en el grupo 9CC.

Probes	Gene Symbol	Gene Title	FC 9 CC	Chromosomal Location	GO Biological Process
1417735_at	1810030J14Rik	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	-7.07	chr1 H3	---
1454242_at	2310079G19Rik	RIKEN cDNA 2310079G19 gene	-2.67	chr16 C3.3	---
1453220_at	4432416J03Rik	RIKEN cDNA 4432416J03 gene	-2.64	chr9 A5.3	---
1432336_at	5033404E19Rik	RIKEN cDNA 5033404E19 gene	-2.73	chr1 H5	---
1423244_at	9030012A22Rik	RIKEN cDNA 9030012A22 gene	-3.76	chr19 C3	electron transport
1435853_at	9030605E09Rik	RIKEN cDNA 9030605E09 gene	-3.42	chr15 E1	electron transport
1419758_at	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-2.24	chr5 A1 5 1.0 cM	transport
1435048_at	AI854703	expressed sequence AI854703	-3.97	chr6 B2.3	---
1435049_s_at	AI854703	expressed sequence AI854703	-3.12	chr6 B2.3	---
1440832_at	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	-4.15	chr14 C1	antibacterial humoral response
1438364_x_at	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	-3.84	chr14 C1	antibacterial humoral response
1459889_at	Clca3	chloride channel calcium activated 3	-3.05	chr3 H2 3 74.5 cM	chloride transport
1438612_a_at	Clps	colipase, pancreatic	-4.07	chr17 B1 17 17.1 cM	digestion
1415805_at	Clps	colipase, pancreatic	-3.33	chr17 B1 17 17.1 cM	digestion
1453009_at	Cpm	carboxypeptidase M	-2.67	chr10 D2	proteolysis
1418989_at	Ctse	cathepsin E	-2.25	chr1 F 1 69.1 cM	proteolysis
1435435_at	Cttnbp2	cortactin binding protein 2	-2.40	chr6 A2	actin cytoskeleton organization and biogenesis
1448792_a_at	Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	-3.60	chr7 A3	electron transport
1416194_at	Cyp4b1	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	-3.08	chr4 D1 4 49.5 cM	electron transport
1417951_at	Eno3	enolase 3, beta muscle	-3.24	chr11 B4 11 42.0 cM	glycolysis
1457896_at	Esrrg	estrogen-related receptor gamma	-2.33	chr1 H6	transcription
1457409_at	Fut9	fucosyltransferase 9	-2.53	chr4 A3 4 8.8 cM	protein amino acid glycosylation
1435308_at	Fut9	fucosyltransferase 9	-2.47	chr4 A3 4 8.8 cM	protein amino acid glycosylation
1439599_at	Gal3st2	galactose-3-O-sulfotransferase 2	-2.36	chr1 D	biosynthetic process
1419595_a_at	Ggh	gamma-glutamyl hydrolase	-2.37	chr4 A3	glutamine metabolic process
1436994_a_at	Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	-2.30	chr13 A2-A3	neurotransmitter uptake
1419576_at	Hoxb13	homeo box B13	-2.36	chr11 D 11 56.0 cM	transcription
1449493_at	InsI5	insulin-like 5	-2.93	chr4 C5-C7 4 49.5 cM	---
1449568_at	Klb	klotho beta	-2.59	chr5 C3.1	carbohydrate metabolic process
1434150_a_at	Mettl7a	methyltransferase like 7A	-2.26	chr15 F1	metabolic process
1450276_a_at	Scin	scinderin	-2.29	chr12 B1	negative regulation of cell proliferation
1419343_at	Slc15a1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	-3.15	chr14 E5	transport
1438824_at	Slc20a1	solute carrier family 20, member 1	-2.63	chr2 F1 2 73.0 cM	transport

RESULTADOS

1452492_a_at	<b>Slc37a2</b>	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	-3.48	chr9 B	glycerol-3-phosphate metabolic process
1418095_at	<b>Smpx</b>	small muscle protein, X-linked	-2.82	chrX F4	striated muscle contraction
1459354_at	<b>St3gal6</b>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	-2.31	chr16 C1.2	protein amino acid glycosylation
1434803_a_at	<b>Sycn</b>	syncollin	-4.76	chr7 A3	---
1451228_a_at	<b>Sycn</b>	syncollin	-4.52	chr7 A3	---
1440150_at	<b>Tgm3</b>	transglutaminase 3, E polypeptide	-4.95	chr2 F1	epidermis development
1421355_at	<b>Tgm3</b>	transglutaminase 3, E polypeptide	-4.90	chr2 F1	epidermis development
1450813_a_at	<b>Tnni1</b>	troponin I, skeletal, slow 1	-2.60	chr1 E4 1 60.0 cM	regulation of muscle contraction
1418726_a_at	<b>Tnnt2</b>	troponin T2, cardiac	-2.48	chr1 E4 1 60.0 cM	muscle contraction
1424967_x_at	<b>Tnnt2</b>	troponin T2, cardiac	-2.43	chr1 E4 1 60.0 cM	muscle contraction
1438877_at	<b>Trpm6</b>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	-2.74	chr19 B	protein amino acid phosphorylation
1427642_at	<b>Trpm6</b>	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	-2.35	chr19 B	protein amino acid phosphorylation
1455913_x_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-3.52	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1454608_x_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-3.31	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1459737_s_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-3.18	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1451580_a_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-2.40	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1424351_at	<b>Wfdc2</b>	WAP four-disulfide core domain 2	-2.55	chr2 H3	---

Tabla 21. 50 genes con mayor expresión en el grupo 12SPF.

Probes	Gene Symbol	Gene Title	FC 12 SPF	Chromosomal Location	GO Biological Process
1431008_at	<b>O610037M15Rik</b>	RIKEN cDNA O610037M15 gene	3.10	---	---
1447621_s_at	<b>2610307O08Rik</b>	RIKEN cDNA 2610307O08 gene	3.01	chr18 B3	---
1436576_at	<b>A630077B13Rik</b>	RIKEN cDNA A630077B13 gene	3.66	chr10 B1	---
1437176_at	<b>AI451557</b>	expressed sequence AI451557	3.70	chr8 C5	---
1439796_at	<b>AI747448</b>	expressed sequence AI747448	6.46	chr3 H2	cell adhesion
1419684_at	<b>Ccl8</b>	chemokine (C-C motif) ligand 8	3.03	chr11 C 11 47.0 cM	chemotaxis
1425519_a_at	<b>Cd74</b>	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	3.36	chr18 E1 18 32.0 cM	prostaglandin biosynthetic process
1419209_at	<b>Cxcl1</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	4.34	chr5 E-F 5 51.0 cM	regulation of progression through cell cycle
1418930_at	<b>Cxcl10</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	4.24	chr5 E2 5 53.0 cM	electron transport
1419728_at	<b>Cxcl5</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	6.37	chr5 E2 5 53.0 cM	chemotaxis
1418652_at	<b>Cxcl9</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	6.09	chr5 E2 5 53.0 cM	inflammatory response
1456907_at	<b>Cxcl9</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	3.95	chr5 E2 5 53.0 cM	inflammatory response
1439831_at	<b>EG240327</b>	Predicted gene, EG240327	3.93	chr18 D3	---
1418240_at	<b>Gbp2</b>	guanylate nucleotide binding protein 2	3.15	chr3 H1 3 67.4 cM	immune response
1435906_x_at	<b>Gbp2</b>	guanylate nucleotide binding protein 2	3.04	chr3 H1 3 67.4 cM	immune response
1422527_at	<b>H2-DMa</b>	histocompatibility 2, class II, locus DMa	3.13	chr17 B1 17 18.56 cM	antigen processing and presentation via MHC class II
1418638_at	<b>H2-DMb1</b>	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3.40	chr17 B1 17 18.58 cM	antigen processing and presentation via MHC class II
1449580_s_at	<b>H2-DMb1</b>	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	3.28	chr17 B1 17 18.57 cM	antigen processing and presentation via MHC class II
1448881_at	<b>Hp</b>	haptoglobin	3.66	chr8 D3 8 55.0 cM	proteolysis
1417292_at	<b>Ifi47</b>	interferon gamma inducible protein 47	3.04	chr11 B1.2	defense response
1425947_at	<b>Ifng</b>	interferon gamma	3.20	chr10 D2 10 67.0 cM	regulation of cell growth
1417141_at	<b>Igtp</b>	interferon gamma induced GTPase	3.40	chr11 B1.3 11 32.0 cM	---
1419043_a_at	<b>Iigp1</b>	interferon inducible GTPase 1	5.07	chr18 D3	cytokine and chemokine mediated signaling pathway
1419042_at	<b>Iigp1</b>	interferon inducible GTPase 1	4.60	chr18 D3	cytokine and chemokine mediated signaling pathway
1449399_a_at	<b>Il1b</b>	interleukin 1 beta	3.85	chr2 F 2 73.0 cM	regulation of progression through cell cycle
1422317_a_at	<b>Il1r1</b>	interleukin 1 receptor-like 1	3.17	chr1 B 1 20.0 cM	DNA methylation
1420437_at	<b>Indo</b>	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	4.78	chr8 A2	defense response
1427747_a_at	<b>Lcn2</b>	lipocalin 2	4.73	chr2 A3 2 27.0 cM	transport
1418536_at	<b>LOC630509</b>	similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen)	3.48	---	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I
1417290_at	<b>Lrg1</b>	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	6.50	chr17 D 17 10.0 cM	---
1428223_at	<b>Mfsd2</b>	major facilitator superfamily domain containing 2	4.21	chr4 D1	transport

RESULTADOS

1420450_at	<b>Mmp10</b>	matrix metallopeptidase 10	4.41	chr9 A1	peptidoglycan metabolic process
1417256_at	<b>Mmp13</b>	matrix metallopeptidase 13	3.68	chr9 A1-A2	peptidoglycan metabolic process
1418945_at	<b>Mmp3</b>	matrix metallopeptidase 3	4.12	chr9 A1 9 1.0 cM	peptidoglycan metabolic process
1447927_at	<b>Mpa2l</b>	macrophage activation 2 like	3.31	chr5 E5	immune response
1450128_at	<b>Pla2g2a</b>	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	3.76	chr4 D3 4 68.0 cM	regulation of cell growth
1448872_at	<b>Reg3g</b>	regenerating islet-derived 3 gamma	4.40	chr6 C3	acute-phase response
1419394_s_at	<b>S100a8</b>	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	7.35	chr3 F1-F2 3 43.6 cM	chemotaxis
1448756_at	<b>S100a9</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	6.97	chr3 F1-F2 3 43.6 cM	leukocyte chemotaxis
1450826_a_at	<b>Saa3</b>	serum amyloid A 3	3.32	chr7 B3 7 23.5 cM	acute-phase response
1424923_at	<b>Serpina3g</b>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G	3.77	chr12 E	apoptosis
1455899_x_at	<b>Socs3</b>	suppressor of cytokine signaling 3	3.97	chr11 E2	regulation of cell growth
1456212_x_at	<b>Socs3</b>	suppressor of cytokine signaling 3	3.71	chr11 E2	regulation of cell growth
1416576_at	<b>Socs3</b>	suppressor of cytokine signaling 3	3.48	chr11 E2	regulation of cell growth
1422240_s_at	<b>Sprp2h</b>	small proline-rich protein 2H	5.24	chr3 F1 3 45.2 cM	embryo implantation
1416016_at	<b>Tap1</b>	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	3.46	chr17 B1 17 18.6 cM	transport
1449009_at	<b>Tgtp</b>	T-cell specific GTPase	4.68	chr11 B1.2	immune response
1451916_s_at	<b>Trim15</b>	tripartite motif protein 15	3.81	chr17 B1	---
1419762_at	<b>Ubd</b>	ubiquitin D	3.98	chr17 B3	protein modification process
1448562_at	<b>Upp1</b>	uridine phosphorylase 1	3.07	chr11 A1-2	pyrimidine nucleotide metabolic process

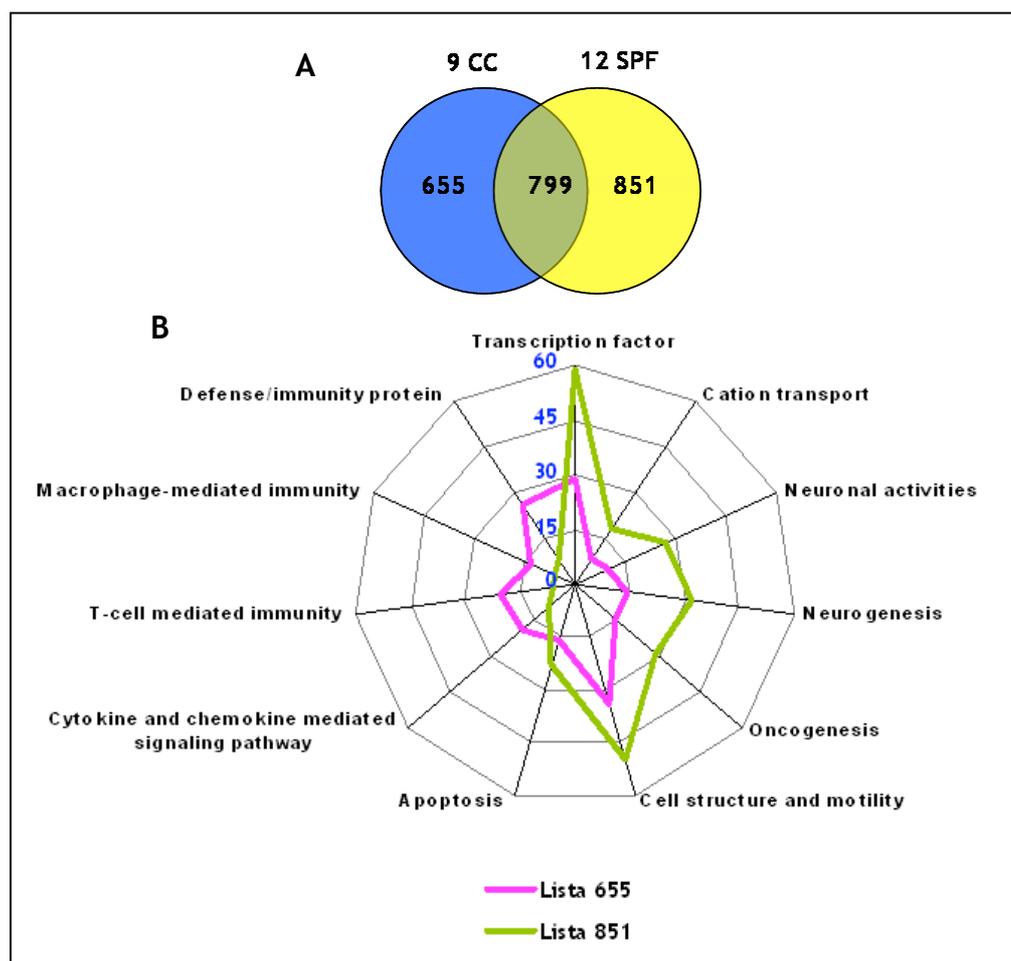
Tabla 22. 50 genes con menor expresión en el grupo 12SPF

Probes	Gene Symbol	Gene Title	FC 12 SPF	Chromosomal Location	GO Biological Process
1419758_at	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-3.52	chr5 A1 5 1.0 cM	transport
1419759_at	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	-3.15	chr5 A1 5 1.0 cM	transport
1424451_at	Acaa1b	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B	-4.00	chr9 F3	lipid metabolic process
1438364_x_at	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	-3.96	chr14 C1	antibacterial humoral response
1440832_at	Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 4	-3.82	chr14 C1	antibacterial humoral response
1429918_at	Arhgap20	Rho GTPase activating protein 20	-2.83	chr9 A5.3	signal transduction
1443823_s_at	Atp1a2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide	-2.39	chr1 H3 1 94.2 cM	neurotransmitter uptake
1457619_at	BC015286	cDNA sequence BC015286	-2.90	chr8 D3	
1436098_at	Bche	butyrylcholinesterase	-2.66	chr3 E3	
1449486_at	Ces1	carboxylesterase 1	-3.37	chr8 C5 8 43.0 cM	
1435370_a_at	Ces3	carboxylesterase 3	-3.07	chr8 C5	acyl-CoA metabolic process
1449081_at	Ces3	carboxylesterase 3	-2.60	chr8 C5	acyl-CoA metabolic process
1415885_at	Chgb	chromogranin B	-2.40	chr2 F-G 2 75.6 cM	
1438612_a_at	Clps	colipase, pancreatic	-3.30	chr17 B1 17 17.1 cM	digestion
1415805_at	Clps	colipase, pancreatic	-2.65	chr17 B1 17 17.1 cM	digestion
1453009_at	Cpm	carboxypeptidase M	-2.38	chr10 D2	proteolysis
1452270_s_at	Cubn	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	-2.80	chr2 A1 2 9.0 cM	tRNA aminoacylation for protein translation
1419582_at	Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	-5.51	chr19 C3	electron transport
1448683_at	Cyp2d26	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	-2.38	chr15 E1	electron transport
1416194_at	Cyp4b1	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	-4.24	chr4 D1 4 49.5 cM	electron transport
1438211_s_at	Dbp	D site albumin promoter binding protein	-4.07	chr7 B3 7 23.0 cM	transcription
1417991_at	Dio1	deiodinase, iodothyronine, type I	-3.44	chr4 C7 4 48.7 cM	hormone biosynthetic process
1435207_at	Dixdc1	DIX domain containing 1	-2.47	chr9 B	multicellular organismal development
1427946_s_at	Dpyd	dihydropyrimidine dehydrogenase	-2.75	chr3 G1	electron transport
1450332_s_at	Fmo5	flavin containing monooxygenase 5	-2.94	chr3 F2.2	electron transport
1440108_at	Foxp2	forkhead box P2	-2.44	chr6 A2	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
1419905_s_at	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	-2.46	chr8 B3.2	lipid metabolic process
1419906_at	Hpgd	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	-2.44	chr8 B3.2	lipid metabolic process
1425127_at	Hsd3b2	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2	-2.82	chr3 F2.2 3 49.1 cM	steroid biosynthetic process
1453152_at	Mamdc2	MAM domain containing 2	-2.38	chr19 B	
1434354_at	Maob	monoamine oxidase B	-2.70	chrX A1.2 X 5.2 cM	electron transport
1428804_at	Mfap3l	microfibrillar-associated protein 3-like	-2.55	chr8 B3.2	protein targeting
1457068_at	Naalad1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	-2.77	chr19 A	proteolysis
1422860_at	Nts	neurotensin	-2.97	chr10 D1	regulation of blood vessel size
1423359_at	Pln	phospholamban	-2.95	chr10 B3	cardiac inotropy
1460332_at	Pln	phospholamban	-2.60	chr10 B3	cardiac inotropy
1449051_at	Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	-2.45	chr15 E2 15 48.8 cM	glucose metabolic process

RESULTADOS

1437671_x_at	<b>Prss23</b>	protease, serine, 23	-2.66	chr7 D3	proteolysis
1431057_a_at	<b>Prss23</b>	protease, serine, 23	-2.39	chr7 D3	proteolysis
1418931_at	<b>Reg4</b>	regenerating islet-derived family, member 4	-3.53	chr3 F3	
1442263_at	<b>Rgs13</b>	regulator of G-protein signaling 13	-2.49	chr1 F 1 78.0 cM	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
1448964_at	<b>S100g</b>	S100 calcium binding protein G	-3.36	chrX F4	
1450276_a_at	<b>Scin</b>	scinderin	-2.80	chr12 B1	negative regulation of cell proliferation
1422644_at	<b>Sh3bgr</b>	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	-2.40	chr16 C4	
1440201_at	<b>Slc8a1</b>	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	-2.80	chr17 E3 17 48.0 cM	cardiac inotropy
1449409_at	<b>Sult1c2</b>	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	-3.64	chr17 D	
1419524_at	<b>Tph1</b>	tryptophan hydroxylase 1	-2.72	chr7 B3 7 23.5 cM	serotonin biosynthetic process from tryptophan
1455913_x_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-3.05	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1454608_x_at	<b>Ttr</b>	transthyretin	-2.98	chr18 A2 18 7.0 cM	thyroid hormone generation
1419063_at	<b>Ugt8a</b>	UDP galactosyltransferase 8A	-2.45	chr3 E3-F1	metabolic process

## 3.3.2 Comparación de las condiciones convencionales y libres de patógenos específicos



**Figura 60.** A) Diagrama de Venn comparando los grupos 9CC (1.454 secuencias) y 12SPF (1.650 secuencias). B) Algunos procesos biológicos que distinguen ambos grupos. Realizado con el programa Panther.

El diagrama de Venn (Figura 60A) muestra la comparación entre las secuencias significativas seleccionadas en cada grupo: 9CC y 12SPF. Encontramos 799 secuencias comunes que no solo están presentes en ambos grupos sino que además, presentan el mismo cambio, es decir, que no hay ninguna que se sobreexpresen en uno de los grupos y se reprima en el otro. Sin embargo, en el diagrama de Venn también vemos que hay muchos genes que diferencian ambos grupos: 655 secuencias sólo se alteran en condiciones convencionales mientras que hay 851 secuencias que se alteran solo cuando los animales se mantienen en condiciones SPF. Posteriormente analizamos las funciones y procesos en los que intervienen los genes que diferencian ambos grupos (Figura 60B), encontrando diferencias importantes. Observamos que los genes que sólo se alteran en el grupo 9CC (lista de 655 secuencias) siguen estando relacionados principalmente con la respuesta inmune pero, en cambio, los genes afectados únicamente en condiciones

SPF (lista de 851 secuencias) intervienen en otras funciones como neurogénesis, oncogénesis o estructura y motilidad celular. Se sabe que las bacterias intestinales realizan funciones muy importantes en el mantenimiento de las funciones de la mucosa intestinal, con lo que este grupo de genes, podría estar relacionado, más que con la colitis, con la ausencia de una microbiota normal que hace que se alteren funciones importantes en el intestino.

### 3.3.3 Análisis funcional de la colitis aguda en condiciones convencionales (grupo 9CC)

El objetivo del siguiente análisis consistió en el estudio funcional de la colitis aguda en el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup>. Por ello seleccionamos el grupo 9CC. Tras comprobar en los dos modelos anteriores que la mejor estrategia para realizar el análisis funcional de datos a escala genómica es el estudio global sin preseleccionar genes, en este caso, sólo realizamos el análisis con el programa FatiScan. En este análisis (*Figuras 61-63*) comprobamos que hay muchos más procesos que se activan en la colitis que los que se reprimen. Entre esos procesos activados, son muy numerosos aquellos relacionados con la respuesta inmune, que además, son muy variados: hay una afectación importante en los procesos de presentación y procesamiento de antígenos, fagocitosis o quimiotaxis, intervienen quimiokinas, interleukinas, moléculas de adhesión e inmunoglobulinas, se afectan distintos tipos celulares como neutrófilos, células NK, mastocitos, células T y B... Además, encontramos la alteración de tres rutas que podrían ser interesantes para un estudio más detallado, como son la ruta del NFkB (ej. *Nfkbie*, *Nfkbiz*), la ruta de los receptores TLRs (ej. *Tlr13*) y la ruta Jak-STAT (ej. *Stat1*, *Stat2*). Los genes desactivados en cambio, se relacionan principalmente con procesos, como metabolismo de hormonas, neurotransmisores o la digestión.

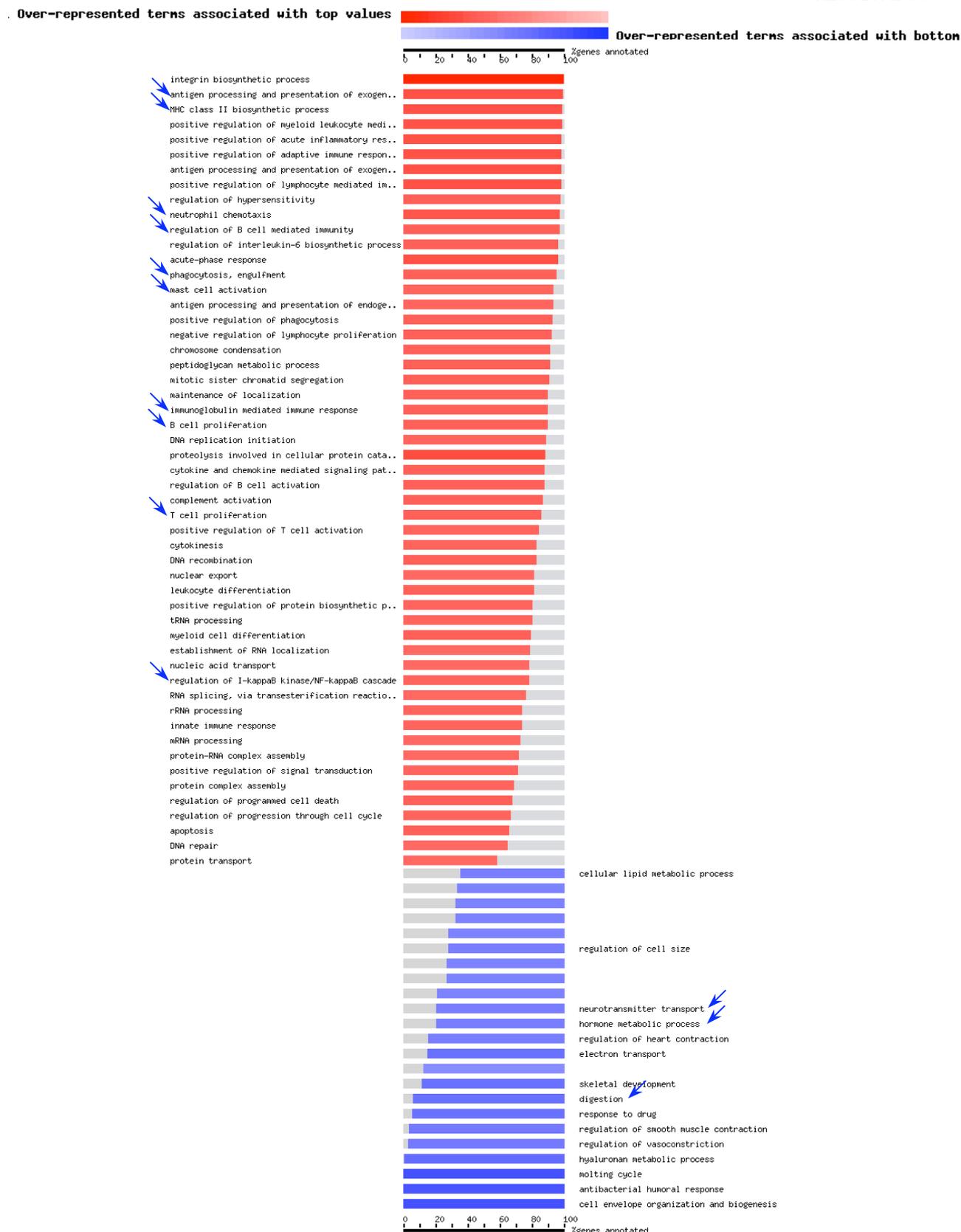
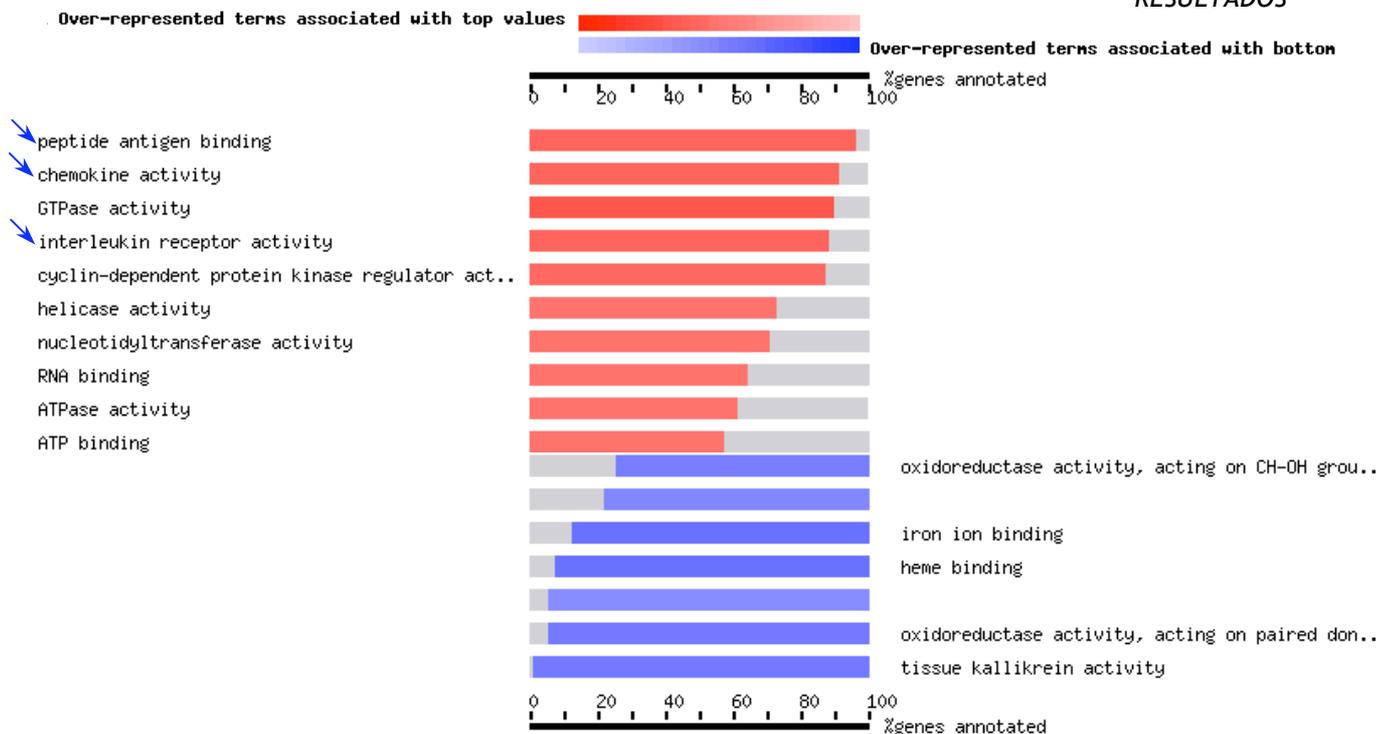
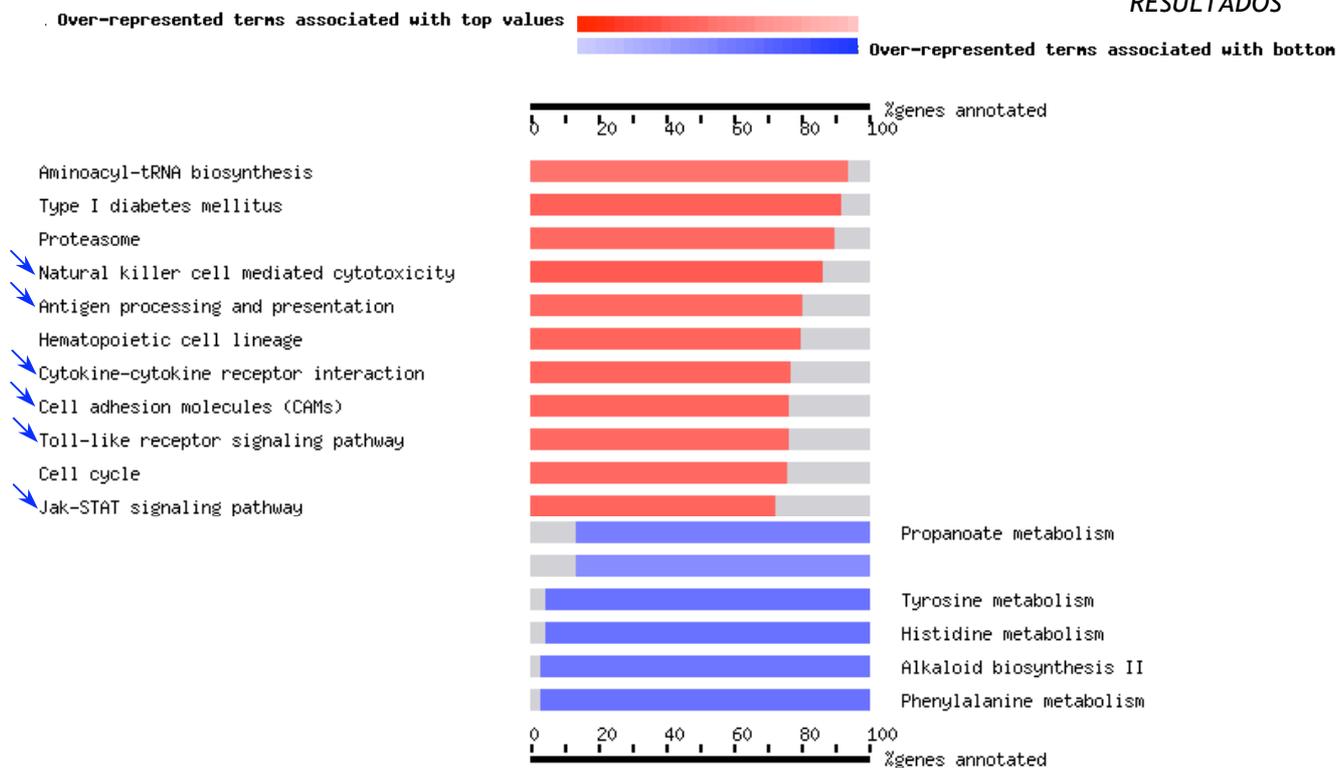


Figura 61. Clasificación de los procesos biológicos identificados con el programa FatiScan en el grupo 9CC. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a procesos asociados con genes sobreexpresados. Los que aparecen junto a las barras azules, contiene los procesos asociados con los genes reprimidos.



**Figura 62.** Clasificación de las funciones moleculares identificadas con el programa FatiScan en el grupo 9CC. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a procesos asociados con genes sobreexpresados. Los que aparecen junto a las barras azules, contiene los procesos asociados con los genes reprimidos.

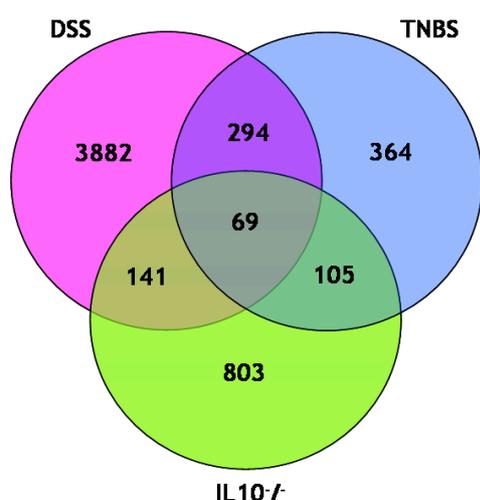


**Figura 63.** Clasificación de las rutas identificadas con el programa FatiScan en el grupo 9CC. Las categorías junto a las barras en rojo, corresponden a procesos asociados con genes sobreexpresados. Los que aparecen junto a las barras azules, contiene los procesos asociados con los genes reprimidos.

## 4. Análisis comparativo de los tres modelos animales

Los tres modelos animales que hemos estudiado difieren entre sí, no sólo en la causa que genera la inflamación, sino en las características macroscópicas e histológicas que presentan los animales. En este análisis se pretende identificar aquellos aspectos que se mantienen comunes en los diferentes modelos de inflamación intestinal, independientemente de la causa que la origina. A su vez, también permitirá identificar procesos o funciones que se alteren de forma diferente en estos modelos, lo cual será de gran utilidad para conocer que modelos son los idóneos para estudiar cada proceso determinado.

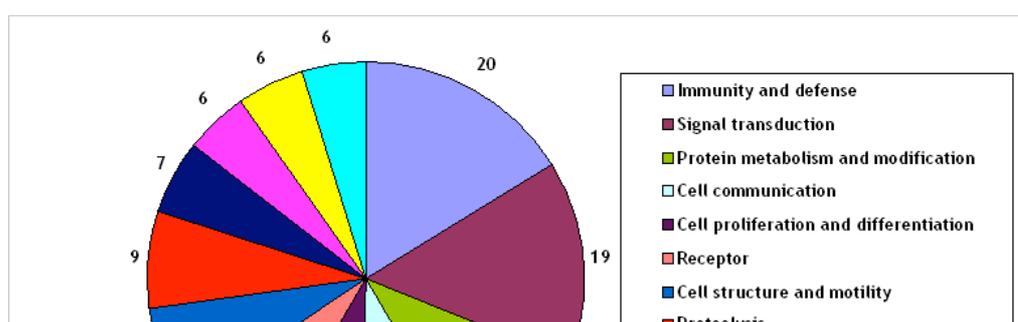
### 4.1 Comparación de las secuencias significativas



**Figura 64.** Diagrama de Venn comparando las fases agudas de los tres modelos: grupo DSS5% (5.102 secuencias- 4.386 genes), grupo TNBS-agudo (941 secuencias- 832 genes), grupo 9CC (1.454 secuencias- 1.118 genes).

La comparación de las listas de genes expresados diferencialmente y de forma significativa en cada modelo (grupo DSS5%: 5.102 secuencias; grupo TNBS-agudo: 941 secuencias; grupo 9CC: 1.454 secuencias) se realizó comparando los símbolos de los genes, y no con los identificadores de Affymetrix. La razón de este cambio es que los identificadores para un determinado gen son diferentes en los chips de rata y ratón, con lo que si queremos comparar genes entre especies diferentes, hay que utilizar el nombre del gen, que sí es el mismo (en la mayoría de los casos) en las dos especies. Puesto que varias secuencias pueden representar el mismo gen (ver apartado 5.1 de *Métodos*), el número de genes que hemos utilizado en este análisis es: DSS5% -4.386 genes-; TNBS-agudo -832 genes-; 9CC -1.118 genes.

En la figura 64 vemos cómo, de los varios cientos o miles (según el modelo) de genes alterados, tan sólo 69 son comunes en los tres modelos. Esto nos indica lo diferentes que son entre sí. Si comparamos los modelos de DSS y TNBS, encontramos más similitudes (363 genes) ya que ambos son modelos, al menos en el mecanismo de inducción (modelos de inducción química), más parecidos entre sí. Estos genes están relacionados principalmente con funciones tales como inmunidad y defensa, metabolismo de proteínas, proliferación y diferenciación celular, estructura y motilidad celular, proteólisis o matriz extracelular (*Figura 65*).



*Figura 65. Procesos y funciones principales relacionadas con la lista de 69 genes comunes en los tres modelos, según el programa Panther. Los números corresponden al número de genes incluidos en cada categoría.*

## 4.2 Análisis funcional

El análisis funcional de este estudio comparativo entre los tres modelos lo realizamos con el programa Ingenuity, por ser el único de todos los que hemos empleado que permite comparar varias listas de genes incluso si pertenecen a especies animales diferentes. Para ello, utilizamos las listas de secuencias significativas de cada modelo (5.102 en DSS5%, 941 en TNBS-agudo y 1.454 en 9CC). Las figuras 66 y 67 muestran el análisis de procesos biológicos y el de enfermedades, respectivamente. En ambos análisis se pueden observar aspectos comunes entre los modelos, así como procesos que sólo se afectan de manera significativa en alguno de ellos. En los tres modelos se alteran procesos como el crecimiento y proliferación celular, muerte celular, ciclo celular o el transporte molecular (Figura 66). Procesos como el movimiento celular, aunque se encuentra afectado en los tres modelos, es mucho más significativo en el modelo de TNBS. Otros como la interacción célula-célula o el metabolismo mineral y de vitaminas destacan principalmente en los modelos de TNBS e IL10<sup>-/-</sup>. Por otro lado, encontramos numerosos procesos que sólo se afectan de manera significativa en el modelo de DSS, como la síntesis de proteínas, el metabolismo de aminoácidos, de carbohidratos y de drogas. También resulta interesante el metabolismo lipídico, que como ya identificamos en el estudio de cada modelo por separado, se encuentra alterado en los modelos de DSS y TNBS. Esta alteración no ocurre, en cambio, en el modelo de IL10<sup>-/-</sup>, lo que nos indica que para el estudio de las alteraciones en el metabolismo lipídico en la inflamación intestinal, no será una buena opción emplear el modelo de IL10<sup>-/-</sup>. Sin embargo, la eliminación de radicales libres sólo aparece afectada en el modelo de IL10<sup>-/-</sup>.

En el análisis de enfermedades (Figura 67) también observamos aspectos interesantes. Los genes analizados se relacionan en los tres modelos con enfermedades del tejido conectivo, cáncer, enfermedad gastrointestinal y alteraciones neurológicas. Las diferencias más importantes se aprecian en la categoría de enfermedad inflamatoria y enfermedad inmunológica, donde destacan con diferencia los modelos de

TNBS e IL10<sup>-/-</sup>. Este hallazgo nos vuelve a indicar que la colitis en el modelo de DSS parece no producirse por la activación de un determinado tipo de respuesta inmune, como sí ocurre en los otros dos modelos.

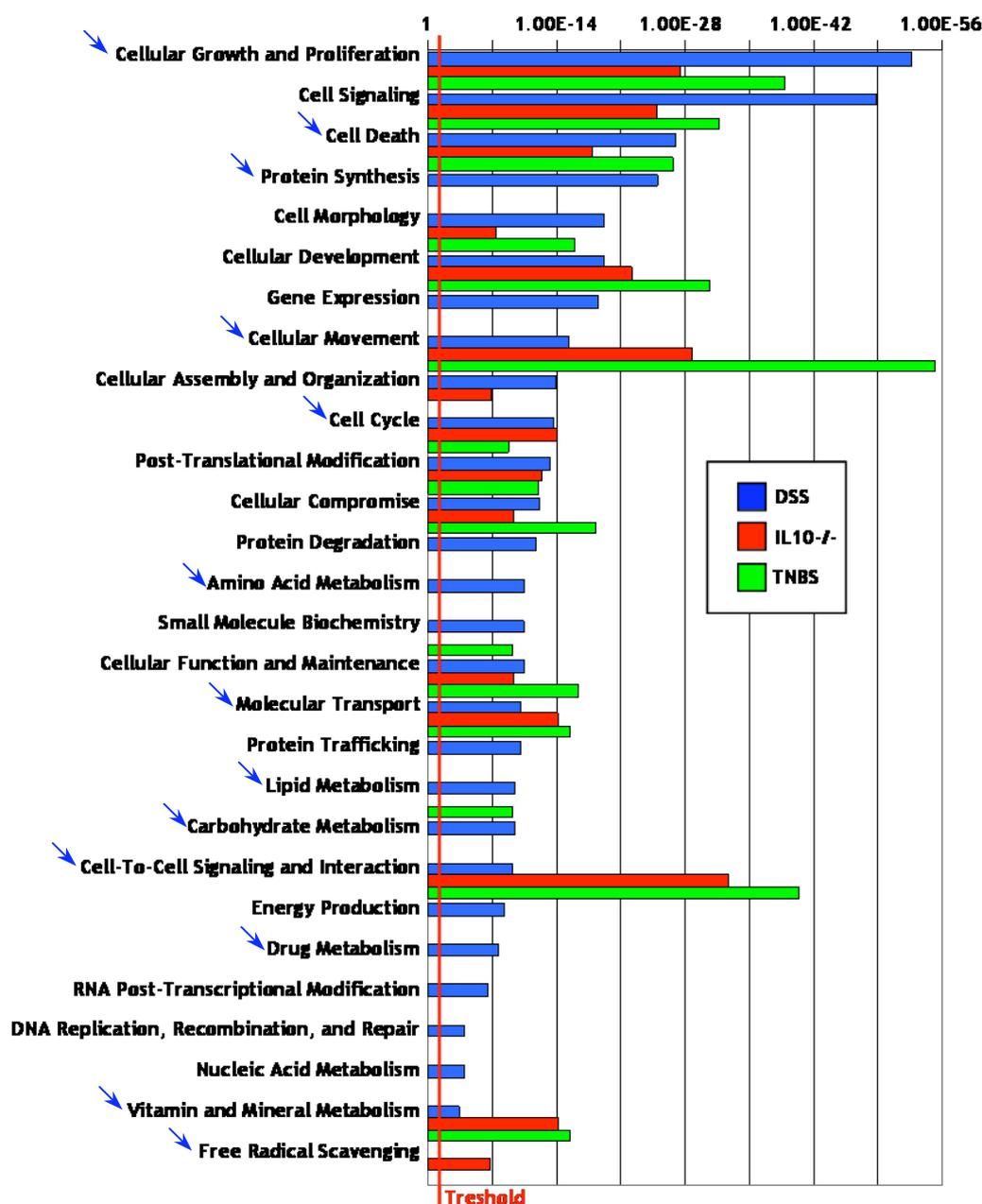


Figura 66. Análisis funcional comparativo de los procesos celulares y moleculares de los tres modelos realizado con el programa Ingenuity con las secuencias diferencialmente expresadas en cada uno (5.102 en el grupo DSS5%; 941 en el grupo TNBS-agudo; 1.454 en el grupo 9CC. Las flechas señalan los procesos comentados en el texto

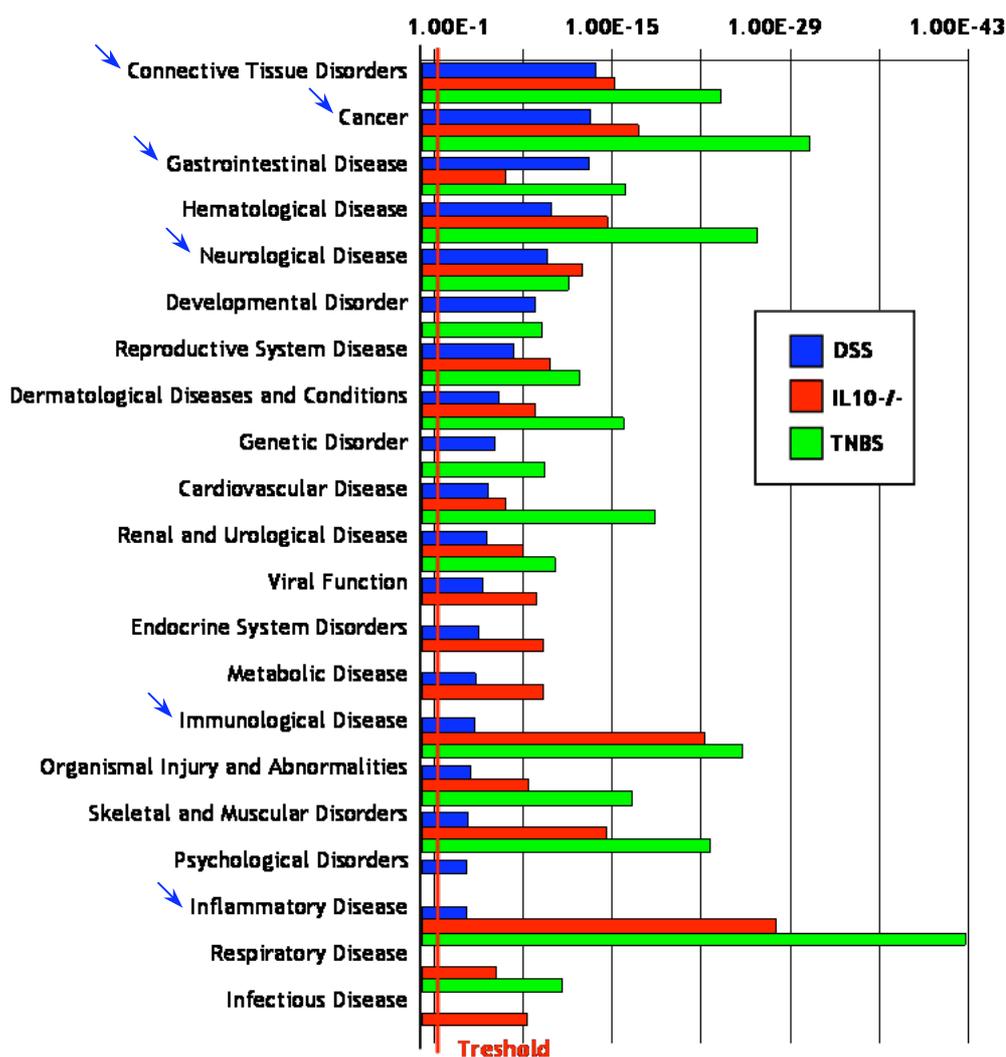


Figura 67. Análisis funcional comparativo de las enfermedades relacionadas con los tres modelos realizado con el programa Ingenuity con las secuencias diferencialmente expresadas en cada uno (5.102 en el grupo DSS5%; 941 en el grupo TNBS-agudo; 1.454 en el grupo 9CC. Las flechas señalan los procesos comentados en el texto.



## 5. Análisis exploratorio de dianas terapéuticas

Uno de los objetivos principales de este trabajo se basa en poder obtener una utilidad práctica a partir de datos procedentes de experimentos a escala genómica. Además de realizar una descripción de cada modelo de inflamación para conocer con más detalle los aspectos específicos de cada uno, así como las características comunes de la inflamación intestinal, que nos ayudará a conocer que modelo será el más acertado según el trabajo a realizar, la obtención de información a gran escala sobre estos modelos puede ser una excelente estrategia para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Para realizar esta búsqueda partimos de los genes identificados en los modelos de DSS y TNBS que además están confirmados por qPCR (*Tabla 11* de apartado 1.4 y *Tabla 17* del apartado 2.4, de *Resultados*). En este análisis no incluimos el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup> ya que hasta el momento no hemos realizado la confirmación de ningún gen por qPCR. Empleamos la base de datos PharmGKB (<http://www.pharmgkb.org/>), que contiene información, entre otros datos, sobre relaciones entre genes y fármacos. De los genes objeto de la búsqueda (33 y 57 en los modelos de DSS y TNBS respectivamente) encontramos 16 genes en el modelo de DSS de los que existe alguna relación con fármacos conocidos (ya sea porque es la diana terapéutica de dicho fármaco o porque hay descrita en la literatura alguna interacción entre ese gen y el fármaco). En el caso del modelo de TNBS encontramos 20 genes y si comparamos ambos modelos identificamos 12 genes con relación con algún fármaco que son comunes a los dos tipos de modelos (*Tabla 23*). En este resultado encontramos varios fármacos que ya se emplean para el tratamiento de la enfermedad o bien, se ha estudiado su efecto en modelos animales, como los glucocorticoides, la mercaptoputina o el metotrexato. Encontramos además otros fármacos interesantes como los cannabinoides, que recientemente se ha propuesto su estudio como tratamiento potencial para la EII, y el Tegaserod, un agonista de la serotonina que se está indicado actualmente para el tratamiento del síndrome de colon irritable.

Consideramos éste como un análisis exploratorio inicial con el que poder generar nuevas hipótesis de trabajo que, con experimentos adicionales y un estudio más detallado de cada gen y cada fármaco (si son agonistas/antagonistas...), puedan llevarnos a confirmar la utilidad de algunos de los fármacos identificados mediante esta estrategia en el tratamiento de la EII. La escasez de programas o recursos para realizar este tipo de búsquedas es actualmente el principal obstáculo para la identificación de dianas terapéuticas a partir de los miles de datos que se obtienen de un análisis a escala genómica. La base de datos PharmGKB, aunque es una base de datos incompleta, supone una primera aproximación a este tipo de estrategias. El siguiente paso para ampliar el resultado que hemos obtenido sería realizar la búsqueda con mayor número de genes afectados en la colitis y de aquellos en los que se identifiquen fármacos novedosos y con potencial terapéutico en la EII, realizar la validación de dichos genes y posteriormente, ensayos de eficacia en la enfermedad.

**Tabla 23.** Lista de genes afectados y confirmados en los modelos de DSS y TNBS que tienen relación con fármacos conocidos según la base de datos PharmGKB.

Símbolo	Título	Confirmado en DSS	Confirmado en TNBS	Fármaco asociado
A2m	alpha-2-macroglobulin	✓	✓	Glucocorticoids
Adk	adenosine kinase	✓		Antimetabolite
Adora1	adenosine A1 receptor	✓		Caffeine, methotrexate, Theophylline
Adora2a	adenosine A2a receptor		✓	Caffeine, methotrexate, Theophylline
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	✓	✓	Glucocorticoids
Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3		✓	Acetylcholine, Anesthetics, nicotine, Trimethapan
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4		✓	IL2
Faah	fatty acid amide hydrolase	✓		Cannabinoids
Htr4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4		✓	Tegaserod
Icam1	intercellular adhesion molecule 1		✓	Glucocorticoids
Il10	interleukin 10	✓	✓	Prednisone, Dexametasona
Il1a	interleukin 1 alpha	✓	✓	Glucocorticoids, Dexametasona
Il1b	interleukin 1 beta	✓	✓	Glucocorticoids, Methotrexate, Pravastatin
Il1r1	interleukin 1 receptor, type I	✓		Mercaptopurine
Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	✓	✓	Methotrexate
Il6	interleukin 6	✓	✓	Dexametasona, Glucocorticoids
Il8rb	interleukin 8 receptor, beta	✓	✓	Beta-adrenergic antagonists
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	✓	✓	Lovastatin, ACE-inhibitors, Glucocorticoids
Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA		✓	Celecoxib
Ptprc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C		✓	Methotrexate
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	✓	✓	Mercaptopurine, Methotrexate
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	✓	✓	Mercaptopurine, Methotrexate
Slc28a2	solute carrier family 28 member 2		✓	Gemcitabine, Rivavirin
Tnf	tumor necrosis factor	✓	✓	Adalimumab, Dexametasona, Infliximab, Thalidomide, Etanercept, Glucocorticoids

## *DISCUSIÓN*



## DISCUSIÓN

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son dos patologías incluidas dentro de la enfermedad inflamatoria intestinal (15). Aunque existen diferencias entre ellas, ambas se caracterizan por inflamación crónica del tubo digestivo, no existe actualmente ningún tratamiento curativo y la patogénesis, a pesar del intenso esfuerzo en investigación, es aún desconocida. Los últimos descubrimientos en este área incluyen la identificación de numerosos genes de susceptibilidad, que apuntan a un defecto en el funcionamiento del sistema inmune innato como uno de los principales desencadenantes de la inflamación intestinal (18, 20, 21). Sin embargo, uno de los problemas más importantes que presentan estas enfermedades es que no siempre se puede realizar un diagnóstico acertado ya que hay casos en que la CU y la EC son indistinguibles, con lo que el diagnóstico resulta en colitis indeterminada. Tanto el curso clínico, pronóstico, tratamiento y riesgo de determinadas complicaciones es diferente en ambos casos, con lo que la necesidad de realizar un diagnóstico acertado es de vital importancia. Por otro lado, la búsqueda de un tratamiento curativo o al menos, otros tratamientos que controlen mejor los síntomas y en mayor número de pacientes, que produzcan menos efectos secundarios o que eviten complicaciones tan graves como el cáncer colorrectal, es el otro gran campo de investigación en la EII.

Para el estudio de la EII se emplean numerosos modelos animales de inflamación intestinal (63-65), como los de inducción química, que son asequibles y fáciles de obtener, y otros más recientes como los modificados genéticamente. En general, estos modelos son fáciles de inducir, son reproducibles, se emplean especies animales asequibles y fáciles de mantener (generalmente rata y ratón), el curso de la inflamación es predecible y se asemejan en mayor o menor grado, según el modelo, a la respuesta inflamatoria que se produce en la EII humana. Sin embargo, presentan algunas limitaciones como que ninguno cursa con etapas agudas que se alternan con fases de remisión, en general no se consiguen características crónicas y tampoco presentan las manifestaciones extraintestinales que sí se dan en la enfermedad humana. A pesar de ello, los modelos animales han sido fundamentales para conocer y entender muchos aspectos de la enfermedad, entre ellos, la implicación de la flora intestinal normal en el inicio de la enfermedad, lo cual se pudo identificar gracias al desarrollo de modelos libres de gérmenes.

Los modelos animales se emplean principalmente para el estudio de patogénesis de la inflamación intestinal, búsqueda de biomarcadores de colitis y para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Uno de los principales inconvenientes de los modelos animales disponibles es que en muchas ocasiones no están bien descritos y en algunos casos, ni siquiera se conoce completamente el mecanismo por que se genera la colitis, como es el caso del modelo de DSS. Por ello, resulta necesaria una caracterización más completa de los modelos animales, sobre qué procesos están alterados en cada uno, qué genes intervienen, qué aspectos son comunes, en qué grado y en qué aspectos se asemeja cada uno a la enfermedad humana y cuales son más idóneos para estudiar aspectos concretos de la enfermedad.

En los últimos años, con el desarrollo de nuevas tecnologías, han surgido una serie de estrategias y herramientas que permiten realizar ensayos experimentales a gran escala. Para conocer los genes o procesos que están implicados en una enfermedad, o como es nuestro caso, conocer las características de un modelo animal, hasta ahora se ha venido aplicando un enfoque reduccionista basado en el estudio de uno o unos pocos genes concretos, no porque se pensase que era la mejor estrategia, sino porque era la única disponible. Sin embargo, con la reciente aparición, aunque con un crecimiento espectacular, de la Genómica y Proteómica, la manera de estudiar las enfermedades, el efecto de un fármaco o cualquier otra situación, ha cambiado radicalmente ya que permiten estudiar en un único experimento la expresión de todos los genes del genoma o el conjunto de las proteínas. Esto ha sido posible, por un lado gracias al desarrollo de técnicas de miniaturización (que consiguen incluir más de 50.000 sondas (“*probe sets*”) en un fragmento de cristal de 1,28 cm<sup>2</sup>) y, por otro, a la incorporación de herramientas informáticas muy potentes destinadas a la extracción de información biológica, es decir, al desarrollo de la Bioinformática.

En nuestro caso, con la utilización de microchips de DNA hemos realizado un estudio de tres modelos animales de inflamación intestinal con el objetivo de conocer de manera sistemática las características de estos modelos y obtener así una visión global de todos los procesos que se alteran. De esta forma hemos conseguido realizar una caracterización más completa de los procesos alterados en estos modelos, algo impensable empleando una estrategia reduccionista. Aunque se han realizado varios trabajos sobre análisis de microarrays en modelos animales de inflamación intestinal, éstos presentan serias críticas en la interpretación de los resultados y sobre todo en la reproducibilidad de los mismo ya que surgen dudas al compararlos entre sí. Éste es un problema que se ha observado sobre todo en los primeros trabajos realizados con microarrays debido principalmente a la falta absoluta de guías, normas, protocolos, herramientas informáticas adecuadas... y, en definitiva, al desconocimiento sobre la forma correcta de trabajar con datos de microarrays y a la falta de estandarización de la técnica. Por esta razón, pueden encontrarse trabajos de microarrays que, aunque aparentemente estudien la misma enfermedad, llegan a conclusiones contradictorias o las listas de genes afectados que identifican son totalmente diferentes. Las principales fuentes de estas diferencias radican en los tipos de tests estadísticos, las técnicas de normalización y criterios de selección de genes que, o bien se aplican de forma diferente o en otros muchos casos, ni siquiera se llegan a realizar. Además, incluso el famoso trabajo publicado en el año 2003 (155) y comentado en la revista Science (156), que hizo un gran daño a la técnica de microarrays sembrando dudas entre la comunidad científica sobre su fiabilidad, ha sido revisado recientemente y se ha encontrado que contenía graves errores en el tratamiento de los datos y que la conclusión a la que llegaron de que los microarrays no dan resultados reproducibles no era cierta (163-165).

Entre los trabajos realizados con microarrays, encontramos algunos estudios genómicos en los modelos de DSS y TNBS, aunque ninguno, hasta el momento, en el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup>. El más reciente de ellos es el trabajo de Velde y colaboradores (108), en el que comparan los modelos de DSS, TNBS y el modelo de transferencia de células T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> a ratones SCID. El principal problema de

este trabajo es la falta de réplicas y por tanto, la ausencia de cualquier tratamiento estadístico. Por otro lado, es un trabajo muy difícil de comparar con otros ya que han usado un diseño experimental poco usual, como la administración del DSS al 3% (cuando el modelo original se describió al 5%) o la administración del TNBS en dos dosis separadas por un intervalo de 7 días, siendo lo habitual, administrarlo en una única dosis. Tampoco depositan los datos en ninguna base de datos pública, como recomiendan las normas MIAME y además, los resultados no aportan ninguna información nueva ya que se limitan a nombrar genes que ya estaban previamente descritos en la enfermedad. El trabajo de Rivera y colaboradores (109) realizado en el modelo de TNBS, también presenta críticas importantes como el uso de un único array para hibridar una muestra de TNBS y una muestra control, o el no seguir las normas MIAME. Otros trabajos incluyen el de Yamamoto y colaboradores (166), donde utilizan *pool* de muestras y por tanto, ningún análisis estadístico, o el de Nur y colaboradores (111), donde utilizan chips de sondas humanas para hibridar en ellos muestras de rata. En conclusión, no existe hasta el momento ningún estudio genómico serio de los modelos de DSS, TNBS o ratones IL10<sup>-/-</sup>. En cuanto a estudios genómicos realizados en la enfermedad humana, encontramos los mismos problemas, como la falta de réplicas y tratamiento estadístico (167, 113), ausencia de controles sanos (168), falta de confirmación por técnicas independientes (169, 170), o estrategias de normalización un tanto discutibles, como el hacer el escalado de datos de cultivos celulares utilizando datos obtenidos a partir de tejido completo (114). Un trabajo que merece destacarse es el de Costello y colaboradores (115), en el que utilizan 10 réplicas biológicas de cada condición (EC y CU), realizan análisis estadístico y confirman por PCR a tiempo real la alteración en la expresión de algunos genes como *CDH11*, *CYLD*, *DAF* o *IGHG1*.

Afortunadamente, en los últimos años han surgido nuevas y mejores herramientas específicas para el tratamiento de datos, normas específicas sobre cómo comunicar los datos obtenidos de un experimento de microarrays (117-122), estrategias muy innovadoras para extraer información biológica de los miles de datos obtenidos de un microarrays y sobre todo, una mejor unificación y consolidación de los criterios a seguir en este tipo de estudios. Así, en nuestro trabajo, hemos empleado, para la parte experimental, los protocolos estandarizados de Affymetrix, una de las plataformas de microarrays más importantes y extendidas. Por otro lado, en el análisis de datos utilizamos las herramientas informáticas, las metodologías de normalización y tratamiento estadístico y las estrategias más recientes, innovadoras y más aceptadas. De forma paralela en los tres modelos, realizamos el análisis dividiéndolo en dos bloques:

- un análisis temporal, donde se incluye el estudio de agrupamiento de muestras y, por otro lado, el agrupamiento de genes en función de perfiles o patrones de expresión que permite estudiar como evolucionan los cambios en la expresión génica a lo largo de los diferentes puntos temporales. Para realizar este tipo de análisis, se seleccionan los genes que presentan alguna variación entre los distintos puntos a estudiar. En nuestro caso, eliminamos esos genes “planos” en función de la desviación estándar.

- un análisis de expresión diferencial cuyo objetivo se centra en el estudio funcional de procesos o funciones asociadas a los genes afectados en etapas concretas de la inflamación. Los criterios de selección de genes recomendados en este tipo de análisis consisten en realizar un filtrado en función del FC y un valor de  $p$  no muy restrictivo (generalmente  $p < 0,05$ ). Sólo cuando el objetivo se centra en el estudio más detallado de genes concretos, por ejemplo, para identificar biomarcadores, se recomienda aplicar criterios más estrictos.

Por otro lado, el tipo de diseño experimental que hemos llevado a cabo nos ha permitido analizar aspectos muy poco estudiados en estos modelos. Nos referimos a la inclusión de fases de colitis aguda y fases de recuperación, en los dos modelos de inducción química, DSS y TNBS, lo que nos ha permitido por ejemplo, identificar genes relacionados con los mecanismos de reparación. Además, en el modelo de ratones IL10<sup>-/-</sup> hemos podido estudiar la influencia de las bacterias intestinales en el desarrollo y evolución de la colitis, a escala genómica. Hoy se conoce que las bacterias de la flora intestinal normal son necesarias para que se desencadene la inflamación y hasta el momento no se ha conseguido atribuirlo a ningún patógeno específico. Sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo por el que esto ocurre, al igual que los mecanismos de la tolerancia oral por los que las bacterias intestinales, en condiciones fisiológicas, son reconocidas como tales y no desencadenan una respuesta inflamatoria. El estudio global que hemos realizado en el modelo de IL10<sup>-/-</sup>, en el que incluimos un grupo de animales mantenidos en condiciones SPF, nos ha permitido identificar importantes diferencias entre la existencia o no de dichas bacterias en el intestino. Un estudio más detallado de los procesos identificados nos aportará información más específica sobre los mecanismos por los que las bacterias son fundamentales para que aparezca la enfermedad.

Tanto el análisis individual, como el estudio comparado de los tres modelos nos han aportado resultados interesantes y novedosos. En el primero de ellos, el modelo de sulfato de dextrano, indujimos la colitis administrando el tóxico en dos concentraciones diferentes, primero al 5% durante una semana y posteriormente al 2% durante otros siete días. Esto nos ha permitido estudiar cómo influye la concentración de DSS en la gravedad de la inflamación. De la observación de los síntomas y signos (diarreas, pérdida de peso) y el daño macroscópico de la mucosa (úlceras, edema, sangrado, acortamiento del colon) por un lado (*Figura 30*), y de los resultados obtenidos en el análisis temporal de los cambios en la expresión génica, hemos encontrado que al usar una u otra concentración se producen grandes diferencias en la colitis que se genera. El cambio de una concentración del 2% a 5% redujo notablemente la tasa de mortalidad de los animales así como los signos de sangrado intestinal y diarrea. Por otro lado, el análisis de agrupamiento de genes en  $k$ -medias (*Figura 33*) nos muestra cómo algunos grupos de genes experimentan una mejoría casi inmediata al reducir la dosis (grupos 1, 2, 4 y 7) y el análisis de expresión diferencial muestra cómo esa reducción produce una disminución del 27% en el número de genes afectados (*Figura 34*), lo que supone 1.376 secuencias menos. Entre ellas, además se encuentran genes tan importantes como el factor estimulador de macrófagos *Csf1*, las catepsinas B, F, H y M (*Ctsb*, *Ctsf*, *Ctsh*, *Ctsm*), la interleukina 15 (*Il15*), que regula la activación y proliferación de células T y NK, o el gen *Mca32*

que se induce tras la activación de los mastocitos. Realizando un análisis funcional comparativo entre estas dos fases observamos sorprendentemente que la recuperación se produce de forma paralela en casi todos los procesos o funciones afectados (*Figura 36*). Es un resultado importante porque nos indica que el tipo de inflamación que se produce resultan afectados los mismos procesos aunque en diferente grado. Un estudio del año 2000 (62) ya apuntaba a que la colitis era dependiente de la concentración de DSS administrada, aunque en dicho estudio sólo analizaron signos macroscópicos y algunas citocinas típicas como IL1, IL12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Este trabajo, sin embargo, presentaba cierta dificultad en la interpretación de los resultados ya que emplearon como controles sanos animales que recibieron agua destilada, un control no muy acertado ya que es conocido que el agua destilada produce alteraciones intestinales. Nuestro trabajo demuestra que la concentración no solo afecta a los síntomas y alteraciones macroscópicas, sino que también se producen cambios muy acusados en la expresión génica de varios cientos de genes.

Por otra parte, es interesante destacar que hay un conjunto de genes (grupos 5 y 9) que no se afectan por el cambio de concentración de DSS, sino que mantienen el mismo nivel de expresión al 5% y al 2% (*Figura 33*). Esto podría deberse al tipo de regulación de la expresión al que están sometidos dichos genes. La retirada completa del tóxico produjo aún cambios más notables ya que en este caso, la recuperación fue casi completa, como pudimos observar en el análisis de *k*-medias, donde la expresión de prácticamente todos los genes retornaba a valores normales. A nivel macroscópico también se observa dicha recuperación ya que el peso corporal, sobre todo (donde incluso llegan a ganar peso), y la actividad mieloperoxidasa, experimentan mejoría.

El análisis de comparación de fases de las tres etapas incluidas en el modelo (grupos DSS5%, DSS2% y DSS0%) también nos ofrece resultados interesantes (*Figura 35*). Así como observamos que la reducción de la concentración de DSS disminuye el número de genes afectados, en este análisis vemos además que hay muchos genes que son diferentes: 2.234 solo se afectan al 5%, 822 sólo se alteran al 2% y un pequeño grupo de 26 secuencias se alteran únicamente cuando se retira completamente el DSS del agua de bebida. Este último grupo de 26 (*Tabla 11*) genes resulta muy interesante ya que puede incluir genes que intervengan en los procesos de recuperación, con lo que un estudio en profundidad de esos genes podría ser muy valioso. Conviene matizar que no solo podremos encontrar genes relacionados con la recuperación en dicha lista, sino también en las correspondientes a colitis aguda, ya que se sabe que los procesos de reparación de la inflamación (angiogénesis, fibrosis...) se ponen en marcha poco después del inicio de la inflamación.

En el análisis de comparación de fases también identificamos un grupo de 237 secuencias que aparecen afectadas de manera crónica. En ella se incluyen genes típicos de inflamación intestinal, como la *Il1a*, *Il1b*, *Klf5*, *Mmp12* o *Ccl2*. El estudio detallado de estos genes podría aportar información sobre los mecanismos que intervienen en la perpetuación de la inflamación.

El siguiente estudio que realizamos en el modelo de DSS consistió en el análisis funcional de rutas, procesos biológicos y funciones moleculares que se afectan en la etapa de colitis aguda (grupo DSS5%). Para ello, seguimos dos estrategias diferentes. La primera de ellas, y más conocida, consistió en realizar un filtrado de genes según umbrales de corte de FC y valor de  $p$ , para obtener así una lista de secuencias significativas diferencialmente expresadas entre la fase aguda y los animales control. Con esa lista de genes seleccionados, llevamos a cabo el estudio funcional con tres programas diferentes: Panther (*Tablas 6-8*), Ingenuity (*Figuras 38, 39*) y DAVID (*Tabla 9*). El objetivo de este análisis triple era el de, empleando programas que usan bases de datos diferentes, y que aplican tests diferentes, poder identificar los procesos afectados con mayor seguridad y fiabilidad. De esta forma pudimos identificar la alteración en diferentes procesos que se repetían en los diferentes programas utilizados. Así, aparte de todo lo relacionado con la inflamación e inmunidad, proliferación y diferenciación o apoptosis, hemos encontrado la alteración en procesos muy poco, o no descritos previamente en la colitis como el metabolismo lipídico, metabolismo de carbohidratos o alteraciones neurológicas que incluyen las rutas de señalización por receptores nicotínicos, muscarínicos, de serotonina o glutamato. Se sabe que el estrés psicológico puede desencadenar brotes o empeorar estados de inflamación intestinal y nuevas evidencias experimentales sugieren la implicación de interacciones directas entre el sistema nervioso y la respuesta inmune (134). De hecho, recientemente se ha encontrado que el receptor nicotínico  $\alpha 7$  (*Chrna7*) es esencial en la regulación de la inflamación ya que es necesario para la inhibición de la liberación de TNF $\alpha$  por parte de los macrófagos (135). Este gen aparece sobreexpresado en nuestros datos en la fase DSS5%, concretamente en la lista de secuencias que solo se afectan a elevadas concentraciones, es decir, que administrando el DSS al 2% no lo detectaríamos. Estas alteraciones en la actividad neuronal asociadas a la inflamación intestinal que hemos detectado, serían también un importante campo de estudio en la EII.

La segunda estrategia que hemos llevado a cabo para el análisis funcional es radicalmente distinta ya que sigue el mismo enfoque de la Biología de Sistemas, una nueva disciplina que se basa en el estudio de forma global y sistemática del “todo” y no de las partes de un sistema por separado. Siguiendo esta visión, se han desarrollado recientemente nuevas herramientas informáticas que permiten realizar el análisis funcional de datos de microarrays a escala genómica, como los programas GSEA (157) o FatiScan (107). Lo que hace diferente estos programas de los utilizados para el análisis funcional clásico es que no requieren realizar una preselección de genes en función de umbrales de corte, que no dejan de ser criterios “artificiales” y arbitrarios. En cambio, el análisis se realiza con todos los genes incluidos en el chip y consigue identificar aquellos procesos, funciones o rutas que están afectados de manera significativa. Se había observado que la estrategia con genes seleccionados generaba muchos falsos negativos, con lo que se comenzaron a desarrollar estas herramientas. En los resultados que hemos obtenido con el programa FatiScan encontramos ventajas importantes frente a los programas clásicos. Se puede observar cómo las categorías que se obtienen tienen mucho más “sentido” para la enfermedad que estamos estudiando (*Figura 40*). Procesos de producción de quimioquinas, respuesta de fase aguda, quimiotaxis de leucocitos... claramente nos indican que estamos ante un proceso inflamatorio. Si miramos

del mismo modo las primeras categorías de procesos biológicos que obtenemos con los otros tres programas (Panther: *Tabla 7*; Ingenuity: *Figura 38*; DAVID: *Tabla 10*) vemos cómo de ningún modo podríamos concluir en que se trata de una inflamación. Esto supone una gran ventaja en la interpretación de los datos. En nuestro caso, sabemos a priori que la enfermedad se caracteriza por un proceso inflamatorio, pero del mismo modo, otros procesos que no están descritos en la enfermedad podrán ser identificados más fácilmente con este tipo de programas. Además, supone también una ventaja para otro tipo de estudios donde no se conozca con antemano lo que debe de salir como resultado. Por otro lado, no solo mejora la interpretación de los resultados sino que nos permite identificar procesos novedosos que ya se intuían con los programas anteriores, como el metabolismo lipídico y la alteración en procesos neuronales. Además, nos muestra también la alteración en los procesos digestivos, algo lógico en este tipo de enfermedad pero que no encontramos con el análisis clásico, y alteración en la actividad hormonal. Una tercera ventaja de la estrategia global es que el análisis se realiza más rápido y más fácil, ya que no requiere ningún tratamiento de los datos de filtrado y selección de genes.

La técnica de microarrays, al menos hoy día, está resultando especialmente útil y fiable para identificar, por ejemplo, nuevos subgrupos de una enfermedad (descubrimiento de clases), como muestra el trabajo de Alizadeh y colaboradores, en el que identifican, mediante agrupamientos jerárquicos de las muestras de pacientes, un nuevo subtipo de linfoma de células B (124). También se están utilizando con éxito en estrategias para la clasificación de tumores (160, 161), predicción de clases (125), búsqueda de biomarcadores de una patología (158) y para identificar procesos o funciones asociados a una enfermedad o a la respuesta a un fármaco (159). Sin embargo, para identificar genes concretos con seguridad y fiabilidad sobre el cambio de expresión detectado por microarrays, debe realizarse la comprobación de dicho cambio mediante técnicas independientes, como PCR a tiempo real o western, entre otras. En el modelo de DSS, seleccionamos un grupo de genes para realizar la validación mediante PCR a tiempo real utilizando arrays de baja densidad (tarjetas “*TaqMan Low Density Arrays*”). En este trabajo presentamos la confirmación de 33 genes en la fase de colitis aguda inducida por DSS (grupo DSS5%). Entre ellos se incluyen genes típicos de inflamación (*S100a8*, *S100a9*, *Tnf*, *Il6*, *Cxcl1*...), genes relacionados con la integridad del epitelio (*Cdx2*) y genes relacionados con los procesos novedosos que identificamos en los análisis funcionales, como las alteraciones neurológicas y el metabolismo lipídico. Entre ellos, encontramos el gen del receptor de la serotonina 2B (*Htr2b*), que se encuentra reprimido. La serotonina, liberada por las células enterocromafines, realiza funciones muy importantes en el intestino, iniciando los reflejos secretorios y peristálticos y transmitiendo información hacia el sistema nervioso central (136). Se han descrito alteraciones en la señalización por serotonina en el síndrome del colon irritable, así como en la colitis ulcerosa (137, 138). Además, recientemente se ha aprobado el uso de un agonista parcial del receptores de la serotonina 5-HT(4), el tegaserod, en el síndrome del colon irritable (139, 140), un fármaco que además hemos identificado en el análisis de dianas terapéuticas (*Tabla 23*). Aparte del gen *Htr2b*, resulta muy interesante otro de los genes confirmados por PCR, el *Faah*, un gen implicado en el metabolismo de ácidos grasos, pero que también tiene relación con alteraciones en neurotransmisores ya

que hidroliza compuestos neuromoduladores como la anandamida, un neurotransmisor cannabinoide endógeno. La inhibición de *Faah* resulta en analgesia, por ello, este gen es un buen candidato como diana terapéutica (141). De hecho, este gen lo obtuvimos también como resultado en nuestro análisis de dianas terapéuticas, mostrando así, junto con el resultado del gen anterior (*Htr2b*) la utilidad de estas estrategias de búsqueda de dianas terapéuticas a partir de datos a escala genómica.

Tras obtener muy buenos resultados en el estudio de la colitis inducida por DSS, decidimos emplear la misma estrategia en el siguiente modelo, el TNBS. La inflamación en este caso, se induce con una única dosis del tóxico, que se administra en forma de enema. Los animales desarrollan así una colitis que alcanza su etapa más aguda en los días 5-7 y se recupera de manera gradual aproximadamente hacia el día 14 (Figura 43). Comprobamos la aparición de la enfermedad controlando los síntomas, lesiones macroscópicas y marcadores de inflamación. Los animales presentaron los signos clásicos descritos en este modelo, como pérdida de peso, diarreas sanguinolentas, edema en la mucosa, lesiones necróticas, un intenso infiltrado inflamatorio y acortamiento de la longitud del colon. También observamos cómo la recuperación de estos signos ocurrió de forma gradual hasta el día 14, incluyendo el peso/longitud del colon, lo cual no ocurría en el modelo de DSS en el que tras 7 días de retirada del tóxico no experimentó mejoría.

En el análisis genómico temporal comprobamos, tanto en el agrupamiento jerárquico (Figura 45), como en el agrupamiento de genes (Figura 46), que los días de mayor daño en la expresión génica también corresponden al 5 y 7, y que en el día 14 tras la administración del TNBS, la expresión génica también se ha recuperado en gran medida. En el agrupamiento en *k*-medias observamos varios grupos de genes que se sobreexpresan y se recuperan (grupo 5 -más o menos gradual-, grupo 6 -gradual pero más intenso-, grupo 4 -cambios más o menos crónicos-) y un solo grupo de genes que se reprimen (grupo 3). Es importante tener en cuenta que es más difícil detectar los cambios de expresión de represión que los de sobreexpresión, ya que dependen del nivel basal de expresión que tenga cada gen. Aún así, comparando los cambios de expresión en genes que disminuían en el modelo de DSS, en este modelo vemos que los cambios en los genes que se reprimen son bastante más leves. Otro de los grupos que resulta interesante es el grupo 1, que incluye genes que casi no se afectan durante la colitis pero cuya expresión aumenta en el día 14. El estudio más detallado de esta lista podría ofrecer información sobre los mecanismos de reparación, ya que por ejemplo entre esos genes se encuentran el *Tff3* y las mucinas *Muc1*, *Muc13* y *Muc4*.

En el análisis de expresión diferencial también vemos diferencias importantes con respecto al modelo anterior. En el proceso de filtrado para obtener los genes significativos en la fase de colitis aguda obtuvimos 941 secuencias alteradas (Figura 47), muchas menos que en el modelo de DSS, que fueron 5.102. Además, mientras que en el modelo de DSS predominaban las secuencias reprimidas (75,4%), en este caso son más abundantes las sobreexpresadas (75,6%). Para el análisis funcional de la fase de colitis aguda realizamos de nuevo las dos estrategias: análisis funcional clásico (Panther, Ingenuity y DAVID) y análisis

global (FatiScan). Encontramos la alteración de procesos como angiogénesis, respuesta inmune, ruta de interleukinas e integrinas, transportadores, proliferación celular y la cascada del complemento (*Tablas 14-17, Figuras 51, 52*). Destacan también 60 genes de proteólisis, que intervienen en el daño tisular, 55 genes de matriz extracelular y 36 genes de citoesqueleto. Además, hemos identificado procesos novedosos en este modelo como la alteración en neurogénesis y actividad neuronal, metabolismo lipídico y 13 genes clasificados en la función de péptidos hormonales. En el análisis con el programa FatiScan identificamos además otros procesos muy interesantes como la alteración del ritmo circadiano y el transporte de agua (*Figuras 52-54*). Los programas anteriores detectaban el transporte como un proceso afectado. Sin embargo, el programa FatiScan ofrece la ventaja de que desglosa más las categorías, con lo que ahora vemos que lo que se afecta de manera más significativa es el transporte de agua y también el transporte de electrones y de iones como el potasio.

La melatonina es una neurohormona producida en el cerebro por la glándula pineal, a partir del aminoácido triptófano. La síntesis y liberación de la melatonina son producto de la estimulación de la oscuridad y supresión de la luz. La melatonina se ha empleado para el tratamiento de diversos trastornos del sueño aunque también se investiga su uso para el tratamiento del déficit de atención por hiperactividad, como agente antioxidante, para el tratamiento del glaucoma o incluso para evitar efectos secundarios de la quimioterapia. Y más interesante aún es un estudio muy reciente donde observan que la melatonina produce efectos beneficiosos en los síntomas y calidad de vida de pacientes con síndrome del colon irritable (142) y otro estudio en animales donde observan un efecto protector de la melatonina en la colitis inducida con ácido acético en ratas (143).

Los ensayos de PCR a tiempo real nos confirmaron la alteración de genes muy interesantes, como los receptores colinérgicos *Chrm3* y *Chrna3*, el receptor adrenérgico *Adrb3*, y los receptores de serotonina *Htr4* y *Htr2b*, este último confirmado también en el modelo de DSS y que ya comentamos anteriormente por su potencial terapéutico. También llama la atención el aumento en la expresión del receptor del péptido natriurético *Npr1*. El péptido natriurético es un polipéptido hormonal implicado en el control del agua y sodio corporal y se libera como respuesta a la elevada presión arterial. Poco se sabe sobre la relación entre este péptido y la inflamación intestinal. Sin embargo, otro péptido natriurético conocido como adrenomedulina (gen *Adm*), aislado originalmente del feocromocitoma en 1993 (144, 145), sí ha sido estudiado en modelos de inflamación intestinal observándose que disminuye la severidad de la colitis inducida por ácido acético (146) y por TNBS (147). Este péptido interacciona con receptores del tipo CGRP (“*calcitonin gene-related peptides*”) como el *Cgrb*, que casualmente aparece reprimido en nuestros resultados del modelo de TNBS (lista de 941 secuencias).

Un último gen confirmado que merece destacarse es el receptor de la taquiquinina NK-2 (gen *Tacr2*) que ya se ha relacionado con la colitis ulcerosa (148). A este receptor se une la neurokinina A,

también conocida como sustancia K y está implicado en funciones como la regulación de la motilidad intestinal.

Posteriormente estudiamos el modelo de inflamación intestinal en ratones *knockout* para el gen de la interleukina 10 (74), en dos situaciones diferentes: en condiciones normales y en condiciones libres de patógenos específicos. El curso y gravedad de la inflamación en este modelo es bastante diferente de los dos anteriores. La colitis se genera de manera espontánea a las pocas semanas después del nacimiento y se caracteriza por lesiones transmurales discontinuas, hiperplasia, depleción de mucinas, úlceras y engrosamiento de la pared intestinal. En este modelo se ha descrito además la necesidad de la presencia de bacterias intestinales para que se desarrolle la colitis (162) y que la inflamación que se genera bajo condiciones SPF es más leve y se localiza sobre todo en el colon (78). Para poder estudiar las diferencias entre las condiciones normales y SPF a nivel genómico, incluimos en nuestro estudio un grupo de ratones IL10<sup>-/-</sup> mantenidos en condiciones SPF.

En primer lugar comprobamos la aparición de la inflamación mediante la observación de las lesiones en el colon y parámetros como el peso de los animales y la relación longitud/peso del colon. En la figura 55 observamos cómo en condiciones convencionales, el daño más grave ocurre hacia la semana 9 mientras que a las 12 semanas, la longitud/peso del colon se ha recuperado casi por completo. Sin embargo, la evolución de este marcador es completamente diferente en el grupo de animales mantenidos en condiciones SPF, ya que va en aumento gradual alcanzando el máximo más tarde, en la semana 12. Posteriormente, en el análisis de microarrays, comprobamos que también a nivel genómico, los cambios de expresión siguen también esa misma tendencia (Figura 57), es decir, que alcanzan el máximo en la semana 9 y se recuperan en el grupo CC, mientras que en el grupo SPF el aumento es gradual hasta la semana 12. Parece llamativo lo que ocurre en el grupo CC, aunque se ha descrito que en el tipo concreto de cepa C57B6/J, la colitis que se genera es de tipo moderada y no progresiva (76, 77). Observando esta figura podemos pensar que en condiciones SPF se retrasa la fase más aguda de la colitis. Sin embargo, cuando realizamos el análisis funcional comparado de las dos condiciones (grupos 9CC y 12SPF) observamos que hay diferencias importantes en el tipo de daño que se produce en cada caso. En la figura 60A vemos que aproximadamente la mitad de los genes alterados en cada grupo son comunes, pero en cambio hay muchos otros genes (655 en el grupo 9CC y 851 en el grupo 12SPF) que son completamente diferentes. Mientras que los genes exclusivos del grupo 9CC (655 secuencias) siguen estando relacionados con procesos de inmunidad, los genes exclusivos de la condición SPF (851 secuencias) están implicados principalmente en procesos totalmente diferentes, como actividad neuronal, oncogénesis o estructura celular y motilidad. Esto podría ser debido a la ausencia de bacterias por sí sola, ya que se sabe que la flora intestinal es fundamental para el correcto funcionamiento del intestino. Para poder comprobar si esas 851 secuencias se afectan por la conjunción de IL10<sup>-/-</sup> + SPF, o bien ocurren debido solo a las condiciones SPF, necesitaríamos un grupo de animales control wild type mantenidos en condiciones SPF.

Nos centramos por tanto en el estudio de la colitis aguda en condiciones normales (grupo 9CC), para conocer los procesos que intervienen en este modelo, al igual que hicimos con los modelos anteriores, y también para poder realizar posteriormente la comparación entre los tres modelos. Los procesos que encontramos afectados de manera significativa (Figuras 61-63) están relacionados básicamente con el sistema inmune, aunque en aspectos muy diversos. Destacan, por ejemplo, el procesamiento y presentación de antígenos y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de las cuales, encontramos algunas entre los 50 genes con mayor sobreexpresión (Tabla 19). También observamos la implicación de diversos tipos celulares, como neutrófilos, células T, células B, mastocitos y células NK. Vemos cómo intervienen también procesos de fagocitosis, el sistema del complemento, producción de inmunoglobulinas, moléculas de adhesión, actividad de quimiokinas e interleukinas y rutas como la de los receptores TLR o el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Además, en este modelo observamos también la alteración de procesos neuronales, como el transporte de neurotransmisores, y procesos relacionados con el metabolismo hormonal.

Al no haber realizado hasta el momento la confirmación de genes por PCR a tiempo real, no hemos realizado un estudio en profundidad de genes concretos y de su posible papel en la enfermedad. Podemos fijarnos, sin embargo en las listas de los 50 genes con mayor o menor alteración (Tablas 19-22). Si comparamos las listas de los 50 genes con mayor expresión en los grupos 9CC y 12SPF, vemos que son muy parecidas y sólo unos pocos genes son diferentes en ambas listas. Entre ellos encontramos varios genes típicos de inflamación, como las citokinas Cxcl10, Cxcl9, Cxcl5, S100a8 y S100a9, varias metaloproteasas y el gen *Socs3*, un inhibidor de la señalización de citokinas cuya alteración ya ha sido relacionada con la colitis ulcerosa. Sin embargo, entre los genes reprimidos ocurre lo contrario, solo unos pocos son similares, como el gen *Abcb1a* (más conocido como *mdr* o “*multi-drug resistance*”), la colipasa pancreática (*Clps*), o la transtiretina (*Ttr*), una proteína de fase aguda que transporta en sangre la hormona tiroidea, tiroxina.

A continuación, tras haber analizado por separado cada uno de los modelos, uno de los abordajes más interesantes de nuestro trabajo consistió en el análisis comparado de los tres, enfocado principalmente hacia la búsqueda de biomarcadores de inflamación y dianas terapéuticas. Comenzamos este análisis realizando una comparación entre las listas de los genes significativos identificados en la fase aguda de cada modelo (grupo DSS5%, grupo TNBS-colitis y grupo 9CC). En el diagrama de Venn (Figura 64) podíamos ver que únicamente son comunes 69 genes entre los tres modelos, y se relacionan principalmente con procesos de inmunidad y defensa, proteólisis, actividad de macrófagos y matriz extracelular (Figura 65). Algunos de estos genes son las citokinas *Ccl2* y *Cxcl1*, las metaloproteasas 9, 12 y 13, un marcador de linfocitos (*Ly86*), un inhibidor del NF- $\kappa$ B (*Nfkbiz*), o el gen *Ces1*, marcador de macrófagos implicado en la detoxificación de xenobióticos. Comparando los modelos de dos en dos, vemos que los que más se parecen entre sí son los modelos de DSS y TNBS. Estos modelos comparten se asemejan mucho más en cuanto al desarrollo e inducción de la colitis: a los 3-5 días de la administración del tóxico se produce la fase aguda de la inflamación, mientras que en el modelo de IL10<sup>-/-</sup>, la colitis se genera de

forma más gradual alcanzándose el máximo en un rango de tiempo más amplio, entre las 7-9 semanas. Por otro lado, hay también más similitud entre TNBS- IL10<sup>-/-</sup> que entre DSS- IL10<sup>-/-</sup> ya que en el primer caso, el 18% de los genes (un total de 174) afectados en TNBS, lo están también en IL10<sup>-/-</sup> pero solo el 4,11% de los genes (que son 210) alterados en el modelo de DSS, los comparte con el modelo de IL10<sup>-/-</sup>. Esto es así debido a que, aunque el mecanismo por el que se genera la colitis es muy diferente, tanto en el modelo de TNBS como en el de animales IL10<sup>-/-</sup>, lo que se genera es una respuesta inmune de tipo Th1. Por ello, cabe esperar mayor similitud entre estos dos modelos y no con el de DSS, donde la colitis se produce por la alteración de la función barrera de la mucosa.

La comparación funcional nos permite identificar qué procesos son comunes en los tres modelos, y cuales son significativos sólo en alguno de ellos. Con este análisis podemos determinar qué modelo es más adecuado según el proceso o función que vayamos a estudiar. Así, vemos que hay procesos que están afectados en los tres modelos, como el crecimiento y proliferación celular, ciclo celular o transporte molecular (*Figura 66*). También observamos que hay numerosos procesos que sólo son importantes en el modelo de DSS, como la síntesis y la degradación de proteínas, el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo de carbohidratos o el de fármacos. El modelo de TNBS destaca principalmente en la alteración del movimiento celular, y junto al modelo de IL10<sup>-/-</sup>, en los procesos de interacción célula-célula y metabolismo vitamínico y mineral. Uno procesos más interesantes que identificamos en el análisis individual de los modelos era el metabolismo lipídico. En este resultado vemos como el modelo IL10<sup>-/-</sup> de no sería una buena opción para estudiar este tipo de procesos. En el análisis de enfermedades relacionadas con los genes estudiados (*Figura 67*) vemos cómo las categorías de enfermedad inmunológica y enfermedad inflamatoria, son muy poco relevantes en el modelo de DSS en comparación con los otros dos, apuntando, una vez más, a la alteración de la integridad de la mucosa intestinal como principal mecanismo patogénico de la colitis inducida por DSS. La categoría cáncer destaca principalmente en el modelo de TNBS, mientras que enfermedad neurológica parece estar afectada de igual forma en los tres modelos.

Finalmente, realizamos una búsqueda de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la inflamación intestinal empleando una estrategia basada en la comparación de datos obtenidos mediante análisis de microarrays con bases de datos de información farmacogenética. Una de las aplicaciones más interesantes de los estudios con microarrays de genoma completo es que permiten hacer un barrido completo de los cambios de expresión de todo el genoma, con lo que suponen una excelente fuente de datos para poder identificar dianas terapéuticas, que de otro modo, requerirían muchísimo más trabajo al tener que identificar de uno en uno aquellos genes alterados con potencial terapéutico. El cuello de botella en este tipo de estrategias se encuentra sin embargo en cómo obtener información sobre fármacos de los genes detectados. La única base de datos que se aproxima un poco al tipo de programa necesario para realizar esta búsqueda es la base de datos PharmGKB, que contiene información farmacogenética y farmacogenómica sobre múltiples genes, así como relaciones que se hayan descrito entre genes y fármacos. Comparamos con dicha base de datos los genes que previamente habíamos detectado por

microarrays y confirmado por PCR a tiempo real (33 en el modelo de DSS y 58 en el de TNBS). No incluimos en esta búsqueda los genes identificados en el modelo de IL10<sup>-/-</sup> ya que no hemos realizado hasta el momento la confirmación por técnicas independientes. En la tabla 22 vemos el resultado de este análisis. Entre los fármacos que obtenemos aparecen algunos que ya se utilizan para el tratamiento de la EII, como el metotrexato, corticoides, mercaptopurina, infliximab o adalimumab, lo cual aporta mayor validez al resultado obtenido. Entre las dianas terapéuticas novedosas destacan los receptores de adenosina, para los cuales ya se han probado algunos agonistas con buenos resultados en modelos animales. También resultan interesantes los cannabiboides, que recientemente se han propuesto para el tratamiento de la EII ya que se ha visto que la estimulación de receptores de cannabinoides pueden proteger frente a la inflamación intestinal (149).



## *CONCLUSIONES*



## CONCLUSIONES

**1.** El análisis genómico del modelo de colitis inducida con sulfato de dextrano nos ha permitido identificar grupos de genes cuya expresión sigue patrones asociados a la concentración de tóxico, asociados a la evolución de la colitis y asociados a la recuperación tisular tras la colitis. Mediante el análisis funcional de la fase aguda de este modelo hemos confirmado la implicación de procesos biológicos conocidos e identificado otros nuevos como el metabolismo lipídico, el metabolismo de carbohidratos y alteraciones neurológicas.

**2.** El análisis genómico del modelo de colitis inducida con ácido trinitrobenzenosulfónico nos ha permitido identificar grupos de genes cuya expresión sigue patrones asociados a la colitis aguda, asociados a la evolución de la colitis y asociados a la recuperación tisular tras la colitis. El análisis funcional de la colitis aguda revela categorías funcionales de interés como la alteración de péptidos hormonales, el metabolismo lipídico y alteraciones neurológicas.

**3.** El análisis de PCR a tiempo real confirma los cambios de expresión de un grupo de genes interesantes. Entre ellos destacan los genes de los receptores 2b y 4 de la serotonina (Htr2b y Htr4), el receptor 1 del péptido natriurético (Npr1) y la amida hidrolasa de ácidos grasos (Faah).

**4.** El análisis genómico del modelo de ratones *knockout* IL10 muestra que la evolución de la colitis a nivel genómico es dependiente de las condiciones de crecimiento (condiciones convencionales o SPF). El análisis funcional de la colitis aguda en condiciones convencionales revela una importante alteración en procesos como el procesamiento y presentación de antígenos y en la actividad de diversos tipos celulares como neutrófilos, células NK, mastocitos y linfocitos T y B.

**5.** El análisis comparado revela procesos biológicos comunes así como específicos de cada modelo. A su vez, hemos identificado una “huella genética” de 22 genes como potenciales biomarcadores de la colitis en animales.

**6.** Mediante el análisis bioinformático exhaustivo de los cambios de expresión génica, hemos encontrado un grupo de genes y de procesos biológicos como nuevas dianas terapéuticas potenciales a ensayar en la colitis.



*A*NEXOS



## ANEXO 1

## Genes validados por PCR a tiempo real

## Genes ensayados por PCR a tiempo real (Tarjeta 1)

Assay ID	Public RefSeq	Gene Symbol	Gene Name
Rn00590921_m1	NM_131907.2	Atp2c1	ATPase
Rn00560865_m1	NM_012512.1	B2m	beta-2 microglobulin
Rn00437783_m1	NM_001033670.1	Bcl2l1	Bcl2-like 1
Rn00572734_m1	NM_021752.1	Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2
Rn00673582_m1	NM_022303.1	Card9	caspase recruitment domain family
Rn00562724_m1	NM_012762.2	Casp1	caspase 1
Rn00574069_m1	NM_022277.1	Casp8	caspase 8
Rn00580555_m1	NM_031530.1	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
Rn00570287_m1	NM_019233.1	Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20
Rn00564660_m1	NM_013025.2	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3
Rn02534497_s1	NM_001013145.1	Ccr6	chemokine (C-C motif) receptor 6
Rn01495634_g1	NM_001031638.1	Cd68	CD68 antigen
Rn00580577_m1	NM_031538.2	Cd8a	CD8 antigen
Rn00588729_m1	NM_053977.1	Cdh17	cadherin 17
Rn00576694_m1	NM_023963.1	Cdx2	caudal type homeo box 2
Rn01757496_mH	NM_017363.1	Csh1	chorionic somatomammotropin hormone 1
Rn00755943_gH	NM_033233.1	Csh1l1	chorionic somatomammotropin hormone 1-like 1
Rn00578225_m1	NM_030845.1	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Rn00573260_m1	NM_001033882.1	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Rn00573522_s1	NM_022205.3	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Rn00564113_m1	NM_012950.2	F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor
Rn00596168_m1	NM_152937.1	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Rn00566655_m1	NM_017015.1	Gusb	glucuronidase beta
Rn00566673_m1	NM_017017.1	Hgf	hepatocyte growth factor
Rn00594127_m1	NM_138886.1	Ick	intestinal cell kinase
Rn00594078_m1	NM_138880.2	Ifng	interferon gamma
Rn00587255_m1	NM_053783.1	Ifngr	interferon gamma receptor 1
Rn00584379_m1	NM_053355.1	Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta
Rn01640121_g1	NM_199103.1	Ikbkg	inhibitor of kappaB kinase gamma
Rn00563409_m1	NM_012854.1	Il10	interleukin 10
Rn00589389_m1	NM_057193.1	Il10ra	interleukin 10 receptor alpha
Rn00591721_m1	NM_133519.1	Il11	interleukin 11
Rn00594842_m1	NM_139116.1	Il11ra1	interleukin 11 receptor
Rn00584538_m1	NM_053390.1	Il12a	interleukin 12a
Rn00575112_m1	NM_022611.1	Il12b	interleukin 12b
Rn00587615_m1	NM_053828.1	Il13	interleukin 13
Rn00565548_m1	NM_013129.1	Il15	interleukin 15
Rn00824548_m1	NM_019165.1	Il18	interleukin 18
Rn00584495_g1	NM_053374.1	Il18bp	interleukin 18 binding protein
Rn00566700_m1	NM_017019.1	Il1a	interleukin 1 alpha
Rn00580432_m1	NM_031512.1	Il1b	interleukin 1 beta
Rn00565482_m1	NM_013123.2	Il1r1	interleukin 1 receptor tipe I
Rn00588589_m1	NM_053953.1	Il1r2	interleukin 1 receptor type II
Rn00492642_m1	NM_012968.1	Il1rap	interleukin 1 receptor accessory protein
Rn00592121_m1	NM_133575.1	Il1rl2	interleukin 1 receptor-like 2
Rn00573488_m1	NM_022194.2	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist
Rn00587673_m1	NM_053836.1	Il2	interleukin 2

Rn00590334_g1	NM_130410.2	Il23a	Interleukin 23 alpha subunit p19
Rn00565865_m1	NM_013163.1	Il2ra	interleukin 2 receptor alpha chain
Rn01752908_g1	NM_080889.1	Il2rg	interleukin 2 receptor gamma (severe combined immunodeficiency)
Rn01507027_m1	NM_133380.1	Il4ra	interleukin 4 receptor alpha
Rn00586375_m1	NM_053645.1	Il5ra	interleukin 5 receptor alpha
Rn00561420_m1	NM_012589.1	Il6	interleukin 6
Rn00566707_m1	NM_017020.1	Il6ra	interleukin 6 receptor alpha
Rn01489669_m1	NM_001008725.1	Il6st	interleukin 6 signal transducer
Rn00681900_m1	NM_013110.2	Il7	interleukin 7
Rn00570857_s1	NM_019310.1	Il8ra	interleukin 8 receptor alpha
Rn00567841_m1	NM_017183.1	Il8rb	interleukin 8 receptor beta
Rn00580452_m1	NM_031514.1	Jak2	Janus kinase 2
Rn01640052_g1	NM_198130.1	Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88
Rn01399583_m1		Nfkb1	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1 p105
Rn01413849_g1	NM_001008349.1	Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 p49/100
Rn00578384_m1	NM_030867.2	Nfkbib	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor beta
Rn00820693_g1	NM_012992.2	Npm1	nucleophosmin 1
Rn00572130_m1	NM_021589.1	Ntrk1	neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1
Rn00580999_m1	NM_031598.1	Pla2g2a	phospholipase A2 group IIA (platelets, sinovialfluid)
Rn00596668_m1	NM_153736.1	Plpi	prolactin like protein I
Rn00690933_m1	NM_017101.1	Ppia	peptidylprolyl isomerase A
Rn00561791_m1	NM_012629.1	Prl	prolactin
Rn00566830_m1	NM_017036.1	Prlpa	prolactin-like protein A
Rn00574765_m1	NM_022537.1	Prlpd	prolactin-like protein D
Rn00574730_m1	NM_022530.1	Prlpf	prolactin-like protein F
Rn00561795_m1	NM_001034111.1	Prlr	prolactin receptor
Rn00561821_m1	NM_012637.1	Ptpn1	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1
Rn00588846_m1	NM_053990.1	Ptpn2	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2
Rn00588164_m1	NM_053908.1	Ptpn6	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6
Rn00709901_m1		Ptprc	protein tyrosine phosphatase receptor type C
Rn00821414_g1	NM_032067.1	Ralbp1	ralA binding protein 1
Rn01502266_m1	NM_199267.2	Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Rn00589172_m1	NM_057132.2	Rhoa	ras homolog gene family member A
Rn00595154_m1	NM_139342.1	Ripk3	receptor-interacting serine-threonine kinase 3
Rn00587579_g1	NM_053822.1	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Rn00585879_m1	NM_053587.1	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
Rn00581463_m1	NM_031664.1	Slc28a2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter) member 2
Rn00710911_m1	NM_181639.3	Slc29a3	solute carrier family 29 (nucleoside transporters) member 3
Rn00595838_s1	NM_145879.1	Socs1	suppressor of cytokine signaling 1
Rn00585674_s1	NM_053565.1	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3
Rn00583505_m1	NM_032612.2	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
Rn00562562_m1	NM_012747.2	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
Rn00596917_m1	NM_172021.2	Tbkbp1	TBK1 binding protein 1
Rn01455648_m1	NM_001004198.1	Tbp	TATA box binding protein
Rn00564851_m1	NM_013042.1	Tff3	trefoil factor 3
Rn99999017_m1	NM_012675.2	Tnf	tumor necrosis factor (TNF superfamily member 2)
Rn00565310_m1	NM_013091.1	Tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily member 1a
Rn00755072_m1	NM_013011.2	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

#### Genes ensayados por PCR a tiempo real (Tarjeta 2)

Assay ID	Public RefSeq	Gene Symbol	Gene Name
Rn01640412_s1	NM_012768.1	Drd5	dopamine receptor D5
Rn01638847_m1	NM_053724.2	Glr3	glycine receptor alpha 3 subunit
Rn00571989_m1	NM_021576.1	Nt5e	5' nucleotidase ecto
Rn00568514_m1	NM_017261.1	Gria2	glutamate receptor ionotropic, AMPA2
Rn00788315_m1	NM_183326.2	Gabra1	gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 1

Rn00562004_m1	NM_012667.1	Tacr1	tachykinin receptor 1
Rn00754963_m1	NM_012718.1	Andpro	androgen regulated 20 kDa protein
Rn00589205_m1	NM_057138.2	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
Rn00583793_m1	NM_052799.1	Nos1	nitric oxide synthase 1 neuronal
Rn00566655_m1	NM_017015.1	Gusb	glucuronidase beta
Rn02758689_s1	NM_012784.3	Cnr1	cannabinoid receptor 1 (brain)
Rn00563223_m1	NM_012832.2	Chrna7	cholinergic receptor nicotinic
Rn00584313_m1	NM_053348.1	Fetub	fetuin beta
Rn00561126_m1	NM_012547.1	Drd2	dopamine receptor 2
Rn00561646_m1	NM_012611.2	Nos2	nitric oxide synthase 2 inducible
Rn00592043_m1	NM_133566.1	Cst6	cystatin E/M
Rn00568473_m1	NM_017254.1	Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
Rn00583815_m1	NM_052803.1	Atp7a	ATPase Cu <sup>++</sup> transporting
Rn00577086_m1	NM_024132.3	Faah	fatty acid amide hydrolase
Rn00490680_g1	NM_172036.2	Gabarap	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein
Rn00560589_m1	NM_012488.1	A2m	alpha-2-macroglobulin
Rn00564113_m1	NM_012950.2	F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor
Rn00560986_s1	NM_012527.1	Chrm3	cholinergic receptor muscarinic 3
Rn00577436_m1	NM_024354.1	Chrna4	cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 4
Rn00561409_s1	NM_012585.1	Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A
Rn00563680_m1	NM_012896.1	Adora3	adenosine A3 receptor
Rn00567155_m1	NM_017078.1	Chrna5	cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 5
Rn00709483_m1	NM_022920.1	Grm6	glutamate receptor metabotropic 6
Rn00821705_g1	NM_133537.1	Expi	extracellular peptidase inhibitor
Rn00563402_m1	NM_012853.1	Htr4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4
Rn02043440_s1	NM_012546.1	Drd1a	dopamine receptor D1A
Rn00709588_m1	NM_031608.1	Gria1	glutamate receptor ionotropic, AMPA1 (alpha 1)
Rn00566625_m1	NM_017011.1	Grm1	glutamate receptor metabotropic 1
Rn00573408_m1	NM_022189.1	Htr3b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3b
Rn00561280_m1	NM_012568.2	Glr2	glycine receptor alpha 2 subunit
Rn00596401_m1	NM_153468.1	Gzma	granzyme A
Rn00567668_m1	NM_017155.1	Adora1	adenosine A1 receptor
Rn00583822_m1	NM_052806.1	Chrn4	cholinergic receptor nicotinic beta polypeptide 4
Rn00821752_g1	NM_138517.2	Gzmb	granzyme B
Rn00578656_m1	NM_031003.1	Abat	4-aminobutyrate aminotransferase
Rn00563677_m1	NM_012895.3	Adk	adenosine kinase
Rn00570733_m1	NM_019297.1	Chrn2	cholinergic receptor nicotinic beta polypeptide 2
Rn00566691_s1	NM_017018.1	Hrh1	histamine receptor H 1
Rn00592325_m1	NM_133600.1	Slc31a1	solute carrier family 31 (copper transporters) member 1
Rn01471343_m1	NM_016991.2	Adra1b	adrenergic receptor alpha 1b
Rn00563724_m1	NM_012901.1	Ambp	alpha 1 microglobulin/bikunin
Rn01483153_m1	NM_001012027.1	Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor clade C (antithrombin) member 1
Rn00561140_m1	NM_012552.2	Ela1	elastase 1 pancreatic
Rn00566438_m1	NM_016989.1	Adcyap1	adenylate cyclase activating polypeptide 1
Rn00567055_m1	NM_017069.1	Gabra3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor subunit alpha 3
Rn00596289_g1	NM_153308.3	Grina	glutamate receptor ionotropic N-methyl D-aspartate-associated protein 1
Rn00565582_m1	NM_013133.1	Glr1	glycine receptor alpha 1 subunit
Rn00561341_m1	NM_012573.2	Grin2a	glutamate receptor ionotropic N-methyl D-aspartate 2A
Rn00568267_m1	NM_017238.1	Vipr2	vasoactive intestinal peptide receptor 2
Rn00564071_m1	NM_012944.1	Drd4	dopamine receptor D4
Rn00568450_m1	NM_017250.1	Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
Rn01415507_g1	NM_012837.1	Cst3	cystatin C
Rn00580641_m1	NM_031545.1	Nppb	natriuretic peptide precursor type B
Rn00570853_m1	NM_019309.1	Grik2	glutamate receptor ionotropic kainate 2
Rn02347738_m1	NM_012685.2	Vipr1	vasoactive intestinal peptide receptor 1

Rn00561981_m1	NM_012661.1	Sts	steroid sulfatase
Rn00564227_m1	NM_012967.1	Icam1	intercellular adhesion molecule 1
Rn00566628_m1	NM_017012.1	Grm5	glutamate receptor metabotropic 5
Rn00673872_m1	NM_022513.1	Sult1b1	sulfotransferase family 1B member 1
Rn00562488_s1	NM_012739.2	Adra2a	adrenergic receptor alpha 2a
Rn00576522_m1	NM_023091.1	Gabre	gamma-aminobutyric acid A receptor epsilon
Rn00560862_m1	NM_012511.1	Atp7b	ATPase Cu <sup>++</sup> transporting beta polypeptide
Rn00565393_m1	NM_013108.1	Adrb3	adrenergic receptor beta 3
Rn01510633_m1	NM_031834.1	Sult1a1	sulfotransferase family 1A phenol-preferring member 1
Rn00593341_s1	NM_138506.1	Adra2c	adrenergic receptor alpha 2c
Rn00567876_m1	NM_017191.1	Adra1a	adrenergic receptor alpha 1a
Mm00438286_m1	NM_009924.2	Cnr2	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
Rn00566593_m1	NM_017007.1	Gad1	glutamic acid decarboxylase 1
Rn00567568_m1	NM_017140.1	Drd3	dopamine receptor D3
Rn00567311_m1	NM_017097.1	Ctsc	cathepsin C
Rn00564146_m1	NM_012956.1	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor subunit beta 1
Rn00561678_m1	NM_012613.1	Npr1	natriuretic peptide receptor 1
Rn00567029_m1	NM_017065.1	Gabrb3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor subunit beta 3
Rn01757368_mH	NM_001007732.1	MGC94010	similar to SPI6
Rn00583820_m1	NM_052805.1	Chrna3	cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide 3
Rn00592317_m1	NM_133597.1	Chrb3	cholinergic receptor nicotinic beta polypeptide 3
Rn00561717_m1	NM_012620.1	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor clase E member 1
Rn00436896_m1	NM_080768.1	Tacr2	tachykinin receptor 2
Rn00562002_m1	NM_012666.1	Tac1	tachykinin 1
Rn00564149_m1	NM_012957.1	Gabrb2	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor subunit beta 2
Rn02532311_s1	NM_031016.1	Chrm2	cholinergic receptor muscarinic 2
Rn00695755_m1	NM_013085.2	Plau	plasminogen activator urokinase
Rn00576373_m1	NM_023021.1	Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel subfamily N
Rn00582124_m1	NM_031755.2,	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1
Rn00573505_m1	NM_022202.1	Grm8	glutamate receptor metabotropic 8
Rn00583935_m1	NM_053294.3	Adora2a	adenosine A2a receptor
Rn00560650_s1	NM_012492.2	Adrb2	adrenergic receptor beta 2
Rn00591653_m1	NM_133511.1	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
Rn01755352_m1		Grm3	glutamate receptor metabotropic
Rn00577803_m1	NM_024394.1	Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3a

## ANEXO 2

### Cálculo del valor de significancia ( $p$ -value) en los programas Ingenuity Pathways Analysis y DAVID.

El valor de  $p$  asociado con una determinada ruta o función, es una estimación de la probabilidad de que la asociación entre un grupo de genes del experimento y un determinado proceso sea debida a la casualidad. Mientras menor sea el valor de  $p$ , hay menos probabilidad de que la asociación sea casual, con lo que la asociación es más significativa. En general, valores de  $p$  menores que 0,05 indican una asociación estadísticamente significativa, no debida a la casualidad.

#### Como usar el $p$ -value

Se sugiere que los valores de  $p$  deben calcularse como punto de partida para investigaciones posteriores y como guías aproximadas que ayudan a identificar procesos o rutas significativamente afectadas en el experimento. En algunos casos serán necesarias evidencias adicionales para comprender totalmente las implicaciones biológicas de resultados identificados como significativos. En otros casos, sin embargo, podrán encontrarse resultados con valores de  $p$  mayores que 0,05 pero que con experimentos adicionales se confirmen que son reales. Esto puede ocurrir, sobre todo, en el caso de las clasificaciones según rutas, ya que la implicación de un único gen de una ruta (y más aún si está al principio de la misma) puede ser biológicamente significativa aunque estadísticamente no lo sea.

#### Ingenuity Pathways Analysis

En este programa, el  $p$ -value está calculado usando el “*right-tailed Fisher Exact Test*”. Este método considera, por un lado, el número de genes del experimento incluidos en un determinado proceso, y por otro, el número total de genes que se sabe que están asociados con dicho proceso, según la base de datos “*Ingenuity Knowledge Base*” (IKB). Mientras más genes de nuestro experimento estén implicados con un proceso, más probabilidad hay de que esa asociación no sea casual. De igual forma, mientras más grande es el número total de genes de ese proceso incluido en la base de datos, mayor es la probabilidad de que la asociación sea debida a la casualidad. Por ejemplo:

- experimento 1:

5 genes relacionados con hematopoyesis

50 genes de hematopoyesis en la base de datos IKB

- experimento 2:

5 genes relacionados con ciclo celular

10 genes de ciclo celular en IKB

En el caso del experimento 2, el  $p$ -value será más significativo, ya que, aunque tengamos el mismo número de genes en ambos procesos, hay mayor sobre-representación de genes de ciclo celular respecto del total de genes conocidos en la base de datos IKB con estas funciones.

### **DAVID: Functional Annotation Tool**

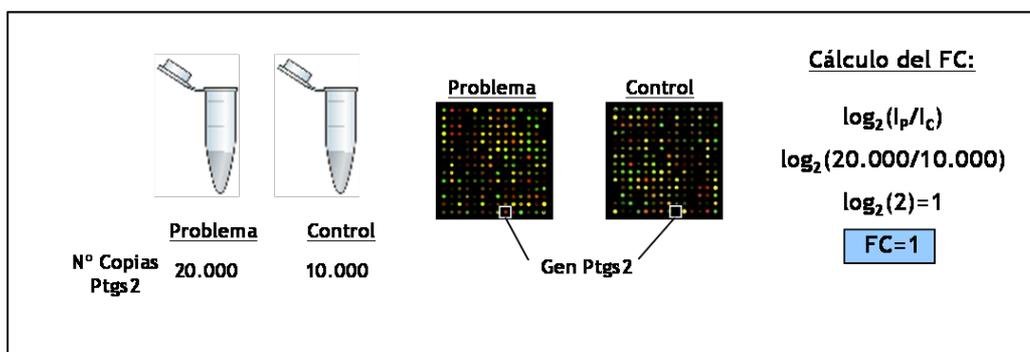
En este caso, el  $p$ -value está calculado mediante un test exacto de Fisher modificado, conocido como “*EASE score*” (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Pongamos el siguiente ejemplo hipotético: en el genoma humano (30.000 genes en total) tenemos 40 genes implicados en la ruta de señalización de p53. En nuestro experimento, con un total de 300 genes, tenemos 3 pertenecientes a la ruta de p53. Lo que se pretende calcular es si 3 de 300 es una asociación significativa comparada con 40 de 30.000. En este caso se obtendría un valor de 0,008, con lo que la asociación no puede atribuirse a la casualidad. En este tipo de test suelen tomarse valores menores o iguales a 0,01 para considerarlos significativos.

## ANEXO 3

### Como comparar los cambios de expresión obtenidos de los arrays con los cambios obtenidos de la PCR a tiempo real

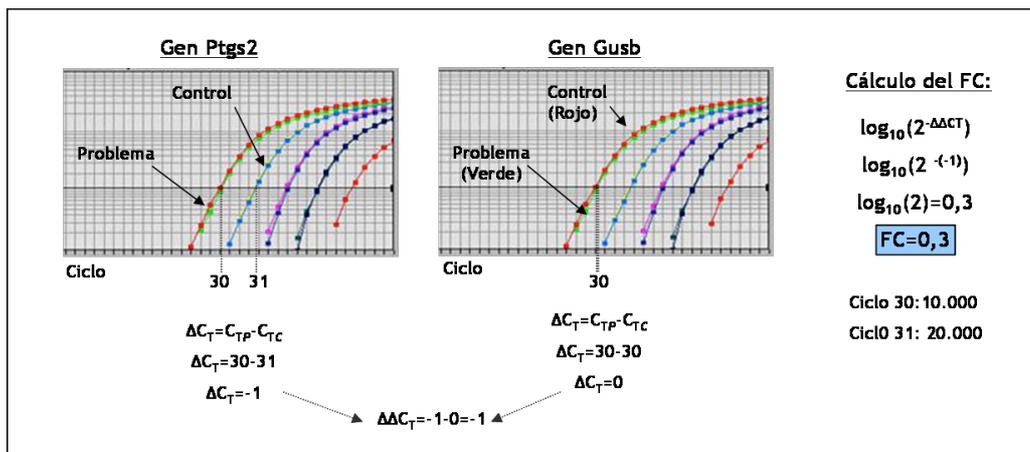
Los valores de FC que se obtienen de un experimento de microarrays no son directamente comparables a los obtenidos por una PCR a tiempo real, puesto que no se miden los mismos parámetros. En los experimentos de microarrays se cuantifica la intensidad de la señal de hibridación, que es directamente proporcional al número de moléculas de un determinado gen que existe en la muestra. Sin embargo, en la PCR, lo que se mide es el ciclo en el cual la intensidad de la señal alcanza un determinado valor fijado previamente (umbral o “*treshold*”). En el siguiente ejemplo podemos ver cómo teniendo el mismo cambio de expresión, el FC que se obtiene en los arrays y en la PCR es diferente:

#### Experimento de arrays



En este ejemplo, tenemos una muestra problema con 20.000 copias del gen *Ptgs2* y una muestra control con 10.000 copias para ese mismo gen. EL FC en los arrays se calcula como  $\log_2$  del cociente (Intensidad señal problema/ Intensidad señal control). En este caso, el FC que obtenemos es 1.

#### Experimento de PCR a tiempo real



La figura anterior muestra el valor que obtendríamos en el mismo caso pero si el experimento lo hacemos por qPCR. En la PCR lo que medimos es el ciclo en el que la señal de intensidad supera un umbral ( $C_T$ ), ya que es eso lo que nos permite detectar las diferencias de una muestra de otra, es decir, que lo que se mide no se refiere al número de moléculas, como ocurría en los arrays. En la primera gráfica se muestra la intensidad de la señal en varias muestras para el gen *Ptgs2*. La muestra problema supera el umbral en el ciclo 30, mientras que la muestra control lo hace en el ciclo 31. El incremento de ciclos será -1. Por otra parte, los valores de qPCR hay que corregirlos con un gen endógeno, en este caso *Gusb*. Un gen endógeno óptimo es aquel en el que el valor de expresión no varía entre las diferentes condiciones del experimento. En la gráfica se observa como el CT en la muestra problema y control es igual. El incremento de ciclos del gen endógeno, que es el que hay que restar al incremento del gen a medir (*Ptgs2*), es en este caso igual a 0, con lo que el incremento del incremento de CT es -1. El FC se calcula a continuación como  $\log_{10}(2^{-\Delta\Delta CT})$ , que da como resultado 0,3. En este ejemplo la variación en un solo ciclo da un valor de FC=0,3. En cada ciclo de una PCR la cantidad de moléculas se duplica, es decir que el cambio en un solo ciclo podría significar por ejemplo que en una muestra hay 10.000 copias y en la otra 20.000, cuyo FC en qPCR sería 0,3 mientras que el los arrays sería de 1.

La conclusión de esto es que los datos de arrays y qPCR no son directamente comparables, ya que además de estar midiendo variables diferentes (número de moléculas / número de ciclo), la escala en las que se calculan también son distintas ( $\log_2 / \log_{10}$ ). Para poder comparar estos datos y saber si un gen que hemos seleccionado en los arrays se confirma o no por qPCR, hay que considerar el valor de significancia de la PCR (generalmente  $p < 0,05$ ) y que el tipo de cambio sea igual, es decir, que la expresión aumente o bien disminuya tanto en arrays como PCR. Por tanto, no podemos esperar que el valor de FC en ambos experimentos sea el mismo.

## *R*EFERENCIAS



## REFERENCIAS

1. Marhman E., Booth C., Potten C.S. **The intestinal epithelial stem cell.** *BioEssays* 2002;24:91-98.
2. Mayer LL. **Epithelial cell antigen presentation.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2000;16:531-535.
3. Wong W.M., Poulson R., Wright N.A. **Trefoil peptides.** *Gut* 1999;44:890-895.
4. Karl Kunzelmann, Marcus Mall. **Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease.** *Physiological Reviews* 2002;82:245-289.
5. Dignass A.U. **Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2001;7(1):68-77.
6. Nusrat A, Delp C., Madara J.L. **Intestinal epithelial restitution.** *Journal of Clinical Investigation* 1992;89:1501-1511.
7. Booth D, Potten C.S. **Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines.** *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2001;29:16-20.
8. O'Hara A.M., Shanahan F. **The gut flora as a forgotten organ.** *EMBO reports* 2006;7(7):688-693.
9. Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I. **The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.** *PNAS* 2004;101(44):15718-15723.
10. Simecka J.W. **Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998;34:235-259.
11. Iwasaki A., Kelsall B.L. **Mucosal immunity and inflammation I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses.** *American Journal of Physiology* 1999;276:G1074-G1078.
12. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. **Inmunología celular y molecular.** Editorial McGraw-Hill Interamericana 2002; Cuarta edición; capítulo 10:216-239.
13. Fujihashi K, Dohi T, Rennert P.D., Yamamoto M., Koga T., Kiyono H., McGhee J.R. **Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins.** *PNAS* 2001;98(6):3310-3315.
14. Sansonetti P.J. **War and peace at mucosal surfaces.** *Nature Reviews* 2004;4:953-964.
15. Gassull M.A., Gomollón F., Obrador A., Hinojosa J. **Enfermedad Inflamatoria Intestinal.** Ediciones Ergon 2002; Segunda edición.
16. **IBD.42** - García-Paredes J., Mendoza J.L. **Epidemiología descriptiva de la Enfermedad**

**Inflamatoria Intestinal en España.** Anales de Medicina Interna 2003;20(1):1-2.

17. López San Román A., Bermejo F. **Inflammatory Bowel Disease in Spain: problems grow.** Revista Española de Enfermedades Digestivas 2004;96(5):291-295.

18. Hanauer S.B. **Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities.** Inflammatory Bowel Diseases 2006;12:S3-S9.

19. Baumgart D.C., Sandborn W.J. **Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.** Lancet 2007;369:1641-1657.

20. Farrel R.J., Peppercorn M.A. **Ulcerative colitis.** Lancet 2001;359:331-340.

21. Baumgart D.C., Carding S.R. **Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.** Lancet 2007;369:1627-1640.

22. Ogura Y., Bonen D.K., Inihara N., Nicolae D.L., Chen F.F., Ramos R., Britton H., Thomas Moran T, Karaliuskas R, Duerr R.H., Achkar J.P., Brant S.R., Bayless T.M., Kirsner B.S., Hanauer S.B., Nuñez G., Cho J.H. **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohns disease.** Nature 2001;411:603-606.

23. Hugot J.P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J.P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C.A., Gassull M.A., Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel J.F.,

Sahbatou M., Thomas G. **Association of Nod2 leucine-rech repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.** Nature 2001;411:599-603.

24. Parkes M, Jewell D. **Ulcerative colitis and Crohn's disease: molecular genetics and clinical implications.** Expert Reviews in Molecular Medicine 2001;19:1-17.

25. Ahmad T., Satsangi J., McGovern D., Bunce M., Jewell D.P. **Review article: the genetics of inflammatory bowel disease.** Alimentary pharmacology & therapeutics 2001;15:731-748.

26. Schreiber S., Hampe J. **Genomics and inflammatory bowel disease.** Current Opinion in Gastroenterology 2000;16:297-305.

27. Cobrin G.M., Abreu M.T. **Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease.** Immunological Reviews 2005;206:277-295.

28. Peña A.S., Peñate M. **Susceptibilidad genética y regulación de la inflamación en la enfermedad de Crohn. Relación con el sistema inmune innato.** Revista Española de Enfermedades Digestivas 2002;94(6):351-355.

29. Noble C, Nimmo E., Gaya D., Russell R.K., Satsangi J. **Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease.** World journal of gastroenterology 2006;12(13):1991-1999.

30. Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Lloyd Mayer LL., Targan S., Domschke W. **Recent understanding of IBD pathogenesis:**

**implications for future therapies.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2006;12:1068-1083.

31. Duerr R.H., Taylor K.D., Brant S.R., Rioux J.D., Silverberg M.S., Daly M.J., Steinhart A.H., Abraham C., Regueiro M., Griffiths A., Dassopoulos T, Alain Bitton A., Yang H., Targan S, Datta L.W., Kistner E.O., Schumm L.P., Annette T Lee A.T., Gregersen P.K., Barmada M.M., Rotter J.I., Nicolae D.L., Cho J.H. **A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.** *Science* 2006;314:1461-1463.

32. Hampe J., Franke A., Rosenetiel P., Till A., Teuber M., Huse K., Albrecht M., Mayr G., De La Vega F.M., Briggs J., Günther S., Prescott N.J., Onnie C.M., Häslér R., Sipos B., Fölsch U.R., Lengauer T., Platzer M., Mathew C.G., Krawczak M., Schreiber S. **A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.** *Nature Genetics* 2007;39(2):207-211.

33. Jager P.L., Franchimont D., Waliszewska A., Bitton A., Cohen A., Langelier D., Belaiche J., Vermeire S., Farwell L., Goris A., Libouille C., Jani N., Dassopoulos T., Bromfield G.P., Dubois B., Cho J.H., Brant S.R., Duherr R.H., Yang H., Rotter J.I., Silverberg M.S., Steinhart A.H., Daly M.J., Podolsky D.K., Louis E., Hafler D.A., Rioux J.D. **The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Genes and Immunity* 2007; 8(5):387-97

34. Libiouille C., Louis E., Hansoul S., Sandor C., Farnir F., Franchimont, Vermeire S., Dewit O, de Vos M., Dixon A., Demarche B., Gut I., Heath S.,

Foglio M., Liang L., Laukens D., Mni M., Zelenika D., Gossum A.V., Rutgeerts P., Belaiche J., Lathrop M., Georges M. **Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4.** *Plos Genetics* 2007;3(4):538-543.

35. Parker M., Barrett J.C., Prescott N.J., Tremelling M., Anderson C.A., Fisher S.A., Roberts R.G., Nimmo E.R., Cummings F.R., Soars D., Drummond H., Lees C.W., Khawaja S.A., Bangall R., Burke D.A., Todhunter C.E., Ahmad T, Onnie C.M., McArdle W., Strachan D., Bethel G., Bryan C., Lewis C.M., Deloukas P., Forbes A., Sanderson J., Jewell D.P., Satsangi J., Mansfield J.C., the Wellcome Trust Case Control Consortium, Lon Cardon, Christopher G. Mathew. **Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease.** *Nature Genetics* 2007: 39(7):830-832.

36. Ho G.T., Soranzo N., Nimmo E.R., Tenesa A., Goldstein D.B., Satsangi J. **ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach.** *Human Molecular Genetics* 2006;15(5):797-805.

37. Peltekova V.D., Wintle R.F., Rubin L.A., Amos C.I., Huang Q., Gu X., Newman B., Oene M.V., Cescon D., Greenberg G., Griffiths A., St George-Hyslop P.H., Siminovitch K.A. **Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease.** *Nature Genetics* 2004;36(5):471-475.

38. Stoll M., Corneliusen B., Costello C.M., Waetzig G.H., Mellgard B., Koch W.A., Rosenstiel P., Albrecht M., Croucher P.J.P., Seegert D., Nikolaus S., Hampe J., Lengauer T., Stefan Pierrou S., Foelsch U.R., Mathew C.G., Lagerstrom-Fermer M., Schreiber S. **Genetic variation in DLG5 is associated with Inflammatory Bowel Disease.** *Nature Genetics* 2004;36(5):476-480.
39. O'Hara A.M., Shanahan F. **The gut flora as a forgotten organ.** *EMBO reports* 2006;7(7):688-693.
40. Johan Van Limbergen J.V., Richard K. Russell R.K., Elaine R. Nimmo E.R., Ho G., Arnott I.D., Wilson D.C., Satsangi J. **Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13:1-18.
41. Comalada M, Peppelenbosch M.P. **Impaired innate immunity in Crohn's disease.** *Trends in Molecular Medicine* 2005;12(9):397-399.
42. Strober W. **Unraveling gut inflammation.** *Science* 2006;313:1053-1054.
43. Hibi T., Ogata H. **Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease.** *Journal of Gastroenterology* 2006;41:10-16.
44. Neurath M.F., Finotto S., Fuss I., Boirivant M., Galle P.R., Strober W. **Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question.** *Trends in Immunology* 2001;22(1):21-26.
45. Rescingo M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P., Ricciardi-Castagnoli P. **Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.** *Nature Immunology* 2001;2(4):361-367.
46. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. **Oxalozone colitis, a Th2 model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells.** *Immunity* 2002;17:629-638.
47. Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., Mankertz J., Gitter A.H., Bürgel N., Fromm M., Zeitz M., Fuss I., Strober W., Schulzke J.D. **Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis and cell restitution.** *Gastroenterology* 2005;129:550-564.
48. Karayiannakis A.J., Syrigos K.N., Efstathiou J., Valizadeh A., Noda M., Playford R.J., Kmiet W., Pignatelli M. **Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease.** *Journal of pathology* 1998;185:413-418.
49. Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., Kroesen A.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. **Changes in expression and distribution of claudin 2,5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn disease.** *Gut* 2007;56(1):61-72.

50. Weber C.R., Turner J.R. **Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall?** *Gut* 2007;56:6-8.
51. Wehkamp J., Harder J., Weichenthal M., Mueller O., Herrlinger K.R., Fellermann K., Schroeder J.M., Stange E.F. **Inducible and constitutive B-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2003;9(4):215-223.
52. MacDonald T.T., Monteleone G., Pender S.L.F. **Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease.** *Scandinavian Journal of Immunology* 2000;51:2-9.
53. Steinman L. **A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.** *Nature Medicine* 2007;13(2):139-145.
54. Rieder F., Brenmoehl J., Leeb S., Schölmerich J., Rogler G. **Wound healing and fibrosis in intestinal disease.** *Gut* 2007;56(1):130-139.
55. Dubinsky M.C., Seidman E.G. **Diagnostic markers of inflammatory bowel disease.** *Curr Opin Gastroenterol* 2000;16:337-342.
56. Beaven S.W., Abreu M.T. **Biomarkers in inflammatory bowel disease.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2004;20:318-327.
57. Katz S. **Update in medical therapy of ulcerative colitis.** *J. Clin. Gastroenterol.* 2005;39:557-569.
58. Hanauer S.B., Sparrow M. **Therapy of ulcerative colitis.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2004;20:345-350.
59. Panaccione R., Sandborn W.J. **Medical therapy of Crohn disease.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2004;20:351-359.
60. Marteau P. **Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel disease?** *Gut* 2006;55:1692-1693.
61. Braat H., Rottiers P., Hommes D.W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J.P., van Deventer S.J., Neiryck S., Peppelenbosch M.P., Steidler L. **A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease.** *Clinical gastroenterology and hepatology* 2006;4(6):754-759.
62. Egger B., Bajaj-Elliott M., MacDonald T.T., Inglin R., Eysselein V.E., Büchler M.W. **Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency.** *Digestion* 2000;62:240-248.
63. Wirtz S., Neurath M.F. **Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease.** *Int J Colorectal Dis* 2000;15:144-160.
64. Arseneau K.O., Pizarro T.T., Cominelli F. **Discovering the cause of inflammatory bowel disease: lessons from animal models.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2000;16:310-317.

65. Blumberg R.S., Saubermann L.J., Warren Strober. **Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease.** *Current Opinion in Immunology* 1999;11:648-656.
66. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. **A novel method of the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice.** *Gastroenterology* 1990; 98(3):694-702.
67. Dieleman L.A., Palmen M.J.H.J., Akol H., Bloemena E., Peña A.S., Meuwissen S.G.M., Van Rees E.P. **Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines.** *Clinical and experimental immunology* 1998;114:385-391.
68. Gaudio E., Taddei G., Vetuschi A., Sferra R., Frieri G., Ricciardi G., Caprilli R. **Dextran sulphate sodium (DSS) colitis in rats. Clinical, structural and ultrastructural aspects.** *Digestive Diseases and Sciences* 1999;44(7):1458-1475.
69. Dieleman L.A., Ridwan B.U., Tennyson G.S., Beagley K.W., Bucy R.P., Elson C.O. **Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice.** *Gastroenterology* 1994 ;107(6) :1643-52.
70. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. **Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium.** *Experimental Animals* 1999;48(3):137-143.
71. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. **Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights.** *Experimental Animals* 2000;49(1):9-15.
72. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallance J.L. **Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.** *Gastroenterology* 1989 ;96 :795-803.
73. Dohi T., Fujihashi K., Rennert P.D., Iwatani K., Kiyono H., McGhee J.R. **Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses.** *The Journal of experimental medicine* 1999;189(8):1169-1179.
74. Kühn R., Löhler J., Rennick D., Rajewsky K., Müller W. **Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.** *Cell* 1993;75:263-274.
75. Madsen K.L. **Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse.** *Clin. Invest. Med.* 2001 ;24(5) :250-257.
76. Michael Mähler M., Leiter E.H. **Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2002;8(5):347-355.
77. Berg D.J., Davidson N., Kühn R., Müller W., Menon S., Holland G., Thompson-Snipes L., Leach M.W., Rennick D.M. **Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production**

and CD4+TH1-like responses. *Journal of Clinical Investigations* 1996;98(4):1010-1020.

78. Rennick D.M., Fort M.M. **Lessons from genetically engineered animal models XII. IL-10-deficient (IL-10<sup>-/-</sup>) mice and intestinal inflammation.** *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2000;278:G829-G833.

79. Grütz G. **New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunisuppression.** *Journal of Leukocyte Biology* 2005;77:3-15.

80. Akdis C.A., Blaser K. **Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression.** *Immunology* 2001;103:131-136.

81. Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F. **An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.** *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190(7):995-1003.

82. Berg D.J., Davidson N., Kühn R., Müller W., Menon S., Holland G., Thompson-Snipes L., Leach M.W., Rennick D. **Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+TH1-like responses.** *Journal of Clinical Investigations* 1996;98(4):1010-1020.

83. Davidson N.J., Leach M.W., Fort M.M., Thompson-Snipes L., Kühn R., Müller W., Berg D.J., Rennick D.M. **T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in**

**interleukin 10-deficient mice.** *Journal of Experimental Medicine* 1996;184:241-251.

84. Davidson N.J., Hudak S.A., Leslye R.E., Menon S., Leach M.W., Rennick D.M. **IL-12, but not IFN- $\gamma$ , plays a mayor role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice.** *The Journal of Immunology* 1998; 161:3143-3149.

85. Li M.C., He S.H. **IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease.** *World journal of gastroenterology* 2004;10(5):620-625.

86. Steidler L., Hans W., Schotte L., Neiryck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E. **Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10.** *Science* 2000;289:1352-1355.

87. Steidler L., Neiryck S., Huyghebaert N., Snoeck V., Vermeire A., Goddeeris B., Cox E., Remon J.P., Remaut E. **Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10.** *Nature Biotechnology* 2003;21(7):785-789.

88. Braat H., Rottiers P., Hommes D.W., Huyghebaert N., Remaut E., Remon J.P., van Deventer S.J., Neiryck S., Peppelenbosch M.P., Steidler L. **A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease.** *Clinical gastroenterology and hepatology* 2006;4(6):754-759.

89. Watson J., Crick F. **Molecular structure of nucleic acids.** *Nature* 1953;171:737-738.

90. Ehrenberg M., Johan Elf J., Aurell E., Sandberg R., Tegné J. **Systems Biology is taking off.** *Genome Research* 2003;13:2377-2380.
91. Nurse P. **Understanding cells.** *Nature* 2003;424:883.
92. Kitano H. **Systems Biology: a brief overview.** *Science* 2002;295:1662-1664.
93. Sauer U., Heinemann M., Zambona N. **Getting closer to the whole picture.** *Science* 2007;316:550-551.
94. Hodgkinson M., Webb P.A. **A system for success: BMC Systems Biology, a new open access journal.** *BCM Systems Biology* 2007;1:41.
95. Venter J.C., et al. **The sequence of the Human Genome.** *Science* 2001;291:1304-1351.
96. International Human Genome Sequencing Consortium. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001;409:860-921.
97. Tsai Y.J., Hayme H.E. **Pharmacogenomics: the future of drug therapy.** *Clinical Genetics* 2002;62:257-264.
98. Service R.F. **Going from genome to pill.** *Science* 2005;308:1858-1860.
99. McLeod H.L., Evans W.E. **Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy.** *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 2001;41:101-121.
100. Gatzidou E.T., Zira A.N., Theocharis S.E. **Toxicogenomics: a pivotal piece in the puzzle of toxicological research.** *Journal of Applied Toxicology* 2007;27:302-309.
101. Lipshutz R. J., Morris D., Chee M., Hubbell E., Kozal M. J., Shah N., Shen N., Yang R., Fodor S. P. **Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity.** *Biotechniques* 1995;19(3):442-447.
102. Schena M., Shalon D., Davis R. W., Bown P. O. **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995; 270(5235):368-9,371.
103. Gerhold D., Rushmore T., Caskey C.T. **DNA chips: promising toys have become powerful tools.** *Tibs* 1999;24:168-169.
104. Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., Lockhart D.J. **High density synthetic oligonucleotide arrays.** *Nature Genetics* 1999;21:20-24.
105. López M., Mallorquín P., Vega M. **Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana.** Informe de vigilancia tecnológica. *Genoma España* 2005.
106. Glas A.M., Floore A., Delahaye L.J.M.J., Witteveen A.T., Pover R.C.F., Bakx N., Lahti-Domenici J.S.T., Bruinsma T.J., Warmoes M.O., Bernards R., Wessels L.F.A., Van't Veer L.J. **Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test.** *BMC Genomics* 2006;7:278-287.

107. Al-Shahrour F., Arbiza L., Dopazo H., Huerta-Cepas J., Mínguez P., Montaner D., Dopazo J. **From genes to functional classes in the study of biological systems.** BMC Bioinformatics 2006;8:114-130.
108. Velde A.A., de Kort F., Sterrenburg E., Pronk I., Kate F.J.W., Hommes D.W., van Deventer S.J.H. **Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease.** Inflammatory Bowel Disease 2007;13(3):325-330.
109. Rivera E., Flores I., Rivera E., Appleyard C.B. **Molecular profiling of a rat model of colitis: validation of known inflammatory genes and identification of novel disease-associated targets.** Inflammatory Bowel Diseases 2006;12(10):950-966.
110. Abad C., Juarranz Y., Martinez C., Arranz A., Rosignoli F., García-Gómez M., Leceta J., Gomariz R.P. **cDNA array analysis of cytokines, chemokines and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP.** Inflammatory Bowel Diseases 2005;11(7):674-684
111. Nur T., Peijnenburg A.A.C.M., Noteborn H.P.J.M., Baykus H., Reifen R. **DNA microarray technology reveals similar gene expression patterns in rats with vitamin A deficiency and chemically induced colitis.** Journal of Nutrition 2002;132:2131-2136.
112. Langmann T., Moehle C., Mauerer R., Scharl M, Liebisch G., Zahn A., Stremmel W., Schmitz G. **Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes.** Gastroenterology 2004;127:26-40.
113. Dieckgraefe B.K., Stenson W.F., Korzenik J.R., Swanson P.E., Harrington C.A. **Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays.** Physiological Genomics 2000;4:1-11.
114. Dooley T.P., Curto E.V., Reddy S.P., Davis R.L., Lambert G.W., Wilborn T.W., Elson C.O. **Regulation of gene expression in inflammatory bowel disease and correlation with IBD drugs.** Inflammatory Bowel Diseases 2004;10:1-14.
115. Costello C.M., Häslér N.M.R., Rosenstiel P., Waetzing G.H., Hahn A., Lu T., Gurbuz Y., Nikolaus S., Albrecht M., Hampe J., Lucius R., Klöppel G., Eickhoff H., Lehrach H., Lengauer T., Schreiber S. **Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays.** Plos medicine 2005;2,8:771-785.
116. Ball C.A., Sherlok G., Parkinson H., Rocca-Sera P., Brooksbank C., Causton H.C., D., Gaasterland T., Hingamp P., Holstege F., Ringwald M., Spellman P., C.J., Stewart J.E., Taylor R., Brazma A., Quackenbush J. **Standards for microarray data.** Science 2002;298:539.
117. Stoeckert Jr C.J., Causton H.C., Ball C.A. **Microarray databases: standards and ontologies.** Nature Genetics 2002;32:469-473.
118. Taylor C.F. **Progress in standards for reporting omics data.** Current Opinion in Drug Discovery and Development 2007;10(3):254-263.

119. Taylor C.F. **Standards for reporting bioscience data: a forward look.** Drug Discovery Today 2007; 12(13-14):527-533.
120. Alabis Brazma A., Pascal Hingamp P., John Quackenbush J., Gavin Sherlock G., Paul Spellman P., Chris Stoeckert C., John Aach J., Wilhelm Ansorge W., Catherine A. Ball C.A., Helen C. Causton H.C., Terry Gaasterland T., Patrick Glenisson P., Frank C.P. Holstege F.C.P., Kim I.F., Markowitz V., Matese J.C., Parkinson H., Robinson A., sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Tylor R., Vilo J., Vingron M. **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-towards standards for microarray data.** Nature Genetics 2001;29:365-371.
121. (No authors listed) **Minimum compliance for microarray experiment?** Nature Genetics 2006;38(10):1089.
122. Burgoon L.D. **The need for standards, not guidelines, in biological data reporting and sharing.** Nature Biotechnology 2006;24(11):1369-1373.
123. Martínez J. **Función e importancia de la Bioinformática en el desarrollo de las ciencias, especialmente en Biotecnología y Medicina Molecular.** Ciencia y Trabajo 2006;22:159-163.
124. Alizadeh A.A., Elsen M.B., Davis R.E., Ma C., Lossos I.S., Rosenwald A., Boldrick J.C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J.I., Yang L., Marti G.E., Moore T., Hudson Jr J., Lu L., Lewis D.B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W.C., Greiner T.C., Weisenburger D.D., Armitage J.O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M.R., Byrd J.C., Botstein D., Brown P.O., Staudt L.M. **Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.** Nature 2000;403:503-511.
125. Golub T.R., Slonim D.K. Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., M. L. Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S. **Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring.** Science 1999;286:531-537.
126. Ramaswamy S., Tamayo P., Rifkin R., Mukherjee S., Yeang C.H., Angelo M., Ladd C., Reich M., Latulippe E., Mesirov J.P., Poggio T., Gerald W., Loda M., Lander E.S., Golub T.R. **Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures.** PNAS 2001;98(26):15149-15154.
127. Krawisz J.E., Sharon P., Stenson W.F. **Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assesment of inflammation in rat and hamster models.** Gastroenterology 1984;87(6):1344-1350.
128. Thomas P.D., Campbell, M.J., Kejariwal A., Mi H., Karlak B., Daverman R., Diemer K., Muruganujan A., Narechania A. **PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function.** Genome Research 2003;13:2129-2141.
129. Dennis G. Jr, Sherman B.T., Hosack D.A., Yang J., Gao W., Lane H.C., Lempicki R.A. **DAVID: Database for Annotation, Visualization,**

and Integrated Discovery. *Genome Biology* 2003;4(5):P3.

130. Al-Shahrour F., Minguéz P., Tárraga J., Montaner D., Alloza ., Vaquerizas J.M., Conde L., Blaschke C., Vera J., Dopazo J. **BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments.** *Nucleic Acids Research* 2006; 34(Web Server issue):W472-6.

131. Herrero J., Al-Shahrour F., Díaz-Uriarte R., Mateos A., Vaquerizas J.M., Santoyo J., Dopazo J. **GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis.** *Nucleic Acids Research* 2003; 31(13):3461-3467.

132. Livak K.J., Schmittgen T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.** *Methods* 2001;25:402-408.

133. Rezaie A., Parker R. D., Abdollahi M. **Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?** *Digestive Diseases and Sciences* 2007;52:2015-2021.

134. Mawdsley J.E., Rampton D.S. **Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications.** *Gut* 2005;54:1481-1491.

135. Wang H., Yu M., Ochani M., Amella C.A., Tanovic M., Susarla S., Li J.H., Wang H., Tracey K.J. **Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$**

**subunit is an essential regulator of inflammation.** *Nature* 2003;421:384-388.

136. Gerson M.D., Tack J. **The serotonin signalling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders.** *Gastroenterology* 2007;132(1):397-414.

137. Coates M.D., Mahoney C.R., Linden D.R., Sampson J.E., Chen J., Blaszyk H., Crowell M.D., Sharkey K.A., Gershon M.D., Mawe G.M., Moses P.L. **Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome.** *Gastroenterology* 2004;126(7):1657-1664.

138. Galligan J.J. **5-hydroxytryptamine, ulcerative colitis, and irritable bowel syndrome: molecular connections.** *Gastroenterology* 2004;126(7):1897-1899.

139. Cole P., Rabasseda X. **Tegaserod: a serotonin 5-HT receptor agonist for treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome.** *Drugs Today* 2004;40(12):1013-1030.

140. Harish K., Hazeena K., Thomas V., Kumar S., Jose T., Narayanan P. **Effect of tegaserod on colonic transit time in male patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007;22(8):1168-9.

141. Cravatt B.F., Lichtman A.H. **Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2003;7:469-475.

142. Saha L., Malhotra S., Rana S., Bashin D, Pandhi P. **A preliminary study of melatonin in irritable bowel syndrome.** *Journal of Clinical Gastroenterology* 2007;41(1):29-32.
143. Nosál'ová V., Zeman M., Cerná S., Navarová J., Zakálová M. **Protective effect of melatonin in acetic acid induced colitis in rats.** *Journal of Pineal Research* 2007;42:364-370.
144. Cases A., Mora-Macía J. **Adrenomedulina: un nuevo péptido vasoactivo.** *Neurología* 2001;21(1):16-25.
145. Hinson J.P., Kapas S., Smith D.M. **Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide.** *Endocrine Reviews* 2000;21(2):138-167.
146. Ashizuka S., Ishikawa N., Kato J., Yamaga J., Inatsu H., Eto T., Kitamura K. **Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats.** *Peptides* 2005;26:2610-2615.
147. González-Rey E., Fernández-Martin A., Chorny A, Delgado M. **Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease.** *Gut* 2006;55:824-832.
148. Burcher E., Shang F., Warner F.J., Du Q., Lubowski D.Z., King D.W, Liu L. **Tachykinin NK2 receptor and functional mechanisms in human colon: changes with indometacin and in diverticular disease and ulcerative colitis.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2007.
149. Kunos G., Pacher P. **Cannabinoids cool the intestine.** *Nature Medicine* 2004;10:678-679.
150. Baumgart D.C., Carding S.R. **Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology.** *Lancet* 2007;369:1627-1640.
151. Zeissig S., Burgel N., Gunzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., Kroesen A.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke JD. **Changes in expression and distribution of claudin 2,5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn disease.** *Gut* 2007;56(1):61-72.
152. Hanauer S.B. **Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities.** *Inflammatory Bowel Diseases* 2006;12:S3-S9.
153. MacDonald T.T., Monteleone G., Pender S.L.F. **Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease.** *Scan J Immunol* 2000;51:2-9.
154. Breuer R.I., Soergel K.H., Lashner B.A. **Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial.** *Gut* 1997;40:485-491.
155. Tan P.K., Downey T.J., Spitznagel E.L. Jr, Xu P., Fu D., Dimitrov D.S., Lempicki R.A., Raaka B.M., Cam M.C.. **Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms.** *Nucleic Acids Research* 2003;31(19):5676-5684.

156. Marshall E. Getting the noise out of gene arrays. *Science* 2004;306:630-631.
157. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. **Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.** *PNAS* 2005;102(43):15545-15550.
158. Scherzer C.R., Eklund A.C., Morse L.J., Liao Z., Locascio J.J., Fefer D., Schwarzschild M.A., Schossmacher M.G., Hauser M.A., Vance J.M., Sudarsky L.R., Standaert D.G., Growdon J.H., Jensen R.V., Gullans S.R. **Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood.** *PNAS* 2007;104(3):955-960.
159. Jorstad T.S., Langaas M., Bones A.M. **Understanding sample size: what determines the required number of microarrays for an experiment?** *TRENDS in Plant Science* 2007;12(2):46-50.
160. Tamayo P., Scanfild D., Ebert B.L., Gillette M.A., Roberts C.W.M., Mesirov J.P. **Metagene projection for cross-platform, cross-species characterization of global transcriptional states.** *PNAS* 2007;101(14):5959-5964.
161. Ramaswamy S., Tamayo P., Rifkin R., Mukherjee S., Yeang C.H., Angelo M., Ladd C., Reich M., Latulippe E., Mesirov J.P., Poggio T., Gerald W., Loda M., Lander E.S., Golub T.R. **Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures.** *PNAS* 2001;98(26):15149-15154.
162. Sellon R.K., Tonkonogy S., Schultz M., Dieleman L.A., Grenther W., Balish E., Rennick D.M., Sartor B. **Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice.** *Infection and Immunity* 1998;66(11):5224-5231.
163. Shi L., Tong W., Fang H., Scherf U., Han J., Puri R.K., Frueh F.W., Goodsaid F.M., Guo L., Su Z., Han T., Fuscoe J.C., Xu Z.A., Patterson T.A., Hong H., Xie Q., Perkins R.G., Chen J.J., Casciano D.A. **Cross-platform comparability of microarray technology: intra-platform consistency and appropriate data analysis procedures are essential.** *BCM Bioinformatics* 2005;6(Suppl 2):S12.
164. Brammler T. et al. **Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms.** *Nature Methods* 2005;2(5):329-330.
165. MAQC Consortium. **The MicroArray Quality Control (MAQC) projet shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements.** *Nature Biotechnology* 2006;24(9):1151-1161.
166. Yamamoto S., Isuzugawa Y., Murase Y., Iwata M., Arisawa T., Nakano H., Nishimura N., Yamato S., Ohta M., Ina K., Murata T., Hori M., Ozaki H., Imakawa K. **Intestinal gene expression in TNBS treated mice using GeneChip and subtractive cDNA analysis: implications for Crohn's disease.** *Biological & pharmaceutical bulletin* 2005;28(11):2046-2053.

**167.** Lawrance I.C., Fiocchi C., Chakravarti S.. **Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes.** Human Molecular Genetics 2001;10, No5:445-456.

**168.** Heller R.A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D.E., Davis R.W. **Discovery and analysis of inflammatory bowel disease-related genes using cDNA microarrays.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997;94:2150-2155.

**169.** Uthoff S. M., Eichenberger M. R., Lewis R. K., Fox M. P., Hamilton C. J., McAuliffe T. L., Grimes H. L., Galandiuk S. **Identification of candidate genes in ulcerative colitis and**

**Crohn's disease using cDNA array technology.** International journal of oncology 2001;19(4):803-810.

**170.** Watanabe T., Kobunai T., Toda E., Kanazawa T., Kazama Y., Tanaka J., Tanaka T., Yamamoto Y., Hata K., Kojima T., Yokoyama T., Konishi T., Okayama Y., Sugimoto Y., Oka T., Sasaki S., Ajioka Y., Muto T., Nagawa H. **Gene expression signature and the prediction of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray.** Clinical Cancer Research 2007;13(2):415420.