

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y

Salud Pública.



**Implicación del receptor de glucocorticoides
NR3C1 del epitelio intestinal en la respuesta a
esteroides, la esteroidogénesis y la neoplasia.**

Tesis doctoral para aspirar al grado de doctor presentada por

María Arredondo Amador

Bajo la dirección de los Doctores

Fermín Sánchez de Medina López-Huertas

Olga Martínez Augustin

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Arredondo Amador
ISBN: 978-84-1306-380-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58247>

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	¡Error! Marcador no definido.
SUMMARY	14
1 Introduction.	16
2 Material and methods.	18
3 Aims.	18
4 Results and discussion.	18
5 Conclusions.	20
INTRODUCCIÓN	23
1 Glucocorticoides.	25
1.1 Historia.....	25
1.2 Síntesis y liberación de los corticoides endógenos.	26
1.3 Regulación del eje HPA.	28
1.4 Disponibilidad de GC en los tejidos: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	29
1.5 Transporte plasmático de GC: La globulina de unión a corticosteroides. ...	29
1.6 Metabolismo y excreción	30
1.7 Acciones fisiológicas de los glucocorticoides	30
1.8 Síntesis extra-adrenal de glucocorticoides	31
1.8.1 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico	32
1.8.2 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal	33
1.8.3 Síntesis intestinal de otros esteroides.	35
2 El receptor nuclear de Glucocorticoides NR3C1.	35
2.1 Receptores de glucocorticoides.....	35
2.2 Estructura del GR.....	36
2.3 Interacción GC-GR.....	37
2.4 Efectos sobre la transcripción.....	38
2.5 Modelos animales con alteraciones en GR.....	40
3 Enfermedad inflamatoria intestinal.	42
3.1 Generalidades.....	42
3.2 Etiología.....	45
3.2.1 Factores genéticos.	45
3.2.2 Factores ambientales.	47
3.3 Inmunología de la EII.....	50
3.3.1 Homeostasis inmunológica en el intestino sano.	50
3.3.2 Disfunción del SI intestinal.	58

3.4	Glucocorticoides en el tratamiento de la EII.....	63
3.5	Modelos experimentales de inducción de EII.....	64
4	Cáncer colorrectal.....	66
4.1	Generalidades y tipos.....	66
4.2	Factores de riesgo.....	66
4.3	Alteraciones genéticas en el inicio del CRC y CAC.....	67
4.3.1	CRC esporádico.....	67
4.3.2	CAC.....	68
4.4	Influencia de la inflamación en el CAC.....	70
4.5	Promoción y progresión del CAC.....	73
4.6	Inmunidad y rutas proinflamatorias en el CAC.....	74
4.6.1	TNF y NF- κ B.....	74
4.6.2	IL6 y STAT3.....	75
4.6.3	Ciclooxigenasa 2.....	75
4.6.4	Linfocitos T.....	76
4.6.5	Microbiota.....	77
4.6.6	Esteroidogénesis intestinal en el cáncer colorrectal.....	77
4.7	Glucocorticoides en el tratamiento del cáncer.....	78
4.8	Modelo experimental de CAC: Azoximetano/DSS.....	79
5	Glucocorticoides y el entorno intestinal.....	79
5.1	Efectos sobre la función de barrera epitelial.....	80
5.2	Efectos sobre el flujo hidroelectrolítico intestinal.....	80
5.3	Efectos sobre la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y otras macromoléculas.....	81
5.4	Microbiota, estrés y glucocorticoides.....	82
5.5	Glucocorticoides en la inmunología intestinal.....	83
5.5.1	Efectos de los GC sobre células epiteliales.....	83
5.5.2	Efectos sobre las células endoteliales.....	84
5.5.3	Efectos de los GC sobre células presentadoras de antígenos.....	85
5.5.4	Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares.....	86
5.5.5	Efectos sobre las células T.....	86
6	Divergencias en la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides en función del sexo.....	87
	OBJETIVOS.....	89
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
1	Reactivos.....	95
2	Animales de experimentación y modelos animales.....	95

2.1	Genotipado de los ratones NR3C1 ^{ΔIEC}	96
2.1.1	Inducción de la delección del gen Nr3c1 en el epitelio intestinal.....	97
2.2	Diseños experimentales de los experimentos realizados.....	97
2.2.1	Diseño experimental de la caracterización en profundidad del fenotipo de los ratones NR3C1 ^{ΔIEC} en estado basal.	97
2.2.2	Diseño experimental del estudio del efecto de la delección de Nr3c1 en el epitelio intestinal a largo plazo.....	98
2.2.3	Diseño experimental para la caracterización del efecto de la delección de Nr3c1 sobre la supervivencia de ratones.....	98
2.2.4	Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de Nr3c1 en la respuesta a glucocorticoides durante la colitis experimental.	99
2.2.5	Diseño experimental en el estudio del efecto la delección de Nr3c1 en la evolución de la colitis experimental.	99
2.2.6	Diseño experimental en el estudio de la esteroidogénesis local en ratones adrenalectomizados.	100
2.2.7	Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de Nr3c1 en la inducción del cáncer colorrectal asociado a colitis.....	102
2.3	Evaluación patológica de los modelos <i>in vivo</i>	102
2.3.1	Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo de colitis experimental inducida por DSS.....	102
2.3.2	Evaluación macroscópica del daño intestinal.....	103
2.4	Obtención del plasma.....	103
2.5	Obtención de explantes: cultivos <i>ex vivo</i>	104
2.6	Aislamiento de células intestinales epiteliales, linfocitos epiteliales y lámina propia.	104
2.7	Obtención de organoides de yeyuno de ratón: estudios <i>in vitro</i> :.....	104
3	Técnicas generales.	106
3.1	Citometría de flujo.....	106
3.1.1	Citometría de flujo en FACSCalibur™.....	106
3.1.2	Citometría de flujo en FACS Aria™ III.....	107
3.2	Microscopía.....	107
3.2.1	Estudio histológico.	107
3.2.2	Inmunohistoquímica.	108
3.2.3	Inmunofluorescencia.	108
3.3	Estudio de la permeabilidad intestinal.....	109
3.3.1	Estudio de la permeabilidad intestinal a ovoalbúmina.	109

3.3.2	Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal <i>ex vivo</i> .	109
3.4	Determinación de haptoglobina plasmática.	110
3.5	Determinación de corticosterona.	110
3.6	Determinación de la producción de citoquinas por análisis Multiplex®. ...	110
3.7	Estudio de la expresión proteica mediante <i>Western blot</i>	110
3.7.1	Extracción y cuantificación de proteínas para análisis por <i>Western blot</i> .	110
3.7.2	<i>Western blot</i>	111
3.8	Estudio de la expresión génica.	111
3.8.1	Extracción de RNA.	111
3.8.2	Reacción de retrotranscripción.	112
3.8.3	Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).	112
3.8.4	RNAseq.	112
4	Análisis estadístico.	113
	RESULTADOS.	115
1	Resultados previos.	119
1.1	Antecedentes y generación de ratones NR3C1 ^{ΔIEC}	119
1.2	Caracterización del fenotipo NR3C1 ^{ΔIEC}	119
1.3	Papel del GR en la colitis inducida por DSS.	123
2	Caracterización en profundidad del fenotipo de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en estado basal.	126
2.1	Análisis transcriptómico (RNAseq) de muestras enriquecidas en IECs colónicas.	126
2.2	Análisis de los linfocitos intraepiteliales y <i>lamina propria</i>	131
2.3	Estudio de la función barrera en ratones NR3C1 ^{ΔIEC}	136
2.4	Estudio del efecto de la delección de <i>Nr3c1</i> del epitelio intestinal a largo plazo.	139
3	Profundización en la implicación del receptor de glucocorticoides NR3C1 del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS y la respuesta a glucocorticoides.	143
3.1	Papel perjudicial de NR3C1 del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS.	143
3.2	Papel de NR3C1 del epitelio intestinal en la respuesta a glucocorticoides durante la colitis experimental inducida por DSS.	144

3.2.1 Evolución del estado general de ratones NR3C1 ^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.	144
3.2.2 Estudio de parámetros inflamatorios en colon de ratones NR3C1 ^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.	146
3.2.3 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial en colon de ratones NR3C1 ^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.	148
3.2.4 Parámetros relacionados con el receptor de glucocorticoides y el sexo.	149
4 Implicación del receptor de glucocorticoides del epitelio intestinal en la esteroidogénesis local y sistémica.	152
4.1 Estudio de la esteroidogénesis local y sistémica durante la evolución de la colitis.	152
4.2 Estudio de la esteroidogénesis local en ratones adrenalectomizados.	156
5 NR3C1^{ΔIEC} <i>in vitro</i>: Organoides	161
5.1 Respuesta inflamatoria en organoides NR3C1 ^{ΔIEC}	161
5.2 Esteroidogénesis en organoides NR3C1 ^{ΔIEC}	163
6 Implicación del receptor de glucocorticoides del epitelio intestinal en el cáncer colorrectal asociado a colitis.	166
6.1 Evolución del estado general de ratones NR3C1 ^{ΔIEC} en el cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS.	166
6.2 Aspecto macroscópico y microscópico.	168
6.3 Parámetros relacionados con la EMT.	171
6.4 Vías de señalización implicadas en la tumorigénesis.	173
6.5 Parámetros relacionados con el ciclo celular y la proliferación	176
6.6 Parámetros relacionados con la inflamación.	178
6.7 Parámetros relacionados con la angiogénesis y la destrucción de la matriz extracelular.	179
6.8 Inmunidad.	181
6.9 Parámetros relacionados con la esteroidogénesis en el CAC.	182
DISCUSIÓN	185
CONCLUSIONES.....	207
CONCLUSIONS	211
ANEXOS.....	215
BIBLIOGRAFÍA.....	221

SUMMARY

1 Introduction.

Glucocorticoids (GC) are molecules with pleiotropic effects, which are attained by way of a fairly complex mechanism of action that basically depends on the interaction with its primary biological target, the cytoplasmic glucocorticoid receptor (GR). The mechanism of action of GC can be divided into three different aspects: the GR activity as a transcription factor, activating (transactivation) or reducing (repression) the expression of different genes, and the interaction of the GR with other transcription factors, resulting in modulation of their transcriptional activity by tethering (transrepression). The vast immunomodulatory effects of GC are the basis of their effectiveness in the treatment of the inflammatory bowel disease (IBD). These are thought to arise mainly from transrepression and classical repression, while the majority of the side effects are related with the transactivation.

IBD is a chronic relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that encompasses two idiopathic and major inflammatory diseases: Crohn's disease and ulcerative colitis. Both forms of IBD significantly impair quality of life, and require prolonged medical and/or surgical interventions. What makes it particularly challenging is its still unknown cause, its unpredictable presentations and symptoms, the less than optimal treatments, and a rise in its incidence and prevalence in many areas of the world. One of the main complications of IBD is the development of colitis-associated colorectal cancer (CAC). The successive periods of inflammation and intestinal regeneration to which the intestine is exposed promotes a hyperproliferative state of the epithelium, generate free radicals that are able to damage DNA and favor the appearance of dysplasias, first step of carcinoma.

Nowadays, there is a wide variety of synthetic GC available for clinical use by virtue of their anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Among those receiving more attention by clinicians involved in the treatment of IBD are prednisolone and methylprednisolone, administered systemically (intravenous for instance), and oral budesonide, which pursues a local effect taking advantage of its significant first pass metabolism.

The use of GC in the treatment of IBD has some significant limitations. At present, only around 40% of the patients respond normally to these drugs, while the remainder do not respond at all or respond at the beginning of the treatment but become dependent when they reach the remission state. Besides, now it is fully accepted that GC administration does not offer any benefit when administered trying to prolong the remission state.

The experimental evidence currently available on the application of synthetic GC in different models of colitis has been gathered after their empirical use in humans. Our laboratory has recently described that budesonide exerts both deleterious and protective effects in experimental colitis induced by DSS in mice. On one side, budesonide increased body weight loss, bacterial translocation, sepsis, and bleeding, with increased mortality. On the other side, inflammatory parameters such as MPO or IL6 were lower compared to the non-treated group.

Furthermore, the intestinal epithelium is able to synthesize GC independently of adrenal glands. These GC act in an autocrine or paracrine manner, being essential in the intestinal homeostasis and regulating multiple processes, principally inflammatory responses and proliferation.

GR knockout mice are not fully viable, mainly because of a failure in pulmonary maturation which leads to premature death of the mice. Several tissue specific KO mice have been generated in the last few years. Skin (a tissue relatively similar to the intestinal epithelia) GR KO mice showed altered development and a basal inflammatory status that increased the susceptibility to detergent agents. Intestinal GR KO mice have been previously generated but only studied for its impact on glucose absorption and gastroparesis.

Mice carrying a conditional deletion of the intestinal epithelial GR (NR3C1^{ΔIEC}) were generated using the Cre/loxP technology to evaluate if the harmful effects of BD was due to its action on the epithelial receptor. The colon of these mice exhibited an inflammatory status, as evidenced by an increase of S100A9 and p-STAT3 expression in colonic tissue, with systemic consequences (high plasmatic levels of TNF and IL6). This inflammation was transitory, as it was present 7 days postdeletion but largely reduced after 14 days.

Regarding the response of NR3C1^{ΔIEC} mice to experimental colitis by dextran sodium sulfate (DSS), they were protected, although in early stages of the illness they showed more rectal bleeding and increased expression of inflammatory parameters (S100A9 and p-STAT3).

This Doctoral Thesis will try to elucidate the causes of the colonic inflammation in NR3C1^{ΔIEC} in basal conditions and the involvement of intestinal epithelial GR on high-dose BD treatment, on intestinal steroidogenesis and on the development of colitis-associated colorectal cancer (CAC).

2 Material and methods.

To carry out the objectives of the present Thesis, we used a wide variety of techniques, including tissue culture techniques, intestinal organoid obtention and culture, real time PCR, histology techniques, flow cytometry, ion transport in Ussing chambers, Western blot, ELISA, RNAseq as well as DSS induced colitis, adrenalectomy and AOM/DSS induced CAC.

Inducible tissue-specific knockout mice of the GR in the intestinal epithelia (NR3C1^{ΔIEC}) were generated by using Cre-loxp technology in a C57 background by the administration of tamoxifen for 5 days. Mice GR^{loxP/loxP} lacking the Cre gene were used as wild-type controls (WT).

In vitro studies were done in organoids coming from jejunum of NR3C1^{ΔIEC} and WT.

3 Aims.

On the basis of the scientific background presented in the Introduction and our own previous results, our aims in the present Doctoral Thesis are:

1. To elucidate the causes and consequences of the transitory colonic inflammation due to the lack of intestinal epithelial NR3C1 in basal conditions.
2. To characterize in depth the dual role of intestinal epithelial NR3C1 in the experimental colitis induced by DSS.
3. To characterize the influence of the intestinal epithelial receptor NR3C1 in the regulation of systemic and local intestinal steroidogenesis, as well as the secondary modulation of the inflammatory response.
4. To study the role of the intestinal epithelial NR3C1 receptor in the development of colitis-associated colorectal cancer.

4 Results and discussion.

Our results can be split into four sections.

Causes and consequences of intestinal epithelial NR3C1 deletion in mice

To elucidate the origin of the colonic inflammation due to the lack of intestinal epithelial GR, WT and NR3C1^{ΔIEC} mice were sacrificed 7 days after the first tamoxifen injection. The RNAseq analysis of colonic epithelial cells revealed that the intestinal epithelium GR is implicated in several biologic processes, mainly related with immune response, inflammation and defense. In addition, intraepithelial

lymphocytes (IELs) and *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs) were analyzed by flow cytometry. A slight increase in TCR $\gamma\delta$ ⁺ lymphocytes was noted in the absence of intestinal GR. Moreover, the intestinal barrier function was evaluated and an increased transmural FITC-dextran flux was detected in the colon of NR3C1^{ΔIEC} mice *in vitro* in Ussing chambers, as well as a reduction of the presence of ZO-1 at surface intestinal epithelium by immunofluorescence. Together, these results show that GR is basally activated and essential to maintain intestinal homeostasis. Colonic inflammation seems to be caused by a leaky gut and an increase in the proinflammatory signaling due to intestinal epithelial GR loss.

Finally, the consequences of GR deletion were evaluated at long-term (8 weeks) and were found to be almost completely nonexistent, confirming the transitory nature of the colonic inflammation.

Implications of intestinal epithelial NR3C1 expression in experimental colitis and high-dose of BD treatment.

Intestinal epithelial GR has a deleterious role in DSS experimental colitis since his absence provokes an improvement in the general state of mice (at 7 days), as well as a great reduction in mortality in prolonged expositions to DSS 2.5% (w:v) (21 days).

Since the epithelial GR is involved in the deleterious response to therapeutic doses of budesonide, an experiment was carried out with a suprathreshold dose in order to assess whether the benefit of the GC can be increased in the absence of the epithelial receptor. It was found that mice were protected against death although not against weight loss; this effect was restricted to female mice, which were the most affected overall on the other hand. Thus female WT mice show an upregulated expression of proinflammatory markers such as *S100a8*, *S100a9*, *Tnf* or *Il6*, and a higher phosphorylation of STAT3. The reason for this sex-dependent effect is unclear at present, but it may be related to the fact that male mice appear to possess a more efficient intestinal steroidogenesis and a higher glucocorticoid-dependent antiinflammatory signaling (male WT overexpress *Tsc22d3* and *Nr5a2* compared to female WT mice). The loss of intestinal GR in females may be protective via increased epithelial steroidogenesis as a result of the loss of the negative feedback influence of the receptor, or simply because of the underlying inflammation is greater.

In vitro stimulation of intestinal organoids from WT and NR3C1^{ΔIEC} mice with TNF+FBS and LPS unveiled the potent inhibition of chemokine expression (*Cxcl1*

and *Ccl2*) performed by GR, consistent with increased proinflammatory signaling *in vivo*.

Implication of epithelial NR3C1 in intestinal steroidogenesis.

The intestinal epithelial GR seems to exert a negative feedback regulation on intestinal steroidogenesis, as mice lacking the receptor have increased production of corticosterone and augmented intestinal epithelial *Cyp11a1* expression (rate limiting enzyme of the process) under an inflammatory challenge such as experimental colitis. On the other hand, *in vitro* studies using intestinal organoids revealed higher levels of corticosterone on the NR3C1^{ΔIEC} supernatant.

Experiments in adrenalectomized mice evidenced that intestinal corticosterone levels are not significantly affected (while they are reduced by 40% in the skin). Conversely, plasma corticosterone levels are unchanged in knockout mice, indicating that intestinal steroidogenesis is not able to partially supply the production from adrenal glands, even in the absence of GR.

Role of intestinal epithelial NR3C1 in the development of colitis associated colorectal cancer.

Previous studies of our group, as well as the RNAseq analysis and the experiments using organoids, revealed an increased proliferative state of the intestinal epithelium of NR3C1^{ΔIEC} compared to WT mice. CAC was induced to both genotypes using the AOM/DSS model. NR3C1^{ΔIEC} mice showed a larger number of tumors than WT mice. However, they were less invasive than those carried by controls. In addition, NR3C1^{ΔIEC} mice expressed increased levels of promoters and mediators of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) or growth factors like *Snai1*, *Snai2*, *Lgr5*, *Egfr*, *Tgfb1* or *Myc*. These results demonstrate a moderate antitumoral action of GR.

5 Conclusions.

1. The intestinal epithelial glucocorticoid receptor is basally activated in the mouse colon *in vivo*. Its loss provokes transitory colonic inflammation, presumably due to alterations in the intestinal permeability and/or a higher proinflammatory signaling by the epithelium and infiltrated TCR $\gamma\delta$ ⁺ lymphocytes, where the intestinal microbiote seems to play an essential role, as this response is not present in the small intestine.

2. The intestinal epithelial glucocorticoid receptor has a dual role in DSS-induced experimental colitis. Initially, it exerts a deleterious effect, as its absence worsens animal status in the early phase of exposure to DSS. However, as the inflammatory response is established, the deletion of the receptor is clearly protective, to the point of preventing 48% of animal deaths in a chronic colitis protocol.
3. Budesonide treatment of experimental colitis induced by DSS at supratherapeutic doses is strengthened by the absence of the intestinal epithelial glucocorticoid receptor. This effect is observed only in female mice. The mechanism may be related to a specific interaction of the receptor, or simply to the fact that inflammation is more pronounced in females. These results suggest that the clinical response of intestinal inflammation to glucocorticoids could be improved in the absence of epithelial actions.
4. The intestinal epithelial NR3C1 collaborates in the regulation of *the novo* corticosterone synthesis, possibly through a negative feedback. The resulting increased intestinal corticosterone synthesis is correlated to the protection against colitis, and therefore could be mechanistically involved.
5. In mice, intestinal steroidogenesis is sufficient to the maintenance of the local levels of corticosterone, while in the skin a partial dependence is observed.
6. The deletion of intestinal epithelial NR3C1 increases cellular proliferation and causes a higher tumor load in the AOM/DSS induced experimental colitis-associated colorectal cancer model, although these tumors are less invasive.

INTRODUCCIÓN

1 Glucocorticoides.

1.1 Historia.

En el año 1855 Thomas Addison describió la observación clínica de un síndrome con los síntomas de pigmentación intensa de la piel, debilidad, pulso débil y malestar general de 11 pacientes que carecían de glándulas adrenales y que al final morían [1].

No se conocía la sustancia activa responsable de esta enfermedad. Tratamientos con extractos acuosos de glándulas adrenales sólo conseguían aumentar la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca de estos pacientes. Hoy sabemos que se debe a que era epinefrina lo que se estaba extrayendo, cuya fuente de producción es la médula adrenal. Años después, se comprobó que extractos con disolventes orgánicos tenían efectos beneficiosos en animales adrenalectomizados. Posteriormente, se evidenció que el extracto era una mezcla de esteroides, de naturaleza lipofílica procedentes de la corteza suprarrenal.

En 1935, Kendall y Reichstein aislaron y determinaron de forma independiente la estructura de lo que hoy conocemos como cortisona . Aunque en un principio no suscitó interés por parte de la industria farmacéutica debido a que parecía sólo ser útil al reducido número de enfermos de Addison, la situación cambió con la II Guerra Mundial, dándose incluso mayor prioridad estratégica a la síntesis química de cortisona que a la penicilina [2]. No fue hasta 1947 cuando Sarett consiguió sintetizarla, abriéndose así la puerta a su uso terapéutico[3].

En 1948, cristales de cortisona fueron administrados a un enfermo de Addison con resultados muy esperanzadores [4]. En 1949, el Dr Hench administró cortisona a una paciente con artritis reumatoide. Hench había ya observado que pacientes de esta enfermedad embarazadas o con ictericia veían reducidos sus síntomas. La mejora de ésta y otros pacientes fue sorprendente. La cortisona dejaba de tener un papel simplemente hormonal y adquiría el carácter de fármaco. Posteriormente se administró a pacientes de otras enfermedades de carácter inflamatorio con el mismo resultado, descubriéndose también los efectos secundarios de estas drogas.

En 1950, Kendall, Reichstein y Hench recibieron el Nobel de Fisiología y Medicina por el descubrimiento de la cortisona y su empleo en la artritis reumatoide [5].

Hoy en día, los esteroides que contrarrestan la inflamación y tienen importante función en el control del metabolismo de la glucosa se conocen como

Glucocorticoides (GC), mientras que los que provocan la retención de sodio y fluidos son los llamados mineralocorticoides (MC) [6]. El principal GC endógeno en humanos es el cortisol y en roedores la corticosterona.

1.2 Síntesis y liberación de los corticoides endógenos.

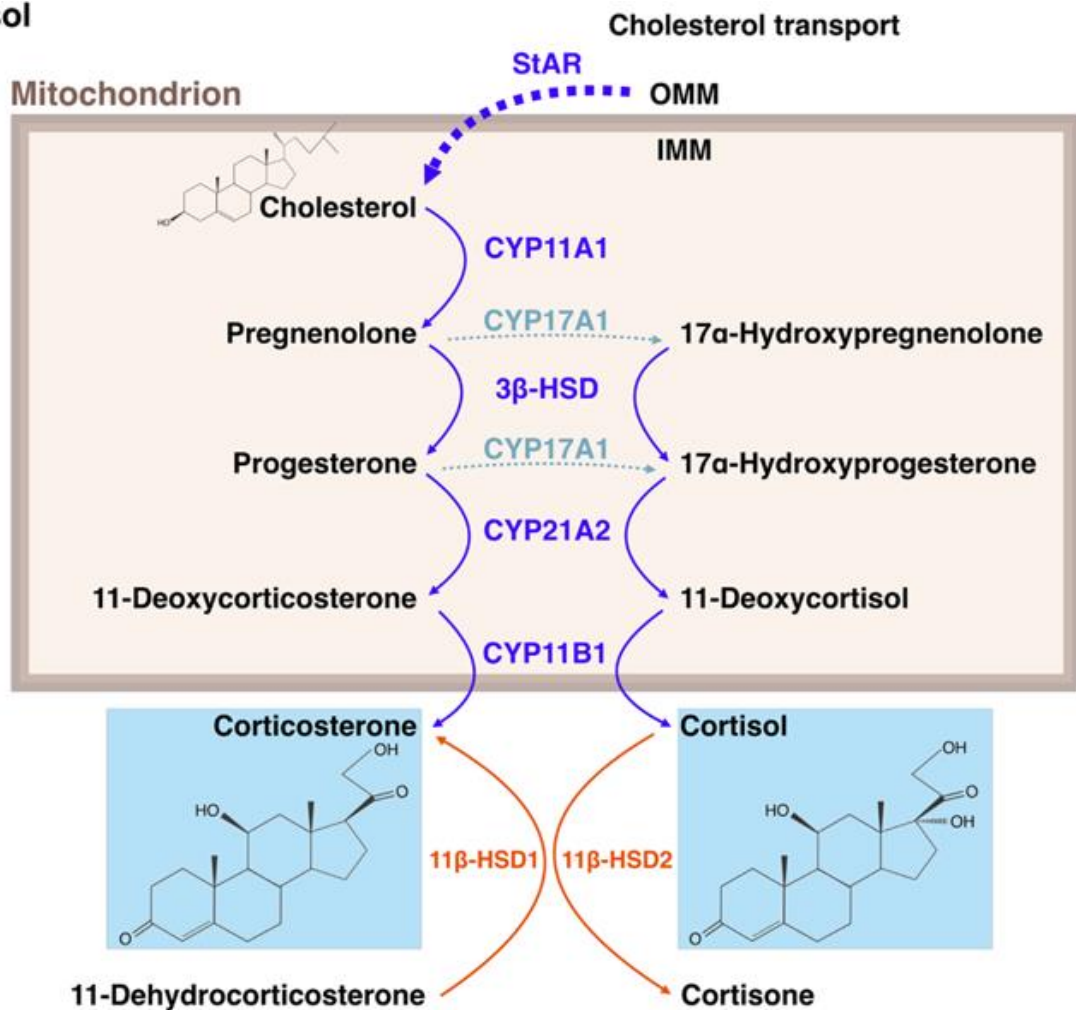
La esteroidogénesis es la síntesis de hormonas esteroideas (GC, MC, andrógenos, estrógenos y progestágenos) a partir de colesterol, la cual tiene lugar en la mitocondria [7]. La síntesis de GC endógenos se realiza principalmente en la zona media o fascicular de la corteza suprarrenal. En condiciones basales (situaciones libres de estrés), la producción y liberación de GC sigue un ritmo circadiano, es decir, hay un pico de GC en sangre antes del periodo activo del día y gradualmente los niveles de hormona van descendiendo hasta llegar al periodo inactivo, que en humanos coincide con la noche. Además, existe también un ritmo ultradiano subyacente, que se traduce en liberaciones pulsátiles de GC por los adrenes. Esto se debe a los mecanismos de estimulación e inhibición del eje neuroendocrino de respuesta a estrés hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), regulador de la producción sistémica de GC y, en menor medida, MC [8].

En el núcleo paraventricular del hipotálamo se produce la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual llega a la hipófisis a través del sistema portahipofisario. Allí se une a su receptor CRHR1, lo que desencadena una cascada de transducción de señal induciendo la síntesis y posterior secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por las células corticotropas de la adenohipófisis hacia la circulación sistémica [10]. En ciertas situaciones se co-secreta arginina vasopresina (AVP), que actúa como coadyuvante de la CRH operando sobre receptores V1bR [Antoni, 1993 #3026][9].

La corteza suprarrenal presenta receptores para la ACTH, llamados receptores de melanocortina tipo 2 (MC2R). La ACTH estimula la síntesis de GC *de novo* a partir del colesterol y su posterior liberación, ya que los esteroides no son almacenados. Para ello, el colesterol debe ser movilizado y transferido dentro de la mitocondria, proceso regulado por la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR, *Steroidogenic acute regulatory protein*). Ya en la mitocondria, el colesterol sufrirá una serie de modificaciones enzimáticas (Esquema 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que culminarán en la síntesis de cortisol en humanos y corticosterona en roedores. El CYP11A1 regula la primera reacción, la cual es también la limitante: la conversión de colesterol en pregnenolona. Esta enzima se encuentra en la membrana interna mitocondrial. Por ello, el papel de transporte de StAR es esencial [10, 11], aunque se sabe que se pueden sintetizar pequeñas

cantidades de esteroides independientemente de StAR mediante un mecanismo desconocido [11]. El papel de StAR en otros tejidos esteroidogénicos es menos claro. La ACTH estimula la síntesis de GC a través de diversos factores de transcripción, especialmente el factor esteroidogénico 1 (SF-1, *steroidogenic factor 1*) [12], el cual controla la expresión tanto de StAR, como del resto de enzimas esteroidogénicas, especialmente CYP11A1. El papel crucial de SF-1 quedó patente con ratones SF-1^{-/-}, que no sólo no eran capaces de producir GCs, sino que carecen tanto de glándulas adrenales como de gónadas [13]. La ACTH es capaz también de producir

Cytosol



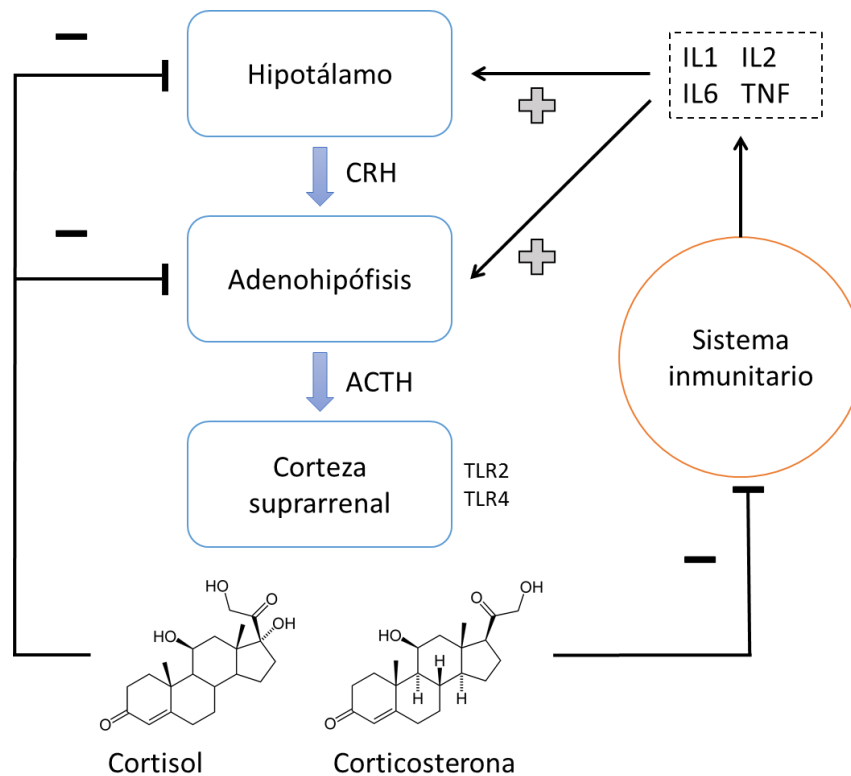
hipertrofia e hiperplasia de los adrenes.

Esquema 1. Esteroidogénesis en ratón (izquierda) y en humano (derecha)[12]. Membrana mitocondrial externa (OMM), Membrana mitocondrial interna (IMM), Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), esteroide 21- hidroxilasa (CYP21A2), 11β-hidroxolasa (CYP11B1), esteroide 17α-hidroxilasa (CYP17A1), 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 y 2 (11β-HSD1 y 11β-HSD2).

El ritmo circadiano que sigue la liberación de GC está controlado por el reloj biológico, el cual está dirigido centralmente por el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo. Éste, además de controlar la liberación de CRH y AVP por las motoneuronas neuroendocrinas del hipotálamo, influye también la sensibilidad de la corteza suprarrenal a la ACTH a través del Sistema Nervioso Autónomo [14]. Sorprendentemente, el pronunciado ritmo circadiano en los niveles plasmáticos de cortisol o corticosterona no se correlaciona con ritmos claros en la liberación de CRH, AVP o ACTH. Al parecer, el control circadiano de la producción de GC por los adrenes está controlado principalmente vía sistema nervioso autónomo, mientras que en situaciones de estrés, es el eje HPA el que dicta la producción de estos esteroides [14].

1.3 Regulación del eje HPA.

Los mecanismos de regulación del eje HPA antes descritos constan de tres componentes. Una regulación negativa mediada por el efecto de los propios GC sobre el hipotálamo y la hipófisis [15], una regulación positiva por parte de citoquinas de carácter inflamatorio [16], así como de productos bacterianos que señalizan mediante receptor tipo toll (TLR) 2 y TLR4 en la corteza suprarrenal [17, 18], y una influencia positiva directa del estrés [19] que aumenta la liberación de CRH por parte del hipotálamo (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismos de regulación del eje HPA.

La relevancia del diálogo entre el sistema inmunológico y el eje HPA queda experimentalmente patente en humanos [20] y en modelos animales de *shock* séptico, en los cuales la adrenalectomía o la inhibición farmacológica del efecto de los GC implica una mayor susceptibilidad a dicho modelo [21-24]. La activación del eje HPA asociada al estrés psicológico deriva del efecto directo de neurotransmisores de carácter excitador como acetilcolina, serotonina y noradrenalina sobre las neuronas liberadoras de CRH a nivel hipotalámico. Además, en el caso de la noradrenalina se establece una relación de tipo bidireccional de *feedback* positivo, dado que mientras que ella misma activa el eje HPA, la CRH generada en el hipotálamo actúa de modo paracrino activando las sinapsis noradrenérgicas en el sistema nervioso central. Este fenómeno de retroalimentación positiva explica en gran medida la estrecha relación entre el estrés psicológico y el aumento en la esteroidogénesis [25, 26].

1.4 Disponibilidad de GC en los tejidos: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

El eje HPA se considera responsable de la regulación de los niveles circulantes de GC, sin embargo, la disponibilidad del metabolito activo de los GC en los tejidos depende de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas 1 y 2 (11 β -HSD1 y 11 β -HSD2) presentes en los distintos tejidos [27-30].

Como se observa en el Esquema 1, estas enzimas son responsables de la conversión reversible de cortisol o corticosterona a un metabolito inactivo desde el punto de vista biológico. De este modo, la enzima 11 β -HSD1 actúa en algunos tejidos como un amplificador de la señal de exposición a cortisol, convirtiendo la cortisona (o en ratón 11 β -dehidrocorticosterona) en cortisol (o corticosterona en ratón) como se ve en el Esquema 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Tanto es así, que una actividad irregular de esta enzima se ha visto implicada en enfermedades metabólicas e inflamatorias y su inhibidor selectivo se ha probado con éxito como tratamiento de la diabetes tipo 2 [31]

De manera inversa, la 11 β -HSD2 protege a los tejidos ante una exposición excesiva de GC al catalizar el paso de cortisol o corticosterona a su forma inactiva [31-34]. La deficiencia en esta enzima causa hipertensión secundaria debido a un exceso de activación del receptor de mineralocorticoides (MR) por el cortisol.

1.5 Transporte plasmático de GC: La globulina de unión a corticosteroides.

Debido al carácter lipófilo de los GC, para ser transportados en plasma necesitan estar unidos a la globulina de unión a corticosteroides (CBG, *Corticosteroid Binding Globulin*). La CBG es una glucoproteína monomérica de 55 KDa de la superfamilia

de las inhibidoras de las serín proteasas (serpinas) que actúa como proteína transportadora en plasma para los GC y en menor medida para los MC. Los tejidos que actúan como fuentes productoras de esta proteína son fundamentalmente el hígado y en menor medida los riñones, pulmones y testículos [35]. En condiciones normales, alrededor del 90% de los GC endógenos se encuentran unidos a la CBG. Cuando se administra una dosis elevada de GC exógeno, la capacidad de transporte se ve superada y aumenta la fracción de GC libre en plasma. De esta forma, la CBG actúa como un reservorio de corticosteroides en sangre [36].

Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de la CBG en la regulación de la llegada y liberación local de GC en los tejidos diana. La elastasa secretada por los neutrófilos infiltrados en los focos inflamatorios modifica por proteólisis a la CBG, liberando GC en el foco inflamatorio [35, 37]. Por otro lado, existen receptores de superficie para el complejo GC-CBG que deben participar en la captación hacia el interior celular y/o la señalización por una cascada de transducción apropiada de los GC en dichas células diana [38, 39].

1.6 Metabolismo y excreción

La metabolización de los GC se basa en la adición secuencial de átomos de oxígeno e hidrógeno y la posterior conjugación del compuesto obtenido con un grupo sulfato o glucurónido con el objetivo de aumentar la solubilidad y reducir la actividad biológica. El proceso bioquímico que conlleva la reducción del doble enlace en la posición 4,5 se puede dar en hígado o en localizaciones extrahepáticas. Sin embargo, la sustitución del grupo cetónico del carbono 3 y la conjugación se producen exclusivamente en el hígado. Una vez generado el compuesto soluble final, este es eliminado mediante excreción renal, sin que exista ningún tipo de reabsorción, a diferencia de la forma libre que es reabsorbida en un 80-90%.

1.7 Acciones fisiológicas de los glucocorticoides

Los efectos de los GC son muchos y pleiotrópicos. Sus acciones más relevantes son en el metabolismo glucídico, proteico y lipídico, en los sistemas cardiovascular, reproductor, en el músculo y en el remodelado óseo. Los GC, aunque en menor medida respecto a los MC, también afectan al balance hidroelectrolítico y son muy importantes en el desarrollo embrionario. A modo de resumen se muestran los efectos fisiológicos más importantes en la tabla 1.

Tabla 1. Acciones fisiológicas más relevantes de los glucocorticoides.

Efectos sobre el metabolismo glucídico	
Aumento de la gluconeogénesis y del almacenamiento de glucógeno.	[40]
Menor secreción de insulina. Hiperplasia de células β pancreáticas.	[41]
Efectos sobre el metabolismo lipídico	
Incremento de la lipólisis	[42, 43]
Redistribución de la grasa hacia cuello, cara y abdomen	
Efectos sobre el sistema cardiovascular	
Hipertensión por aumento de volemia y sensibilización a agentes vasoconstrictores.	[44, 45].
Riesgo de aterosclerosis, eventos de tipo anginoso, insuficiencia cardíaca	[46]
Hipertrofia muscular cardíaca	[47]
Efectos sobre el músculo estriado	
Efecto catabólico muscular	[48-50]
Inhibición de los procesos de regeneración muscular	[48, 51]
Osteoporosis	[52, 53]
Efectos sobre el sistema reproductor	
Inhibición de la síntesis de testosterona, estrógenos y progesterona.	[54]
Regulación de respuesta a hormona luteinizante (LH)	[54]
Efectos sobre el desarrollo embrionario	
Maduración tisular, sobre todo pulmonar	[55-57]
Maduración de la epidermis	[58]

1.8 Síntesis extra-adrenal de glucocorticoides

La ausencia de GC (al menos de aquellos que pueden medirse en sangre) en el suero de los animales sometidos a adrenalectomía sugiere que la fuente única de GC es la corteza suprarrenal. No obstante, distintas líneas de investigación han puesto de manifiesto que otros tejidos cuentan con la maquinaria necesaria para la esteroidogénesis. De forma general, estos GC ejercen efectos inmunomoduladores mediante una señalización local de tipo paracrino o autocrino, a diferencia de los GC de origen suprarrenal que actúan en lugares distantes siguiendo el concepto clásico de hormona.

Entre estos tejidos destacan células de naturaleza epitelial presentes en el timo, la piel, y por supuesto intestino, siendo este último el más interesante en nuestro caso.

Las células epiteliales del timo, órgano donde se generan linfocitos T maduros, son capaces de producir GC *de novo*, lo que no ocurre en los timocitos[59]. La principal función de estos GC es estimular la apoptosis de timocitos contribuyendo así a la selección de linfocitos T maduros [60].

El epitelio pulmonar y el sistema cardiovascular son casos peculiares. En el caso del epitelio pulmonar, porque su demostrada capacidad de liberación de corticosterona no parece ser dependiente de síntesis *de novo*, sino de la reactivación local de deshidrocorticosterona a corticosterona mediada por 11 β -HSD1, a pesar de que presentan toda la maquinaria necesaria para la síntesis *de novo* [61] (Esquema 1). En cuanto al sistema cardiovascular, no hay consenso sobre si expresa todas las enzimas esteroidogénicas, concretamente el CYP11B1 y CYP11B2 (cataliza el último paso de la síntesis de aldosterona)[62]. Young et al. demuestran que el CYP11B2 sí lo expresan pacientes con fallo cardíaco [63]. En todo caso, la ausencia de CYP11B1 inhabilita al sistema cardiovascular para la síntesis autónoma de GC. Por último, el caso del cerebro es quizá el de más compleja interpretación, pues diferentes estudios realizados en rata, ratón y humano muestran diferentes perfiles de expresión de las enzimas encargadas de la esteroidogénesis *de novo*. Parece ser que la síntesis de GCs en el cerebro puede diferir de la que tiene lugar en los adrenes, pues, aunque en el caso de la rata y el humano hay niveles muy bajos o no detectables del gen que codifica a CYP21, sí que expresan otra enzima que presenta la misma actividad 21-hidroxilasa[60, 62].

1.8.1 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio epidérmico

En la actualidad, está demostrado que los queratinocitos y los melanocitos humanos cuentan con toda la maquinaria biosintética necesaria para la esteroidogénesis, desde los transportadores de colesterol [64], hasta las propias enzimas que catalizan la conversión del colesterol en cortisol [65, 66]. Además, estas células expresan CRH y ACTH, así como el receptor para la última, por lo que poseen todos los componentes del eje HPA. De este modo, se puede hablar de la existencia de un eje análogo al HPA que funciona localmente regulando la síntesis y liberación auto-paracrina de cortisol de forma local en la piel [67]. Esta síntesis se ve estimulada por los procesos inflamatorios mediados por la IL1 β y factor de necrosis tumoral (TNF), y por la propia CRH, dado su efecto directo sobre las uniones estrechas, mastocitos y estimulando la producción de ACTH. [68].

La activación de este eje, intenta evitar el desarrollo de procesos inflamatorios descontrolados tras una agresión a la mucosa epidérmica. Sin embargo, a pesar de que los GC son antiinflamatorios, también está demostrado su efecto perjudicial sobre la restitución epitelial, debido a su efecto antiproliferativo. Por tanto, en el epitelio, existen mecanismos que regulan negativamente su producción y efectos. Los dos más relevantes son, por un lado la inhibición de la esteroidogénesis mediante *insulin growth factor 1* (IGF-1), que ve incrementada su expresión cuando se perturba la función de barrera epidérmica y, por el otro, un aumento de la expresión de 11 β -HSD2 que cataliza en el entorno de la propia célula diana la conversión del cortisol en cortisona biológicamente inactiva [68].

1.8.2 Síntesis extra-adrenal de GC en el epitelio intestinal

Alrededor del año 1995 comenzó a ponerse de manifiesto que la mucosa intestinal expresaba enzimas implicadas en la esteroidogénesis [69]. Estos hallazgos hicieron que se contemplase la posibilidad de que la mucosa intestinal tuviera la capacidad de sintetizar GC de forma autónoma.

Dentro de la complejidad que caracteriza al tejido intestinal, en un principio fue difícil estimar cuál era la fuente celular concreta de corticosterona local en ratones. No obstante, el hecho de que en la corteza suprarrenal y en el timo fueran células epiteliales las encargadas de su síntesis y liberación, convirtió a este tipo celular en el primer candidato. De hecho, estudios basados en hibridación *in situ* y estudio de expresión de enzimas esteroidogénicas en poblaciones celulares intestinales confirmaron que la fuente de estos GC eran las células epiteliales intestinales (IEC), concretamente IECs localizadas en la base de las criptas [70-72].

Mediante estudios por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR), se ha demostrado que tanto el intestino delgado como el grueso expresan todas las enzimas que participan en la esteroidogénesis. Aunque dicha expresión es muy baja en condiciones basales, se ve incrementada en procesos inflamatorios que cursan con afectación intestinal. De esta forma, la activación de células T mediante anticuerpos anti-CD3 (clúster de diferenciación 3) o virus [70], así como la activación de macrófagos mediante lipopolisacárido (LPS) [73], incrementa la liberación de corticosterona en tejido colónico. En ambos casos, el mediador inflamatorio para la conexión entre la respuesta inflamatoria celular y la estimulación de la síntesis intestinal de GC es el TNF, en la medida en que ésta desaparece en animales deficientes en dicha citoquina o alguno de sus receptores (TNFR-1 y TNFR-2) [73, 74]. Se ha demostrado que el efecto de TNF es directo sobre

el epitelio intestinal, pues es capaz de aumentar la esteroidogénesis en criptas aisladas [74].

La regulación de la producción local de GC en el intestino es totalmente diferente de la que se producen en la corteza suprarrenal. Mientras que en esta última está dirigida por la expresión de SF-1, en el epitelio intestinal este factor de transcripción no se expresa, pasando a desempeñar su papel otra molécula denominada receptor homólogo hepático 1 (LRH-1, *liver receptor homologue 1*), que cuenta con múltiples similitudes estructurales con la anterior. Ambas se unen a los promotores de los genes codificantes de las enzimas esteroidogénicas, produciendo un aumento de su expresión. Mientras que SF-1 en la corteza adrenal induce una esteroidogénesis de rápida respuesta y cuantitativamente alta, LRH-1 en el epitelio intestinal lo hace de un modo más progresivo y limitado [75-77].

La expresión de LRH-1 en la mucosa intestinal se encuentra restringida a las células inmaduras, indiferenciadas y altamente proliferativas que se sitúan en la base de las criptas, de modo que al ir éstas ascendiendo y diferenciándose van perdiendo la expresión [78]. Cuando se produce una agresión sobre el epitelio intestinal se ve incrementada la expresión de LRH-1 para restituir la función de barrera comprometida. Por un lado, LRH-1 incrementa la expresión de Ciclina D1, E1 y c-MYC [79], que a su vez aumenta la proliferación epitelial. LRH-1 es un importante regulador del ciclo celular y la *stemness*. Por otro lado, estimula la síntesis de GCs intestinales, los cuales controlarán la excesiva estimulación de células inmunes causada por el mayor contacto con productos bacterianos lumbinales, que generaría una incrementada respuesta inflamatoria destructiva y una mayor permeabilidad intestinal [72]. Como ya se ha comentado, la diferenciación epitelial implica la pérdida de la expresión de LRH-1, lo que parece lógico para evitar crecimientos celulares incontrolados que podrían conducir a neoplasias, pero secundariamente limita la esteroidogénesis intestinal a las células epiteliales intestinales indiferenciadas de la base de las criptas.

Estudios con ratones LRH-1 haplodeficientes (LRH-1^{+/-}) demuestran que LRH-1 es requerido para el aumento en la producción de corticosterona y en la expresión de enzimas implicadas en la esteroidogénesis intestinal (CYP11A1 y CYP11B1) dependiente de colitis o de la activación de células T [72]. Sin embargo, la haplodeficiencia de LRH-1 no afecta a la producción intestinal de corticosterona inducida por LPS [73]. Se sabe que la esteroidogénesis intestinal depende de LRH-1 y TNF, pero aún no se tiene clara ni la relación e interacción entre ellos ni el mecanismo por el cual actúan [12]. Cabe la posibilidad que ambos regulen vías

paralelas e independientes que culminan con el incremento en la producción de GC por el epitelio intestinal.

Otro mecanismo diferente de regulación de la esteroidogénesis intestinal y adrenal es la ACTH. Como se ha dicho anteriormente, la ACTH estimula la síntesis de GC por la corteza suprarrenal a través de la inducción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). En el intestino, la ACTH no sólo es incapaz de inducir la síntesis de GC, sino que de hecho la inhibe [75], adquiriendo el TNF el principal papel en la estimulación de la esteroidogénesis intestinal.

Por otro lado, no se tiene claro que StAR tenga un papel fundamental en la esteroidogénesis extraglandular, pues no se aprecian cambios sustanciales en los tejidos si StAR es mutada [11].

1.8.3 Síntesis intestinal de otros esteroides.

El epitelio intestinal expresa también las enzimas 7β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β HSD), así como la aromataasa, enzimas adicionales necesarias para la síntesis de estrógenos y andrógenos. Igualmente, el metabolismo de estas hormonas en el intestino tiene lugar en las criptas. El epitelio intestinal expresa receptor de estrógenos β (ER- β), el cual está implicado en el mantenimiento de la función barrera intestinal y la proliferación epitelial[80]. Ratones que carecen de ER- β presentan un incremento en la proliferación del epitelio colónico, una inhibición de la apoptosis e inhibición de la expresión de marcadores de diferenciación epitelial[81].

2 El receptor nuclear de Glucocorticoides NR3C1.

2.1 Receptores de glucocorticoides.

Los receptores nucleares pertenecen a una familia de proteínas muy conservada que se divide a su vez en 7 subfamilias. El receptor de glucocorticoides (GR) pertenece a la subfamilia de receptores esteroideos, la subfamilia 3, dentro de la cual existen 6 tipos de receptores: dos receptores de estrógenos (ER y ER β), uno para andrógenos (receptor de andrógenos, AR), progestágenos (receptor de progesterona, PR), GR y MR [82].

Los GC tienen afinidad por dos tipos de receptores: GR y MR. Difieren principalmente en dos aspectos. En primer lugar, su afinidad por los GC, siendo la afinidad de cortisol y corticosterona diez veces mayor por el MR. Así pues, éste es

activado a bajas concentraciones de GC, mientras que el GR sólo es estimulado en condiciones de estrés o durante un pico de liberación a lo largo del ciclo circadiano [10]. En segundo lugar, en su distribución. Mientras el GR es ubicuo, el MR se expresa principalmente en riñón y el corazón. También hay diferencias en su expresión a nivel cerebral [10]. En tejidos diana del MR, la enzima 11 β HSD2 inactiva el cortisol o la corticosterona permitiendo la unión de la aldosterona a su receptor, la cual tiene la misma afinidad por el GR que el cortisol [83]. Esta tesis doctoral se centrará en el GR.

2.2 Estructura del GR.

El GR está codificado por el gen *NR3C1*, situado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31.3) y constituido por 10 exones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 α , 9 β), donde el primero no se traduce y mecanismos de *splicing* alternativo a nivel del exón 9, que se generan tanto en humanos como en ratón, dan lugar a dos isoformas principales del GR, α y β , que difieren en el extremo carboxilo terminal. Asimismo, se generan otras como la γ , A y P, que son funcionalmente poco relevantes y sólo se les ha atribuido cierta importancia en algunos casos de insensibilidad a GC [84]. Entre todas estas isoformas, la α es la responsable de los efectos principales de los GC debido a su localización citoplasmática. La isoforma β carece del bolsillo de unión a GC y se encuentra en el núcleo actuando como inhibidor de la isoforma α fundamentalmente, aunque también se ha descrito cierta actividad propia de esta isoforma como por ejemplo regulando la transcripción al unirse a la mifepristona [85]. En cualquier caso, GR α es la isoforma esencial en la farmacodinamia de los GC tanto endógenos como sintéticos, y será a la que nos referiremos de ahora en adelante cuando se use la denominación genérica de GR. Cabe destacar que ésta presenta a su vez ocho isoformas (A, B, C1, C2, C3, D1, D2 y D3) que se generan como consecuencia de la utilización de un punto variable en el inicio de la traducción, siendo todas ellas funcionalmente comparables entre sí, aunque se diferencian en su distribución subcelular [86].

La estructura proteica del GR es de tipo modular y presenta 4 regiones (esquema 3). Partiendo del extremo N-terminal se encuentra el dominio de transactivación (NTD, *N-terminal domain*) que modifica la expresión del gen diana. A continuación reside el dominio de unión a ácido desoxirribonucleico (DNA) (DBD, *DNA binding domain*) que interacciona directamente con el elemento de respuesta a GC (GRE) en la región promotora del gen diana. [87]. Seguido de la región DBD existe una región bisagra (HR, *hinge region*) entre el DBD y el dominio de unión a ligando (LBD, *ligand binding domain*), decisiva para la translocación del GR por un mecanismo

dependiente de importina- α e importina-7 [84, 88]. Finalmente, en el extremo carboxilo terminal está el LBD donde se unen los GC y otros cofactores.



Esquema 3. Estructura del receptor para glucocorticoides GR α . Dominio N-Terminal (NTD), dominio de unión a DNA (DBD), región bisagra (HR), dominio de unión a ligando (LBD), dominio de activación transcripcional dependiente de ligando (AF-1) e independiente de ligando (AF-2)

Además, el GR puede ser modulado también por modificaciones post-traduccionales.

La más importante de ellas es la fosforilación del receptor. Tras la unión a su ligando el GR se hiperfosforila. La fosforilación se puede dar a nivel de 6 residuos de serina: Ser-113, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226 y Ser-404. La fosforilación afecta a la actividad transcripcional del GR de forma diferente dependiendo del gen diana, así pues, deficiencias en la fosforilación parecen estar relacionadas con la resistencia a glucocorticoides. La fosforilación afecta también al reclutamiento de cofactores, a la vida media del receptor y, por tanto, a su nivel de expresión, así como al tráfico celular del GR hacia el núcleo [84].

El GR puede ser también sometido a ubiquitinación y sumoilación, modulando así su degradación, ambos procesos dependientes de la previa fosforilación [84].

2.3 Interacción GC-GR.

Los GC son moléculas de pequeño tamaño y carácter lipófilo que pueden difundir fácilmente a través de la membrana celular, aunque existen también mecanismos de transporte poco relevantes en términos funcionales [89].

En ausencia de ligando, el GR inactivo se encuentra principalmente en el citoplasma como parte de un complejo multiproteico junto a la *heat shock-protein 90* (HSP90), *heat shock protein 70* (HSP70) e *immunophilins* (IP) [90]. Sin embargo, es importante destacar que existe un flujo continuo de GR activo e inactivo hacia el núcleo a través de un complejo de poros nucleares. El equilibrio entre el flujo de entrada y salida determina dónde se encuentra la mayoría de GR inactivo o GR unido a su ligando. Cuando al GR se le une un GC, distintas kinasas fosforilan el GR en diferentes sitios en función de las condiciones, modulando los aspectos descritos en el apartado anterior. Aunque durante años se ha creído que la unión del ligando generaba la liberación del GR del complejo proteico, ahora se sabe que

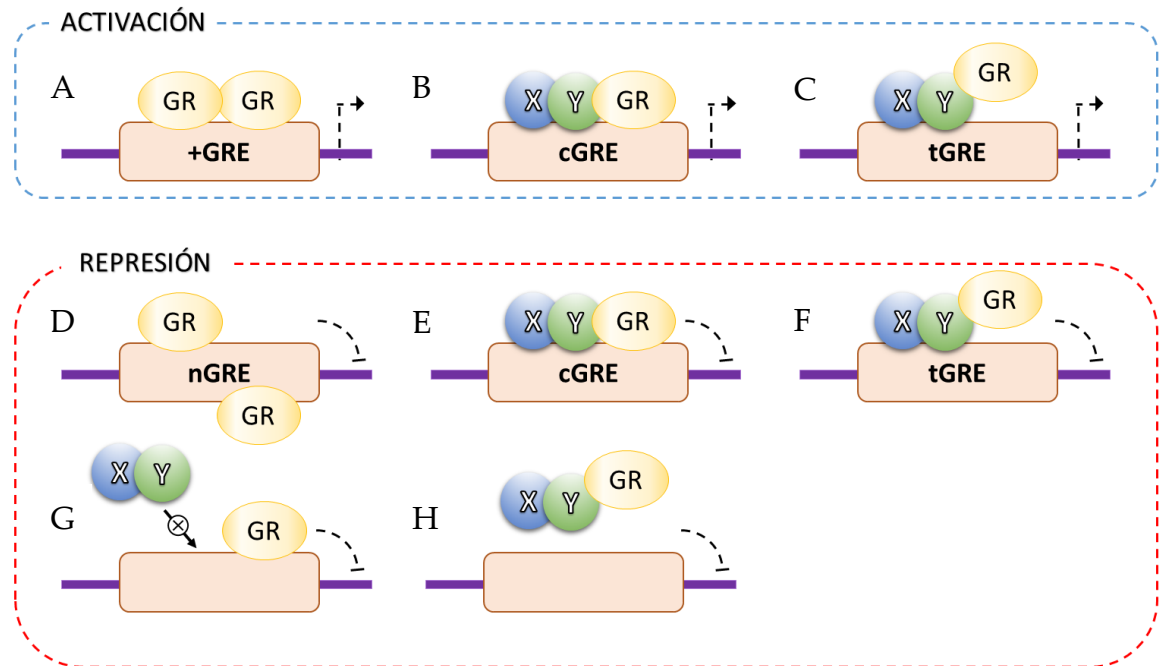
éste es fundamental para el transporte efectivo del receptor-ligando al núcleo. El GR presenta dos señales de localización nuclear NLS1 y NLS2. Tras la unión a GC, la IP FKBP51, que era parte del complejo proteico es sustituida por la FKBP52, lo cual permite que las NLS sean reconocidas por proteínas llamadas importinas, que generan la translocación al núcleo del complejo proteico al completo a través del citoesqueleto [91]. Una vez allí GR-GC es separado del complejo proteico.

El equilibrio en la presencia relativa de GR en núcleo y citoplasma está determinado por la funcionalidad de dichos mecanismos importadores y de la caltericulina y exportina-1 que median el proceso opuesto [92].

2.4 Efectos sobre la transcripción.

Una vez en el núcleo, el GR puede unirse a los denominados elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Hay tres tipos de GRE: simples, compuestos (*composite*) y elementos de atadura (*tethering*). Cada uno de ellos requiere la unión del GR en diferentes conformaciones y orientaciones.

Los GRE simples están presentes en la región reguladora de los genes diana y que se caracterizan por la siguiente secuencia consenso palindrómica (GGTACAnnnTGTTCT) [93]. La unión de dos GR, unidos a sus ligandos, como homodímero es necesaria para que tenga lugar gran parte de la señalización, aunque algunas acciones pueden darse como monómero [94]. Cuando dicha situación conduce a un aumento de la expresión del gen diana, como ocurre con los genes para *glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ), *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) o el propio NR3C1 [94], hablamos de un fenómeno de transactivación (+GRE, Esquema 4A). El GR unido directamente a un GRE simple también puede reducir la expresión del gen diana, como ocurre en el caso de la IL6, IL11, IL8 o la *matrix metalloproteinase 3* (MMP3), fenómeno conocido como represión clásica [95] (nGRE, esquema 4D).



Esquema 4. Mecanismos principales de interacción del GR.

Los GRE *composite*, se caracterizan por contener secuencias que permiten la unión del homodímero o monómero de GR conjuntamente con otros factores de transcripción, como ocurre en el promotor del gen que codifica para la CRH, que tiene un GRE que recibe a c-fos, c-jun y al propio GR [96]. La consecuencia final de este tipo de interacción puede ser una reducción de la expresión del gen en cuestión (cGRE, Esquema 4E) o una activación (cGRE Esquema 4B).

Por último, en el caso de *tethering*, el GR en forma monomérica no interacciona con el DNA, sino que se une por su dominio LBD a otro factor de transcripción. Algunos de los casos más conocidos de este tipo de interacción son sobre los factores de transcripción *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) [97, 98], *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [99] y *activator protein 1* (AP1) [100, 101], que son importantes de cara a los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los GC (tGRE, esquema 4C y F). Es también posible que el *tethering* impida la unión de los factores de transcripción al DNA (Esquema 4G). Incluso se ha descrito cómo el *tethering* del GR sobre algunos factores de transcripción genera inhibición, no de forma directa, sino provocando la incorporación de elementos co-represores como la *hystone deacetylase* (HDCA3), *silencing mediator of retinoic acid receptor* (SMRT) o *nuclear receptor repressor complex* (NCoR) (Esquema 4H).

Clásicamente se ha considerado que estas eran las únicas opciones con las que contaban los GC para interactuar con el GR. Sin embargo, más recientemente se ha descrito la existencia de algunos receptores anclados en las membranas celulares [102], que muestran capacidad para el reconocimiento de los GC. Estos receptores aún necesitan un estudio en profundidad pero parecen ser receptores GR clásicos anclados a membrana aunque hay otros asociados a proteínas G [103]. Las consecuencias suelen ser independientes de la modificación de expresión génica, por lo que aparecen a mucho más corto plazo. Uno de los ejemplos de esta opción es la cierta activación directa de la ruta de señalización de las *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) [104, 105]. Estos efectos rápidos de los GC tienen implicaciones funcionales potencialmente relevantes en los sistemas cardiovascular, inmunológico y por supuesto neuroendocrino.

Por último, es pertinente al menos citar otras dos posibilidades mecánicas mediante las cuales, tras la unión del GC al GR, este último genera ciertos efectos en la célula diana. Así, aunque generalmente se considera que el GR sólo se homodimeriza al encontrarse ya unido a ácido desoxiribonucleico (DNA), existen evidencias que apuntan a que puede generar dímeros en solución de forma independiente del DNA, aunque su relevancia funcional es pequeña por tener baja afinidad por el DNA comparado con otros factores de transcripción [106]. Por otro lado, se ha descrito también que tras la unión del GC al GR, este último no sólo es capaz de asociarse consigo mismo, sino que también lo puede hacer con el MR dando lugar a un heterodímero funcionalmente activo en términos de unión a DNA y por tanto como factor de transcripción [107, 108].

2.5 Modelos animales con alteraciones en GR.

El GR consta de múltiples modelos animales con los que se ha ido tratando de dar respuesta a los efectos que producían los GC ya sean endógenos o exógenos en el organismo.

En 1992 se produjo el primer animal en el que se modificó genéticamente el GR. En él se incluyó la secuencia contrasentido del GR [109]. Como consecuencia, estos ratones eran obesos y presentaban la corticosterona y ACTH elevada en plasma.

Los ratones *knockout* (KO) completos han sido descritos por varios grupos [110] pero mueren en pocas horas por insuficiencia respiratoria, ya que los pulmones no maduran correctamente, además de presentar otras anormalidades severas y elevados niveles de corticosterona y ACTH por ausencia de señalización.

Los ratones GR^{dim} presentan la mutación A458T que causa incapacidad para dimerizar el GR y, por tanto, no pueden unirse a GRE presentes en el DNA pero sí dar lugar a las acciones de *tethering* ya que éstas están mediadas por interacción proteína-proteína. Con ellos se demostró que el mecanismo de *tethering* parece ser incluso más importante que la interacción directa con el DNA, pues estos ratones sobreviven y procrean, algo que no ocurre con ratones que carecen completamente de GR [111].

Debido a la imposibilidad de disponer de ratones GR KO completos y gracias a la tecnología *loxp-cre* [112] se han generado ratones KO específicos de diferentes tejidos como pulmón, piel, sistema cardiovascular, tejido adiposo, músculo, intestino, sistema inmune, hueso y sistema nervioso central, entre otros.

En el tejido pulmonar los efectos han sido discordantes entre los distintos grupos de investigación [57, 113, 114] de modo que no se han podido establecer conclusiones claras acerca de estos animales excepto una, el GR es indispensable para la maduración pulmonar como ya se intuía.

En los ratones que carecen de GR en la nefronas distales no se produce rescate de la respuesta hipertensiva por dexametasona [115] mientras que si lo hacen los KO de endotelio vascular [116], que además tienen especial sensibilidad al modelo de shock séptico. Si la delección ocurre en corazón [117], el resultado es arritmia cardiaca que desemboca en la muerte a los 6 meses por fallo cardiaco.

Con respecto al músculo estriado, la atrofia muscular inducida por dexametasona se corrige en los ratones KO en músculo de modo completo [118], lo que indica que es el GR el responsable de ésta. En tejido óseo se ha encontrado que es el GR de osteoblastos y no el de osteoclastos el principal responsable de la osteoporosis inducida por GC [119], aunque en estos últimos también debe jugar un papel importante.

Existen múltiples estudios sobre el papel del receptor en el sistema inmune, por citar algunos, los macrófagos carentes de GR son capaces de generar aterosclerosis en ratones *low density lipoprotein receptor* (LDLR) KO [120] mientras que los linfocitos GR KO son los responsables del efecto terapéutico de los GC en un modelo de artritis reumatoide [121].

En tejidos relacionados con el metabolismo, la delección de GR en hígado reveló que los GC son necesarios para la homeostasis de ácidos biliares [122], sin embargo, su delección en células α o β pancreáticas no tuvo ningún efecto [123]. De modo interesante, la ausencia de GR en adipocitos provoca una menor capacidad lipolítica

de los adipocitos mientras que mejora la obesidad asociada a dieta alta en grasa-envejecimiento y la tolerancia a la glucosa, demostrando que el GR juega un papel importante en los desórdenes metabólicos asociados a dieta alta en grasa y envejecimiento [124].

En la piel, y siendo de gran interés debido al parecido con el epitelio intestinal, los ratones GR KO ligado a keratinocitos mostraron un desarrollo alterado, una cierta inflamación y mayor susceptibilidad al daño por agentes detergentes y cáncer de piel [58, 125, 126]. Además, la piel de estos ratones es capaz de producir mayor cantidad de GC *de novo* con respecto al control ante la ausencia de señalización de GR, lo cual protege frente a la inflamación [127].

Por último, y por ser el tema de estudio de esta tesis doctoral, los ratones GR KO ligados a villina, es decir, las células epiteliales intestinales de estos ratones carecen de GR, se generaron en el año 2012 por el grupo del profesor Tuckermann [128, 129]. Su grupo describió que los ratones carentes en GR tienen aumentada la absorción de glucosa y que es el GR el responsable de inducir gastroparesia por la administración de dexametasona.

3 Enfermedad inflamatoria intestinal.

3.1 Generalidades.

El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) define una condición inflamatoria crónica e idiopática del tracto gastrointestinal, en la cual el paciente pasa de forma alternativa por períodos de inflamación y remisión. EII es una denominación general que hace referencia principalmente a dos cuadros clínicos diferentes conocidos como enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU). A nivel clínico ambas formas son a menudo muy similares, lo que suele dificultar un fácil diagnóstico diferencial. No obstante, existen diferencias sustanciales a nivel anatomopatológico atendiendo a las capas de la pared intestinal que se encuentran afectadas y al tipo de respuesta inmunológica predominante.

La EC se caracteriza por una inflamación transmural del tracto gastrointestinal, que puede afectar a cualquiera de los segmentos, desde la boca hasta el ano. La EC cursa con una evolución no penetrante, de forma que solo alrededor del 15% de los casos presentan fístulas o abscesos. Clásicamente se produce una afectación inflamatoria discontinua o parcheada del segmento en cuestión, que en ocasiones se acompaña de otras complicaciones como estenosis o fístulas en la zona perianal. La sintomatología puede ser muy diferente en cada paciente, en función de la región

intestinal que esté afectada. Si la afectación es en colon, el principal síntoma será diarrea acompañada de presencia de sangre y moco. En cambio, si la afectación reside en el intestino delgado, suele manifestarse dolor abdominal intenso en el cuadrante inferior derecho. La presencia de ulceraciones severas, fiebre y pérdida de peso derivada de una menor ingesta de alimentos para evitar el dolor postprandial, se presentan en la mayoría de los casos sin importar el segmento intestinal afectado [130].

En los segmentos inflamados en un paciente con EC se observa engrosamiento y rigidez intestinal dando aspecto de órgano macizo a la palpación, debido a la fibrosis y el edema. Además, las porciones afectadas se adhieren con frecuencia a otros segmentos intestinales, pudiendo ocasionar fístulas. Estos segmentos presentan una disminución de la luz intestinal y fibrosis en la pared. La mucosa suele presentar un aspecto en forma de “empedrado”, por la alternancia entre ulceraciones profundas y zonas edematosas. [131, 132]. A nivel microscópico, destaca la infiltración difusa de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa intestinal y la *lamina propria*. Asimismo, es frecuente encontrar granulomas localizados en submucosa, subserosa y ganglios linfáticos.

La CU se caracteriza por una inflamación no transmural (superficial) que solo afecta a la mucosa y que está anatómicamente restringida al colon. La sintomatología suele estar dominada por dolor abdominal sobre todo postprandial, diarrea con deposiciones muy mucosas e incluso acompañadas de pus, rectorragia y anorexia con la consecuente tendencia a la pérdida de peso o retraso en el crecimiento si hablamos de un paciente pediátrico. Cuando la sintomatología es muy exacerbada, se usa el término de CU fulminante. En esta situación clínica, se produce una fuerte hemorragia intraluminal y la pared intestinal presenta un aspecto muy fino y frágil. Llegado a este punto, la única alternativa es la realización de una colectomía [133].

En la CU, a nivel macroscópico la mucosa en fase inflamatoria aparece hiperémica y con hemorragias puntiformes. A medida que el proceso inflamatorio evoluciona aparecen úlceras superficiales, que tienden a extenderse y fusionarse llegando a afectar grandes áreas de la mucosa colónica. Es también frecuente la presencia de pseudopólipos o pólipos inflamatorios que pueden confundirse fácilmente con adenomas. En fase de remisión este aspecto se normaliza bastante, pero la mucosa permanece lisa, brillante, granulosa y atrófica. En fases avanzadas de la enfermedad, el colon se torna fibrótico, estrecho y sensiblemente acortado con pérdida de las marcas australes [134-136]. A nivel microscópico, la *lamina propria* se

encuentra infiltrada de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos. Junto a este infiltrado, se distorsiona la arquitectura normal de las criptas apareciendo disposiciones aberrantes. La extrema fragilidad tisular que ya se ha citado anteriormente asociada a la CU fulminante, puede reflejarse incluso en la aparición de agrietamientos patentes en la mucosa colónica [137, 138].

El diagnóstico diferencial fiable entre la EC y la CU es una cuestión que ha suscitado debate durante mucho tiempo en la comunidad médica. En general, este diagnóstico se hace atendiendo a las diferencias en la distribución anatómica de la afectación inflamatoria y sobre todo a la transmuralidad del proceso inflamatorio a nivel microscópico. [139].

De un modo comparativo entre EC y CU, la CU presenta una incidencia superior [140], estable en los últimos años. No obstante, la EC está viendo incrementada su incidencia fundamentalmente en aquellos países que inicialmente presentaban menos casos.

Distintos factores definen la epidemiología, entre ellos cabe destacar:

- Localización geográfica. Los mayores casos de incidencia se registran en países desarrollados, destacando norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica. Sin embargo, aquellos que tradicionalmente presentaban una tasa baja, sur de Europa, Asia y África, están sufriendo un alarmante incremento en las últimas décadas paralelamente a la occidentalización de la dieta. [141-145]
- La edad parece ser un factor importante en el momento de la instauración de la enfermedad. La EC tiene un pico de máxima incidencia el comienzo de la madurez, entre los 20-40 años, mientras que la CU lo posee alrededor de los 60 [146]. En la última década ha aumentado incidencia de la EII en la edad pediátrica, principalmente EC [147].
- La influencia atribuida al sexo es relativamente pequeña en la instauración y severidad de la EII. Aunque sutiles, las diferencias apuntan una mayor afectación en la mujer por EC y en el hombre por CU [148, 149].
- Raza. Estudios realizados han demostrado una susceptibilidad a la EII comparable entre las razas negra y caucásica, cuando todos los individuos siguen un estilo de vida occidental comparable [150]. Existe una asociación significativa entre la condición judía y una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad en comparación con cualquier otra raza [151-153]. Dicha parece debida a factores estrictamente genéticos parecen ser los responsables [154].

- Procesos infecciosos. Las bacterias del género *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplasma* o *Listeria monocytogenes*, podrían tener un papel como factor desencadenante de la EII [155-158]. En ratones se asoció la infección con *Mycobacterium avium* con una inflamación similar a la enterocolitis necrotizante [159]. Algunas cepas de *E. coli* con capacidad adherente e invasiva sobre el epitelio intestinal se han aislados preferentemente de pacientes con EC, sin embargo hasta la fecha no se ha conseguido establecer una relación consistente [160-163]. Sorprendentemente, la presencia de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal se asocia con un cierto papel protector ante el desarrollo de la EII [164], aunque hay resultados controvertidos en ese sentido [165].

3.2 Etiología.

En la actualidad la EII se sigue considerando una afección de carácter idiopático. No obstante, la teoría más aceptada es que la EII surge por una respuesta inmunológica exacerbada en la mucosa intestinal y el tejido linfóide asociado a intestino (GALT) frente a antígenos procedentes de la microbiota entérica en pacientes genéticamente predispuestos. Además, esta respuesta inflamatoria que adquiere carácter crónico se ve modulada por los factores ambientales.

3.2.1 Factores genéticos.

La EII tiene un alto componente genético observable tanto en la elevada tasa de agregación como en la mayor susceptibilidad de la población judía. Presentar un historial familiar positivo para la enfermedad es hoy en día el factor de riesgo independiente más relevante a considerar. En el caso de la EC el riesgo de desarrollar la enfermedad ante un caso positivo en un familiar de primer grado es de hasta el 35% [166, 167]. La evidencia más consistente acerca de la influencia de la predisposición genética en el desarrollo de cualquiera de las presentaciones clínicas de la EII, proviene de estudios realizados con gemelos monocigóticos [168, 169]. No obstante, incluso en este caso, la patología no concuerda en su totalidad entre individuos, lo cual da idea del carácter multifactorial de ésta y de lo significativo de la contribución relativa de los factores ambientales en el inicio de la misma [170-172].

Actualmente el modelo de herencia genética que mejor se ajusta es uno de tipo multi-locus u oligogénico. Estudios recientes, basados en la realización de *genome-wide association study* (GWAS) han elevado el número de *loci* asociados con la EII en más de 160, estando muchos de ellos a su vez relacionados con otros desórdenes de

carácter autoinmunitario como la espondilitis anquilosante y la psoriasis, así como con una mayor susceptibilidad a infecciones por micobacterias [173].

Muchos de los genes en los que se ha encontrado asociación para algunas de sus variantes con la EII, están relacionados con la regulación de fenómenos cruciales en las respuestas inmunitarias en condiciones basales y en inflamación en el tracto gastrointestinal.

El gen para la *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2) es probablemente el que ha sido más estudiado, principalmente por la gran fuerza de asociación que ha mostrado respecto a la EC [174]. Este gen codifica uno de los receptores tipo NOD (*nucleotide binding oligomersitation*) más relevantes, por lo que una mutación puede generar un cambio sustancial en la percepción del muramildipéptido (MDP) de naturaleza bacteriana, siendo esto relevante en células como las presentadoras de antígenos (APC) y principalmente las células de Paneth. [175, 176].

Otro gen cuya mutación se ha mostrado fuertemente asociada con la EII es el que codifica la subunidad específica del receptor de la IL23 (IL23R). Este gen presenta varias mutaciones que determinan cambios sustanciales en la susceptibilidad a la EC y la CU, aunque en menor medida para la segunda [173]. La IL23 es producida fundamentalmente por macrófagos y células dendríticas, mientras que el receptor lo expresan estas mismas células, así como las células *natural killer* (NK) y las células linfoides innatas (ILC). Sobre macrófagos y células dendríticas la IL23 aumenta su actividad como APC. El IL23R de células *T helper* 17 (Th17) regula la producción de IL17 e IL22 que juegan un papel relevante en la fisiopatología de la EC, justificando que las mutaciones que generan un receptor menos sensible a IL23 tienden a implicar cierta protección frente a la EC [177, 178], mientras que las de mayor sensibilidad se asocian con la esta patología [179]. La importancia del IL23R se ha demostrado haciendo uso del modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) [180] y mediante el uso del modelo de colitis espontánea en animales IL10 KO [181].

Por último, hay múltiples genes de susceptibilidad a la EII que codifican proteínas decisivas en el desarrollo de las respuestas inmunológicas adaptativas. En línea con este concepto, en los genes STAT3, IL2RA, IL12B e IL18R1 se han encontrado variantes asociadas a la EC y/o CU [182]. También el gen codificante de la IL10 tiene variantes con asociación a EC y CU al verse afectado su papel inmunoregulador [183]. Independientemente de los genes relacionados con el SI, existe un grupo de ellos que intervienen en la regulación de la autofagia, destacando

el polimorfismo (rs2241880) del gen de la *autophagy-related protein 16-1* (ATG16L1), que se encuentra muy asociado con la localización iliaca de la EC [184]. En concreto, la mutación *T300A* se asocia con una menor capacidad fagocítica para la destrucción de antígenos bacterianos y con una menor producción de péptidos antibacterianos por parte de las células de Paneth [185]. El hallazgo de estos genes implicados en la autofagia, ha iniciado investigaciones enfocadas a dichos procesos [186].

3.2.2 Factores ambientales.

3.2.2.1 Microbiota intestinal.

En el tercio distal del tracto gastrointestinal conviven la mucosa intestinal y la flora bacteriana. Esta convivencia se puede ver alterada por la pérdida de tolerancia inmunológica por parte de las células del sistema inmune innato. No obstante, la composición de la microbiota intestinal es un factor que puede contribuir, al menos en parte, a este desequilibrio.

La microbiota ejerce un papel determinante en la EII como se puede deducir de la estricta dependencia de ésta para el desarrollo del proceso inflamatorio en varios modelos de colitis espontánea, la descripción de cierta disbiosis intestinal típicamente asociada a los pacientes con EII, y finalmente, de la eficacia terapéutica de la microbiota intestinal, destacando el uso de prebióticos, probióticos y los trasplantes de microbiota fecal [187].

La disbiosis intestinal se caracteriza por una reducción en la diversidad bacteriana, siendo poco frecuente encontrar bacterias de los géneros *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, así como *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum*, con buena representación en condiciones normales [188, 189].

Sin duda, la gran incógnita con respecto a la disbiosis es si ésta es la causa o la consecuencia de la inflamación crónica intestinal. Las evidencias invitan a pensar preferentemente en la segunda posibilidad, de forma que sería la susceptibilidad genética del hospedador unida a diferentes factores ambientales la que determinaría un desequilibrio que genera un contexto inflamatorio. En este contexto inflamatorio, se produce una alteración importante en la producción de mediadores solubles por parte del hospedador que, en condiciones normales, contribuyen al equilibrio que la mucosa intestinal establece con la microbiota, justificándose de esta manera una disbiosis. Sin embargo, el hecho de que la mayor parte de las variantes genéticas asociadas con la EII se encuentren en genes que codifican proteínas implicadas en el reconocimiento y la respuesta ante antígenos presentes en la luz intestinal, caso de NOD2, IL23R o ATG16L1 antes descritos, hace que no se pueda

descartar la posibilidad de que alteraciones cualitativas en la microbiota colaboren al menos en parte en la instauración de la inflamación intestinal [190-193].

3.2.2.2 Estrés

El sistema nervioso entérico controla la motilidad, transporte hidroelectrolítico y la microcirculación del tracto gastrointestinal [194]. Las investigaciones en este aspecto han terminado por definir al estrés como un factor escasamente implicado en la iniciación de la EII, pero que parece ser importante en cuanto a precipitar la recidiva de un paciente en remisión. La base fisiológica que fundamenta esta asociación recae por un lado, en un aumento de las descargas de naturaleza colinérgica en el sistema nervioso entérico, que se traduce en un aumento de la motilidad intestinal [195, 196] y de la secreción hidroelectrolítica [197], y por el otro, en un aumento de los niveles de CRH y por ende de cortisol. El cortisol ejerce efectos inmunomoduladores que pueden alterar la homeostasis intestinal. La CRH actúa sobre los mastocitos produciendo la liberación de múltiples mediadores solubles que comprometen la función de barrera intestinal (FBI) al aumentar la permeabilidad transcelular [198]. En consecuencia, se ha observado que la administración de un bloqueante inespecífico de los dos subtipos de receptores para la CRH presenta un efecto antiinflamatorio considerable en un modelo de colitis inducida por la administración de la toxina A de *Clostridium difficile* [199]. Por otro lado, existen múltiples evidencias experimentales que relacionan la exposición crónica de roedores a diferentes modelos de estrés con una mayor susceptibilidad al modelo de colitis inducida por DSS [200-202]. Atendiendo a estas evidencias, se han realizado algunos estudios epidemiológicos tratando de establecer una conexión entre el éxito terapéutico en el control del estrés o la ansiedad y una menor tendencia a la recidiva en pacientes con EII, pero no se han obtenido resultados concluyentes en ningún sentido [203-205].

3.2.2.3 Dieta

Hasta la fecha se han realizado multitud de estudios, todos arrojando resultados negativos, orientados al establecimiento de relaciones de causalidad entre el consumo de alimentos como la leche y otros productos lácteos, cereales, margarina e incluso bebidas refrescantes carbonatadas, con una mayor susceptibilidad a la EII. En general, todos estos estudios han tratado de relacionar la dieta occidental, caracterizada por un desequilibrio nutricional a favor de los hidratos de carbono, con una mayor incidencia de EII. De hecho, hay algunos estudios que han conseguido encontrar cierta asociación con una mayor incidencia de CU [206, 207]. Un desequilibrio en el componente lipídico de la dieta y del balance cualitativo de

los ácidos grasos del mismo, podría ser la causa subyacente de dicho fenómeno [208, 209], en la medida que existen estudios que apuntan a un efecto beneficioso de los ácidos grasos ω -3 en la inflamación intestinal [210-214].

La lactancia materna reduce significativamente en el lactante el riesgo de padecer tanto EC como CU [215, 216]. Diversos mecanismos pueden explicar al menos en parte esta asociación, destacando por un lado la composición rica en proteínas y oligosacáridos con capacidad inmunoestimulante [217], su riqueza en *transforming growth factor β* (TGF- β) que promueve la polarización de células T *cluster of differentiation 4* (CD4) hacia el subtipo Treg que promueve la tolerancia antigénica [218], su alto contenido en inmunoglobulina A soluble (sIgA) y en CD14 soluble que contribuye a la defensa inespecífica de la mucosa intestinal del lactante [219-221], la microbiota que aporta de forma directa y que colabora en la conformación de una adecuada diversidad bacteriana en el intestino del neonato [221], e incluso el refuerzo directo de la FBI debido al efecto de algunos péptidos contenidos en ella que aumentan la expresión de proteínas de las uniones estrechas como la claudina 4 o la ocludina [222, 223]. Además, hay que considerar que la leche materna contiene una cantidad significativa de cortisol que favorece la maduración final del sistema gastrointestinal del neonato. Finalmente, es importante tener en cuenta que la realización de la lactancia materna completa implica un retraso en la introducción de la leche de vaca, lo que puede influir en el riesgo de forma independiente [224, 225].

Hasta el momento, no se ha podido establecer una relación causa - efecto consistente que relacione de un modo incontrovertible la aparición de algún tipo de alergia alimentaria o la concurrencia de algún factor dietético, con un mayor riesgo de padecer alguna de las presentaciones clínicas de la EII.

3.2.2.4 Tabaco

El único factor ambiental cuyos datos epidemiológicos son lo suficientemente concluyentes para establecer una relación directa y fiable con una mayor o menor susceptibilidad a la EII es el tabaco. En concreto, está establecido un papel protector del consumo de tabaco respecto al desarrollo de CU [226, 227], siendo el porcentaje de fumadores entre los pacientes de CU solo del 10-15% [228]. Por el contrario, este mismo factor se asocia con un riesgo elevado ante el desarrollo de EC y con un peor pronóstico en los casos en los que ésta ya se ha diagnosticado [229-232]. El efecto protector mostrado por el tabaco en la CU parece deberse a los múltiples efectos inmunomoduladores de la nicotina, que ha mostrado efectos antiinflamatorios

disminuyendo la producción de citoquinas como la IL8 o la IL1 β [233], entre otros [234, 235].

3.2.2.5 Apendicectomía

En la actualidad está descrita una disminución de la incidencia de la CU, una aparición más tardía de ésta y un perfil de enfermedad menos agresivo, así como una menor tasa de recidivas, entre los pacientes sometidos a apendicectomía, sobre todo si la intervención se produce durante las primeras etapas de la vida [236-241].

3.3 Inmunología de la EII.

El tracto gastrointestinal es la superficie del organismo humano expuesta al medio externo de mayor extensión (alrededor de 200 m²). El objeto principal del sistema inmune (SI) es diferenciar lo propio de lo ajeno mientras el tracto gastrointestinal preserva la habilidad de digestión y absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos a través de la mucosa [190]. El reto consiste en mantener la capacidad para responder a organismos potencialmente patógenos al tiempo que se tolera esa mayoría de antígenos no dañinos.

Para ello, el SI gastrointestinal se sirve de una serie de componentes heterogéneos, incluyendo desde las células que componen la pared intestinal hasta las integradas dentro de los órganos linfoides asociados al tejido intestinal GALT. Todo ello se encuentra a su vez favorecido por el peristaltismo intestinal, que favoreciendo la motilidad, impide la adhesión mantenida de un determinado microorganismo a la mucosa intestinal, reduciendo el riesgo de invasión.

Para entender de qué manera el SI intestinal está alterado en EII, primero es necesario conocer su funcionamiento en condiciones fisiológicas.

3.3.1 Homeostasis inmunológica en el intestino sano.

3.3.1.1 Microbiota intestinal y tolerancia oral.

Las bacterias comensales son capaces de modular la expresión de genes involucrados en diferentes funciones intestinales como la absorción de nutrientes, el fortalecimiento de la barrera mucosa, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis o la maduración intestinal postnatal [172]. Esta relación simbiótica se establece durante los primeros 2 o 3 años de vida. Los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia oral hacia la microbiota y los antígenos procedentes de la dieta no están del todo claros [242].

3.3.1.2 Barrera epitelial

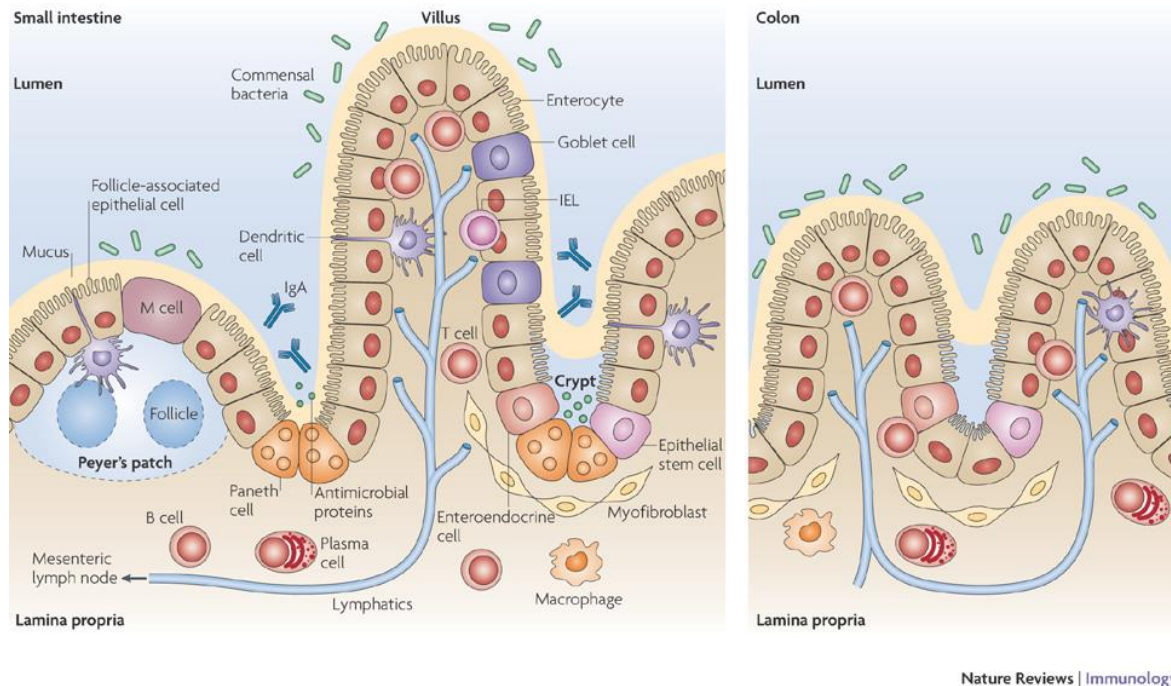
La barrera epitelial está compuesta por una monocapa celular heterogénea en cuanto a la naturaleza y especialización funcional de las células que la forman. Todas ellas provienen de células madre pluripotenciales localizadas en las criptas de Lieberkühn [243], que proliferan continuamente permitiendo la renovación del epitelio que se completa en un periodo de 2-5 días [244]. Así, mediante la división de células pluripotenciales de las criptas se generan células que escalan dentro de la monocapa en dirección al borde apical. Paralelamente a la proliferación, estas células van a sufrir un proceso de maduración selectiva regulado por distintos factores como la señalización de glucocorticoides de origen adrenal o local intestinal [245], las señales Wnt y *neurogenic locus notch homolog protein* (NOTCH) [246-249] y la propia señalización de los antígenos de la microbiota comensal. Este proceso de transición progresiva desde un estado proliferativo hacia un estado maduro-diferenciado, terminará dando lugar a los tipos celulares que componen el epitelio de la mucosa intestinal: enterocitos o células entero-absortivas (IEC); células caliciformes, productoras de moco; células de Paneth, destacadas por la secreción de péptidos antimicrobianos; y células enteroendocrinas, que son capaces de producir hormonas que conectan el tracto gastrointestinal con el sistema nervioso entérico.

Justo bajo el epitelio intestinal, a nivel de la *lamina propria*, podemos encontrar células estromales, células B (específicamente células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A (IgA)), células T (linfocitos de la *lamina propria*), macrófagos y células dendríticas. Además, subpoblaciones especializadas de células T (linfocitos intraepiteliales) y algunas células dendríticas se localizan entre las IECs, estratégicamente posicionadas para detectar el contenido luminal [250-252] (esquema 5).

El movimiento de sustancias a través del epitelio intestinal se produce tanto por un transporte transcelular, mediante bombas y canales de membrana específicos, como paracelular, controlado por complejos proteicos de membrana denominados uniones estrechas (TJ, *tight junctions*), las cuales además mantienen la estructura polarizada de las IECs [253].

Originariamente se pensaba que la mucosa intestinal, y en general el epitelio, funcionaba únicamente como barrera ante una invasión bacteriana. Sin embargo, actualmente se reconoce que las IECs, junto con el resto de células del epitelio intestinal, mantienen una compleja y recíproca relación beneficiosa con la microbiota. Recientes estudios muestran cómo el epitelio intestinal no sólo tolera la

presencia de antígenos con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) procedentes de bacterias comensales sino que además, aprovecha señales procedentes de la microbiota entérica para el mantenimiento de la FBI [254].



Esquema 5. Anatomía del sistema inmune intestinal. [251]

3.3.1.3 Reconocimiento antigénico e inmunorregulación

El reconocimiento y procesamiento de antígenos luminales comienza a nivel epitelial [255]. El epitelio intestinal expresa de forma constitutiva varios tipos de receptores con una estructura conservada evolutivamente, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR; *pattern recognition receptor*). Estos receptores son capaces de reconocer PAMP como el LPS, el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico, ácido ribonucleico (RNA) de doble y simple hebra o DNA no metilado (CpG). Las tres grandes familias de PRR incluyen los TLR (receptores tipo Toll; *Toll-like receptors*), los NLR (receptores tipo NOD; *Nod-like receptors*) y los RLR (receptores tipo RIG; *RIG-1-like receptors*).

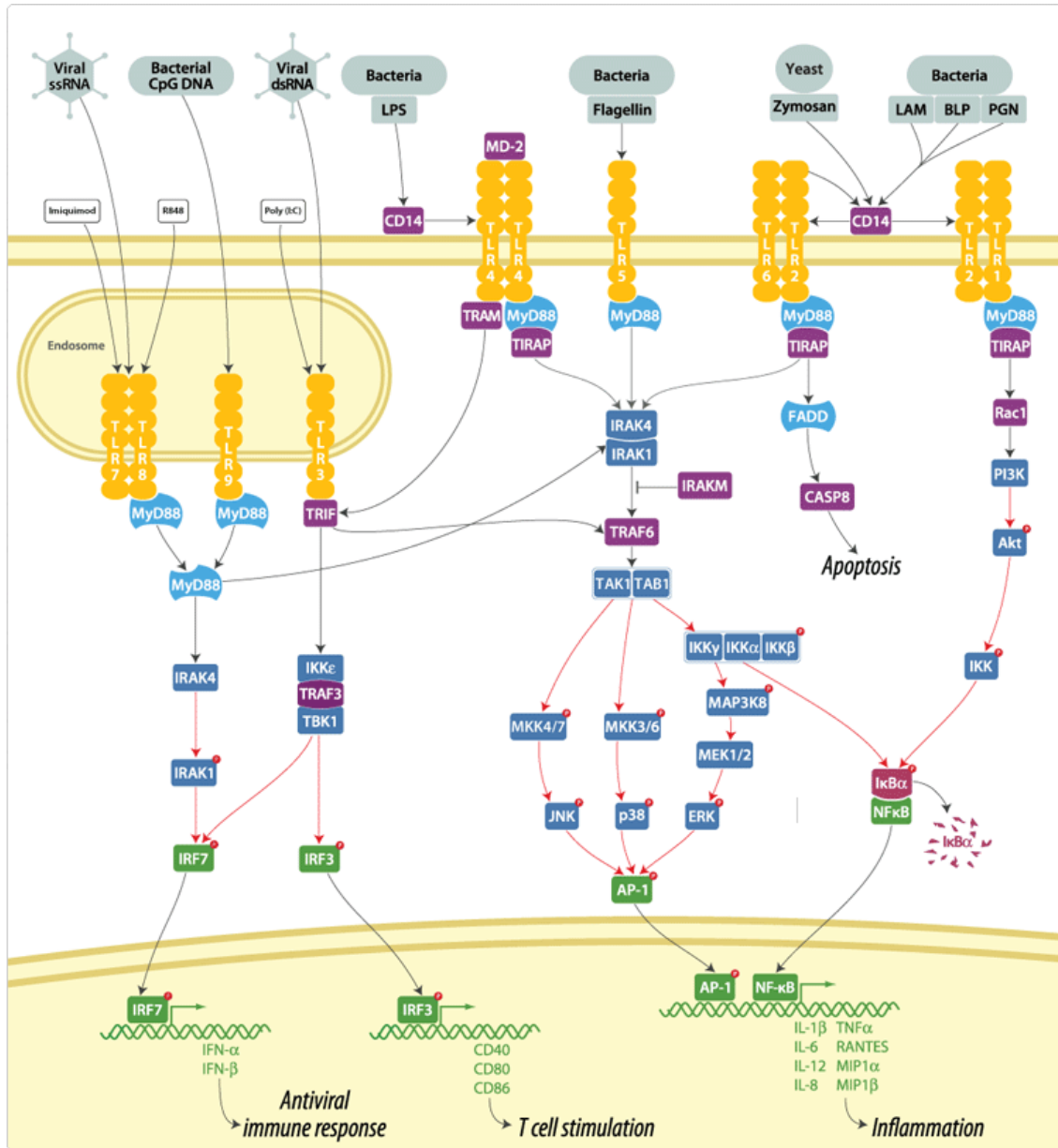
Los TLR reconocen patógenos a nivel de la membrana celular y en endosomas (esquema 6), mientras que NLR y RLR los detectan en el citosol. Los TLR fueron descritos por primera vez en la mosca de la fruta [256, 257]. Los TLR están individualmente especializados, pero considerados en conjunto son capaces de reconocer la mayor parte de PAMPs. En colon humano, se ha detectado, principalmente por inmunohistoquímica, que las IECs expresan bajos niveles de TLR2 y TLR4 [258-260] en condiciones normales, mientras que TLR5 y TLR3 parecen estar ampliamente expresados a nivel proteico [259]. Por otro lado, casi todos los

TLRs se han detectado a nivel de expresión de génica en tejido colónico humano. Además, la expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 también se ha detectado en IECs de intestino delgado humano [258].

En la EII se producen alteraciones en la expresión de TLR. Las IECs procedentes de pacientes con EII mostraron una expresión muy elevada de TLR4 y similar o baja expresión de TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 [259, 261-263] respecto a pacientes sanos. Por otro lado se ha demostrado que las citoquinas inflamatorias regulan la expresión de TLR en IECs [263-266] lo que puede dar lugar a una expresión selectiva de los receptores en función del tipo de peligro [267]. Estudios recientes muestran que interferón γ (IFN γ) y TNF inducen la transcripción de TLR4 y su correceptor *lymphocyte antigen 96* (LY96)[263, 265], mientras que IL4 e IL13 disminuyen la respuesta de las IECs al LPS, ligando del TLR4, sugiriendo que las citoquinas tipo Th2 disminuyen la expresión de TLR4 por IECs [264, 268]. Estudios que comparan ratones en esterilidad total (GF, *germ-free*) con ratones convencionales indican que las bacterias comensales inducen la expresión de ciertos TLR (TLR2, TLR3, TLR4 y TLR5) [269]. Mediante inmunohistoquímica se ha detectado la expresión de TLR9 en la cara apical del borde en cepillo de colon de ratones con microbiota entérica, pero no en ratones GF [270].

La expresión de TLR en el intestino está también regulada de forma espacial, es decir existe expresión polarizada, apical o basolateral. Aunque la expresión de TLR2 y TLR4 es baja en colon adulto normal [259], TLR4 se expresa intensamente en la cara apical de IECs colónicas procedentes de pacientes con EC, aunque no con CU [259]. *In vitro*, TLR5 se expresa solamente en la cara basolateral [271-273]. En consecuencia, la flagelina luminal sólo podría activar al TLR5 tras daño en la barrera epitelial [273]. Sin embargo, otro estudio indica que TLR5 está presente en la cara apical de íleon de ratón [274]. En cuanto al TLR9, su estimulación apical da lugar a una inhibición de NF- κ B, mientras que una estimulación basolateral lo activa. De hecho, la activación apical del TLR9 inhibe la respuesta inflamatoria desencadenada tras la estimulación basolateral, alcanzando lo que se conoce como un estado de tolerancia cruzada (*cross-tolerance*). Esto sugiere que no solo la localización, sino también la función de los TLR puede ser polarizada [272].

Estas respuestas divergentes de los TLR en función de la exposición apical o basolateral al ligando son consistentes con la hipótesis de que las respuestas inflamatorias y potencialmente destructivas de los TLR hacia los PAMPs solo deben ocurrir cuando se ha producido una brecha en la barrera epitelial, o en general cuando se necesita una respuesta inmunológica inmediata.



Esquema 6. Reconocimiento de PAMPs por los diferentes TLR. [275]

Los NLR proporcionan mecanismos de defensa adicionales en la mucosa intestinal [276, 277]. NOD1 y NOD2 están expresados en el citosol de células presentadoras de antígenos expuestas a patógenos que contienen MDP [278]. A nivel basal, la expresión de NOD1 y NOD2 en células epiteliales intestinales es baja o nula, aunque esta expresión se incrementa en casos de inflamación o en presencia de citoquinas proinflamatorias [279, 280]. En modelos de sobreexpresión de NOD2, la estimulación con MDP sugiere que éste participa en la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos [279, 281, 282]. La función de NOD2 en células epiteliales intestinales está poco caracterizada, aunque la menor producción de α -defensinas en ratones con mutaciones en el gen NOD2 sugiere que éste regula la función de células de Paneth [283, 284]. Sin embargo, la importancia de este hecho

es incierta, ya que ratones sin la forma activa de las α -defensinas o sin células de Paneth no desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica [284, 285].

3.3.1.4 Procesamiento antigénico

Las células M (*villous microfold cells*) funcionan como canales conduciendo los antígenos hacia las APCs, las cuales captan, procesan y dirigen los antígenos hacia tejidos linfoides periféricos subyacentes (placas de Peyer en el intestino delgado y folículos linfoides en el colon) donde se inicia la respuesta inmunológica adaptativa. Aunque las células M son la vía más estudiada y conocida para el paso de antígenos a través del epitelio intestinal, en el intestino delgado concretamente, existen otras vías recientemente revisadas [286]. Una vía de paso es asociada a células caliciformes y otra las denominadas fugas paracelulares (*paracelullar leak*), mediante las cuales antígenos de pequeño tamaño (menores de 10kDa), llegan directamente a los nódulos linfáticos mesentéricos donde las células dendríticas residentes los captan y se desarrolla la respuesta inmunológica; además, las células dendríticas de la *lamina propria* tienen la capacidad exponer las dendritas a la luz intestinal adquiriendo la capacidad de reconocer antígenos directamente a ese nivel [287] (esquema 5).

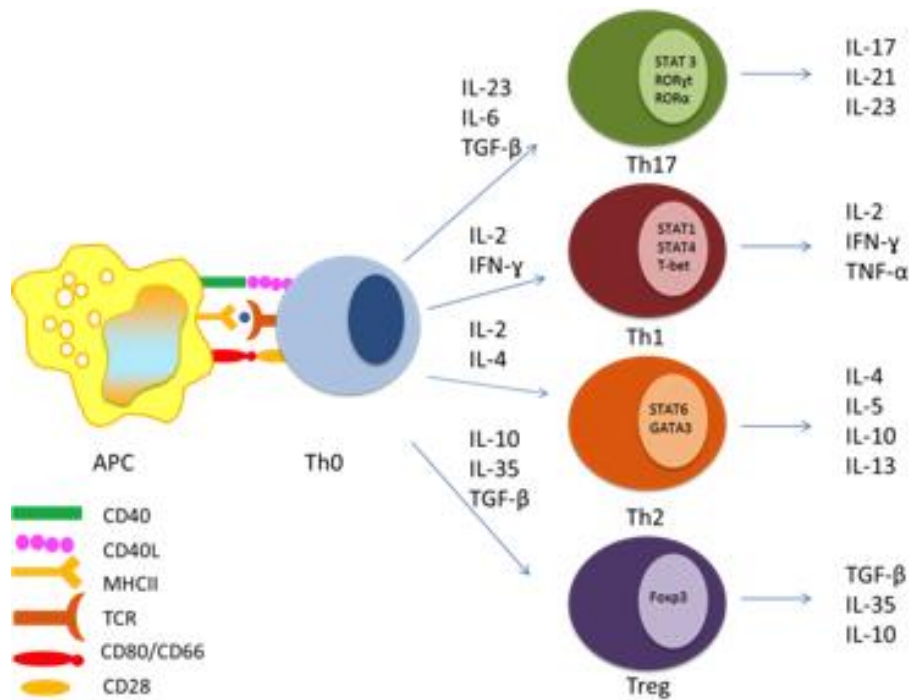
Las células dendríticas son células clave en el control de la inmunidad o tolerancia hacia bacterias comensales. En individuos sanos, tras el reconocimiento de antígenos comensales las células dendríticas muestran un fenotipo inmaduro (baja expresión en su superficie de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II [MHC-II] y de miembros de la familia B7: CD80 y CD86) y por tanto inducen ausencia de repuesta (anergia) en las células T *naïve* (Th0) [288]. Estudios *in vitro* sugieren que las células dendríticas interaccionan con ciertas cepas bacterianas probióticas produciendo IL10, lo que induce una respuesta reguladora en lugar de efectora [289]. Ante estímulos de bacterias no comensales, las células dendríticas maduran y adquieren un fenotipo activado, expresando altos niveles de moléculas MHC-II y B7 en su superficie, así como moléculas estimuladoras, lo que les permite llevar a cabo las señales necesarias para la activación de células T *naïve* hacia células T efectoras [290].

3.3.1.5 Diferenciación de linfocitos T colaboradores

Tras el procesamiento de los antígenos por las APCs, los péptidos resultantes son presentados a través de moléculas MHC-II a las células T *naïve* (Th0), comenzando así su activación seguida de su diferenciación. Dependiendo de la naturaleza del antígeno se producirá la diferenciación a uno u otro linaje de células T

colaboradoras. Siguiendo este patrón, las citoquinas IL12, IL18, IL23 y $TNF\alpha$ dirigen la polarización hacia el subtipo Th1 que producirán citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (IL2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$), las cuales participan en la perpetuación de la reacción inflamatoria; la diferenciación hacia el subtipo Th17 está mediado por IL6 y cantidades reducidas de $TGF-\beta$ [291-294]. Estas células presentarán un fenotipo caracterizado por la expresión de IL17, IL22 o IL21.

La inducción de la respuesta Th2 está dirigida por la IL4, que a su vez, como ocurre en el caso de la respuesta Th1, es la principal citoquina implicada en la respuesta Th2, junto con la IL5 o la IL13. La diferenciación hacia células Treg se debe a grandes cantidades de $TGF-\beta$. Estas células secretan citoquinas con carácter antiinflamatorio (IL10, $TGF-\beta$), que tratan de frenar o contrarrestar la reacción inflamatoria (esquema 7).



Esquema 7. Diferenciación de linfocitos T colaboradores.

Por otro lado, las citoquinas producidas por las APCs son de carácter proinflamatorio con capacidad de activar diferentes tipos celulares, como linfocitos presentes en la *lamina propria*, células epiteliales intestinales y macrófagos residentes en la mucosa intestinal, propagando y perpetuando así la reacción inflamatoria.

Además, la activación de macrófagos y células epiteliales también conlleva la producción de quimioquinas que van a crear un gradiente quimiotáctico que favorece la extravasación y la llegada de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio [295].

3.3.1.6 Linfocitos intraepiteliales.

Los IELs tienen un papel fundamental en la FBI. Se encuentran en la capa epitelial de mucosas en contacto con el medio exterior, como por ejemplo tracto gastrointestinal o reproductor. Principalmente son células T, y dentro de ellas predomina enormemente la función citotóxica, es decir, la población CD8⁺ sobre la CD4⁺. En este capítulo nos centraremos en las IELs intestinales.

En función de cómo adquieren su fenotipo activado y qué antígenos reconocen, podemos dividir las IELs en dos grandes grupos:

- **IELs naturales** o no convencionales: alcanzan su forma activada durante su desarrollo en el timo a través de antígenos propios y en esta etapa, expresan receptores que reconocen ligandos típicos de células epiteliales intestinales que permiten su migración directa, como son la integrina $\alpha E\beta 7$ (reconoce la E-cadherina) o CCR9 (reconoce CCL25). Este tipo celular puede expresar TCR $\alpha\beta$ ⁺ o TCR $\gamma\delta$ ⁺, pero no van a ser ni CD4⁺ ni CD8 $\alpha\beta$ ⁺. Pueden ser dobles negativos, es decir, CD4⁻CD8⁻ o CD8 $\alpha\alpha$ ⁺.
- **IELs inducidas** o convencionales: son activadas en presencia de antígenos externos o periféricos en tejidos linfoides asociados a intestino (GALT), como son los ganglios mesentéricos o las placas de Peyer. Para ello, las células M, macrófagos o células dendríticas migratorias CD103⁺ presentan antígenos a las IELs inducidas, que pasan a su estado activado y comienzan a expresar receptores que las dirigen al intestino, como LFA1 (reconoce la molécula de adhesión molecular 1, ICAM1), integrina $\alpha 1\beta 1$ (reconoce colágeno), integrina $\alpha 4\beta 7$ (reconoce MADCAM1) y CCR9. Este tipo de IELs surge de células T convencionales TCR $\alpha\beta$ ⁺, que serán CD4⁺ o CD8 $\alpha\beta$ ⁺ y expresarán o MHC clase II o MHC clase I, respectivamente.

Las IELs naturales van a ser las predominantes en la primera etapa de la vida, estando presentes antes incluso del nacimiento. Responden ante antígenos inducidos por el estrés debido a la presencia de patógenos, mientras que son permisivas a microbiota y antígenos presentes en la dieta. A medida que el organismo va teniendo contacto con antígenos periféricos, las IELs inducidas van aumentando, desarrollándose así un repertorio adaptado y personalizado a cada ambiente. En este proceso, no sólo los patógenos tienen un papel fundamental, también la dieta [296] y la microbiota [297].

En cuanto a las funciones de las IELs:

- IELs naturales $\text{TCR}\gamma\delta^+$: Tienen un papel esencial en el mantenimiento de la FBI y el recambio de las células epiteliales intestinales [298]. Ratones deficientes en $\text{TCR}\gamma\delta^+$ presentan anomalías en la morfología del epitelio intestinal, menor producción de IgA y menor expresión de MHCII por el epitelio intestinal [299], además de un agravamiento de la colitis inducida por DSS [300]. Sin embargo, al mismo tiempo, en pacientes con EII, puede correlacionarse el número de este tipo celular con la severidad de la enfermedad [301].
- IELs naturales $\text{TCR}\alpha\beta^+$: Son inmunológicamente quiescentes. No se conoce exactamente qué función tienen [302], pero dado que reconocen antígenos propios, que tienen actividad citotóxica y que están presentes desde antes del nacimiento, se cree que tienen un papel importante en la colonización del colon. Pueden llegar a generar fenómenos de autoinmunidad en condiciones inflamatorias y ante antígenos externos muy similares a los propios [303].
- IELs convencionales $\text{CD8}\alpha\beta^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$: Su principal función es la de protección frente a patógenos gracias a su acción citotóxica y su previo contacto con antígenos externos. Las células de memoria que producen son más maduras, tienen una acción más intensa y prolongada [304]. Por otro lado, se ha demostrado que estas células son responsables del avance, incluso del inicio de la EII. Por ejemplo, en el modelo de colitis por transferencia, las $\text{CD8}\alpha\beta^+$ naive son las que inducen la enfermedad a través de la producción de IL17 [305].

3.3.2 Disfunción del SI intestinal.

Como ya se ha comentado brevemente, la EII es el resultado de una respuesta inapropiada del SI de la mucosa intestinal hacia la microbiota entérica y otros antígenos lumenales. Cabe preguntarse cómo y por qué estos antígenos inducen una respuesta inflamatoria inapropiada. La evidencia experimental de estudios *in vitro*, con animales y en humanos sugiere que varios eventos individuales pueden iniciar alteraciones inflamatorias cuya perpetuación hará que converjan en una serie de eventos finales comunes (eventos secundarios).

3.3.2.1 Eventos primarios.

En primer lugar, varios estudios han demostrado una menor resistencia epitelial y una permeabilidad incrementada en la barrera epitelial de mucosas de pacientes

con EC y CU [306]. Estos defectos preceden al inicio clínico de la enfermedad en pacientes con riesgo familiar [307]. Defectos en la permeabilidad también han sido evidenciados en pacientes sanos con antecedentes familiares de primer grado y con la mutación en el gen NOD2, implicando un defecto genético [308]. Varios mecanismos han sido propuestos como desencadenantes del incremento de la permeabilidad, desde una alteración de las uniones estrechas mediada por células T hasta una disfunción neuronal entérica [306, 309-312].

En segundo lugar, pacientes con EII presentan un SI innato alterado. TLR3 se encuentra disminuido en EC, pero no en CU, mientras que TLR4 está aumentado en ambas [313]. Posiblemente debido a su expresión en la cara basolateral, la expresión de TLR5 está generalmente suprimida en la EII. Sin embargo, en la mucosa dañada la flagelina puede acoplarse al receptor y agravar la inflamación [314]. También se ha observado un incremento en la expresión de NOD2 en IECs, lo que puede ser consecuencia de la activación de la cascada de NF- κ B, que puede comprometer la habilidad de la mucosa para la eliminación de patógenos, dando lugar a una inflamación crónica [279, 280].

En tercer lugar, el reconocimiento de antígenos y el procesamiento por APCs están alterados en la EII. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que las células dendríticas reconocen de forma incorrecta las bacterias comensales, induciendo una respuesta inflamatoria tipo Th1 y posiblemente Th17. De hecho, se ha observado un incremento en la expresión de TLR4 en células dendríticas en la EII [315]. Se ha demostrado un incremento en la frecuencia de APCs con fenotipo activado o maduro en la mucosa inflamada [315], así como una escasez de APCs circulantes inmaduras, potencialmente tolerogénicas [316]. En células dendríticas humanas procedentes de pacientes con EII se ha observado un incremento en la expresión de marcadores de destino al intestino (*gut homing*), y una respuesta aberrante a estímulos tipo LPS o CpG [316]. Esta ausencia en la capacidad de regulación de estas células puede contribuir a una activación repetida de ciertas células T memoria, perpetuando la inflamación [290, 317].

En cuarto lugar, las APCs no profesionales como IECs, que en condiciones normales inducen anergia en células T CD4+, adquieren un fenotipo activado y un aumento en la expresión de moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas como IFN γ o TNF, quizás por la pérdida de moléculas B7 (CD80, CD86) [318]. Se ha observado que las IECs de pacientes con EII también expresan moléculas coestimuladoras alternativas, transformándolas en APCs funcionales. De hecho, se ha comprobado una activación de células T por IECs a través de vías

alternativas no dependientes de MHC-II, como por ejemplo a través de la molécula CD1d, siempre que los antígenos alcancen la cara basolateral de las IECs donde se expresa esta molécula [319].

En quinto lugar, en la EII existe un defecto en el proceso de aclaramiento de células T autorreactivas. Debido a un fallo en la tolerancia central y periférica, las células T activadas persisten y no entran en apoptosis. Esta persistencia ha sido observada en pacientes con EC y de hecho está siendo actualmente abordada con terapias que actúa rompiendo este ciclo de activación [320, 321].

En sexto lugar, en el paciente de EII existe una incapacidad para controlar el estado de inflamación fisiológica en el intestino, y por consiguiente, esta reacción se perpetúa, dando lugar a la inflamación crónica. Además, existe un desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras en la EII. En períodos activos de la enfermedad, las células T efectoras (Th1 y Th2) predominan sobre las reguladoras como consecuencia de un predominio en la diferenciación de células Th0 hacia Th1 (en la EC) [322]. En la UC, se ha detectado un incremento en el número de células NK activadas productoras de IL13 e IL5, perpetuando así la inflamación [323].

3.3.2.2 Eventos secundarios

Las vías inflamatorias iniciadas por los eventos anteriormente descritos convergen en una serie de eventos finales comunes. En primer lugar, en la EII se ha detectado una migración de células inflamatorias desde la vasculatura hacia la mucosa intestinal, siendo las principales responsables de tal migración las APCs profesionales y no profesionales. Este proceso se inicia con la liberación de moléculas quimioatrayentes tales como IL8, MIP-1 α y β (*macrophage inflammatory protein*), RANTES (*regulated on activation normal T cells as secreted*) o MCP-1, 2 y 3 (*monocyte chemoattractant proteins*), que inducen cambios conformacionales en moléculas de adhesión de linfocitos, (integrina α 4 β 7 o el receptor de quimioquinas 7) y de granulocitos (L-selectinas). Al mismo tiempo, citoquinas proinflamatorias como TNF o IL1 β secretadas por macrófagos activados inducen la expresión de moléculas de adhesión a nivel del endotelio vascular de la mucosa, promoviendo la adhesión leucocitaria y su extravasación al tejido [324, 325].

En segundo lugar, una gran cantidad de metabolitos y mediadores (NO, radicales de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, proteasas y metaloproteasas) se acumulan en la mucosa produciendo daño tisular [326-329].

En tercer lugar, además de la inflamación intestinal, la EII se acompaña de una gran variedad de síntomas que afectan a distintos órganos más o menos distantes

del tracto gastrointestinal. La mayor parte de estos síntomas se deben al efecto de las citoquinas proinflamatorias producidas en exceso durante la inflamación intestinal. Entre ellos se encuentran la respuesta de fase aguda, la caquexia o la pérdida de peso [330, 331], alteraciones de los hábitos alimenticios como la anorexia [332] o fiebre [333]. Las consecuencias hematológicas son múltiples: anemia [334-342], alteraciones de la coagulación, cambios en los factores hemostáticos, trombocitosis y aumento de la agregación plaquetaria, o leucocitosis [343]. Existe una gran controversia en lo que se refiere a las leucemias o linfomas asociados a la EII, ya que existen evidencias que apoyan que el mayor riesgo observado se debe a uso de terapias inmunosupresoras y no a la propia enfermedad [344-346].

En cuarto lugar, la EII se asocia con un incremento en el riesgo de padecer cáncer colorrectal, como consecuencia del mantenimiento del proceso inflamatorio crónico. El riesgo es directamente proporcional a la duración, extensión y gravedad de la EII [347-349]. La base molecular que explica la relación en cuestión está siendo investigada en profundidad en la actualidad. El factor de transcripción nuclear NF- κ B se presenta como uno de los puntos clave en dicho fenómeno [350]. El tema será desarrollado en profundidad en el Apartado 4.

3.3.2.3 Esteroidogénesis intestinal en la EII.

Se cree que la función de los GC localmente sintetizados en el intestino es contribuir al mantenimiento de la homeostasis inmune de este tejido, dadas sus potentes acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras.

En el contexto de la EII, una de las principales citoquinas aumentadas es el TNF. Como se ha explicado anteriormente, esta citoquina es a la vez el principal regulador e inductor de la esteroidogénesis intestinal, junto con LRH-1.

En modelos de colitis experimental asociados a un perfil de citoquinas Th1, como el modelo inducido por DSS o por ácido 2,4,6-trinitrobenzosulfónico (TNBS), se produce un fuerte incremento de la expresión de enzimas esteroidogénicas y la liberación de corticosterona. Sin embargo, esto no ocurre en un modelo Th2 como el de la oxazolona, donde una de las diferencias más notables con respecto a los modelos anteriores es que no hay un incremento de TNF asociado a la inflamación. La administración de TNF exógeno en el modelo de oxazolona, estimula la esteroidogénesis en las células epiteliales intestinales de un modo similar a como sucede en modelos como el DSS o el TNBS, provocando una clara mejora de la colitis [73, 74]. Igualmente, animales haplodeficientes en LRH-1 o que carecen de LRH-1

en el epitelio intestinal son más sensibles a la colitis experimental debido a una deficiente síntesis intestinal de GC [351, 352].

Sin embargo, un estudio en colitis experimental crónica, y no aguda como los modelos anteriores, muestra que aunque durante la enfermedad, los niveles de TNF no dejan de aumentar, la síntesis de corticosterona intestinal, así como la expresión génica de CYP11A1 y CYP11B1 no siguen este patrón. La esteroidogénesis intestinal, aunque en un principio aumenta junto con el incremento en los niveles de TNF, a medida que la enfermedad se hace crónica, la síntesis de GC comienza a disminuir. En el caso de la expresión génica del factor de transcripción LRH-1, no se producen variaciones. Se comprobó así, que tanto *in vivo* como *in vitro*, el TNF es capaz de inducir o inhibir la esteroidogénesis intestinal, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, teniendo efectos contrarios en fases agudas y crónicas de inflamación. Además, se sabe que la inhibición de la síntesis de corticosterona intestinal se debe a la acción del TNF en su forma soluble, y no transmembrana, la cual es la responsable de sus acciones proinflamatorias y de su capacidad de cronificar la inflamación [353].

El TNF parece tener así acciones opuestas. En el contexto de inflamación aguda, el TNF actuaría como un sensor de estrés inmunológico, el cual para evitar una respuesta inmune exacerbada, estimula la esteroidogénesis y, por tanto promueve acciones antiinflamatorias[354]. Por el contrario, en situaciones de inflamación prolongada, el TNF sería uno de los responsables de la cronificación de ésta al inhibir la síntesis del GC por parte del intestino.

Biopsias de intestino inflamado de pacientes de EII, que presentan un incremento en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL6 o IL1 β , tienen niveles reducidos de mRNA de LRH-1, CYP11A1 y CYP11B1, sugiriendo una menor síntesis de GC de forma local en el intestino[352].

En un estudio posterior del mismo autor en biopsias de pacientes pediátricos de EII, la expresión génica de LRH-1, CYP11A1 (CYP11B1 no es evaluado) y TNF es similar a la de pacientes sanos, aunque sí presentan niveles reducidos de 11 β HSD1. Hay que destacar que las muestras no son totalmente comparables, pues estas últimas proceden biopsias usadas para el diagnóstico de EII, mientras que las anteriores son de zonas inflamadas de pacientes diagnosticados ya. En cualquier caso, este estudio también refleja una menor síntesis de GC en EII, aunque a través de la reconversión de cortisona a cortisol a través de la enzima 11 β HSD1 [351].

La esteroidogénesis intestinal es un tema de gran controversia. En conjunto, los resultados de las investigaciones hasta el momento parecen indicar que ante un evento inflamatorio, el epitelio intestinal promueve la síntesis de GC para intentar contrarrestarlo, proceso mediado por TNF. Sin embargo, ante inflamación crónica como es el caso de la EII, se produce lo contrario, una esteroidogénesis intestinal defectuosa, donde de nuevo el TNF tiene un papel fundamental. Esto conlleva la perpetuación de la enfermedad debido a la imposibilidad de hacer frente correctamente al fenómeno inflamatorio característico de esta patología. Cabe también la posibilidad de que una deficiente síntesis de GC por el epitelio intestinal sea un factor de riesgo para padecer EII.

Por otro lado, otro estudio refleja que la expresión de 11 β -HSD1 en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa, así como en ratas sometidas a DSS, está aumentada con respecto a sus controles, acompañándose de una disminución de 11 β -HSD2, de manera que se potenciaría la acción de GC en la zona inflamada [355].

3.4 Glucocorticoides en el tratamiento de la EII.

Los GC se usan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas desde hace décadas en virtud de sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Con el transcurso del tiempo se han desarrollado análogos sintéticos con mayor potencia antiinflamatoria, sin embargo, su uso se ve limitado por el amplio perfil de efectos adversos que presentan [356]. En la terapia de la EII los GC juegan un papel central, pero su uso implica importantes riesgos que suponen un reto importante para el clínico.

Los GC son insustituibles dentro del manejo clínico de la EII, incluyendo tanto CU como EC, en las que son usados en la inducción de la remisión [357]. En general, los pacientes con EII se clasifican en tres grupos en función de su respuesta a la terapia con GC, pudiendo distinguirse entre pacientes respondedores, dependientes y no respondedores. Los primeros mejoran clínicamente tras una semana de tratamiento, entran de forma efectiva en remisión y se mantienen en dicha situación conforme se les van retirando progresivamente los GC. Los dependientes de la terapia, en cambio, responden del mismo modo en un principio pero luego sufren una recidiva inflamatoria asociada a la retirada del tratamiento.

Finalmente, los pacientes no respondedores no muestran mejoría clínica alguna independientemente del GC usado, dosis o tiempo de duración de la terapia, siendo el criterio específico para catalogarlos como tales el comportamiento refractario ante la prednisona dosificada a 40 mg/día. Este último tipo de pacientes supone

alrededor del 20-30% del total de enfermos con EII [358], siendo esta una proporción similar a la encontrada en otros trastornos inflamatorios de carácter autoinmunitario, lo que parece reflejar una proporción de ausencia de respuesta a GC constante en la población en general [359, 360]. La causa de la resistencia al tratamiento con GC no está clara, pero parece tener que ver con cambios en los niveles de isoforma del GR, concretamente una mayor proporción de GR β , polimorfismos en el receptor, mutaciones en genes involucrados en la biodisponibilidad de GC o en la producción de citoquinas [361].

Los pacientes con EII producen cantidades elevadas de cortisol suprarrenal e intestinal producido localmente, si esta situación persiste durante mucho tiempo antes de la aplicación de los GC exógenos podría justificar al menos en parte la corticorresistencia. En los últimos años, se ha trabajado en encontrar algún parámetro predictivo sobre la capacidad de respuesta a GC de un determinado paciente, con objeto de adaptar las decisiones clínicas. Las células polimorfonucleares de sangre periférica de pacientes con EII que responden a GC son más sensibles a la inhibición mediada por estos fármacos de la respuesta a LPS, si se compara con los resultados de pacientes con historial clínico de no respuesta a GC. Por tanto, este es un parámetro que en un futuro podría ser utilizado para estimar la pertinencia del uso de los GC en un determinado paciente en virtud de su sensibilidad [362].

Los GC están indicados en la EII cuando se produce una recidiva de la sintomatología para inducir el retorno al estado de remisión. No obstante, en algunos pacientes que muestran dependencia de GC, estos se pueden mantener durante períodos más prolongados de las 1-3 semanas en las que se usan normalmente (alrededor de 10 semanas en el caso exclusivo de la budesonida por su escasa distribución sistémica), pero incluso en estos casos se recomienda mantener al paciente preferentemente con inmunosupresores (azatioprina o 6-mercaptopurina) o bien con un fármaco biológico anti-TNF [363]. Es importante destacar que los GC no se usan como terapia de mantenimiento en el estado de remisión en la EC ni en la CU, no sólo porque sus efectos adversos lo hacen inviable, sino porque son ineficaces para dicho propósito según indican diversos estudios clínicos [364-371].

3.5 Modelos experimentales de inducción de EII.

Dependiendo de cómo se genera la enfermedad, los modelos de EII se pueden clasificar en cuatro categorías.

-Modelos químicos: Se usan agentes nocivos para generar un daño agudo en el colon. Son útiles para estudiar los mecanismos de inflamación y reparación tisular en fases tempranas, pero no para el estudio de los aspectos crónicos característicos de la EC y CU. El ejemplo más conocido y el modelo que se ha usado en la realización de esta tesis doctoral es el modelo de DSS. El DSS es un polisacárido sulfatado soluble en agua. No se sabe el mecanismo de acción concreto que lleva a la inflamación intestinal, pero se cree que se debe a que provoca un daño en la monocapa del epitelio intestinal, que cursa con una menor expresión de las proteínas de unión estrecha (ZO-1 y claudinas principalmente) permitiendo que el contenido luminal, como por ejemplo bacterias y sus productos, penetren y entren en contacto con las capas subyacentes, entre ellas la *lámina propria* [372]. Se pueden simular modelos de inflamación aguda, crónica y recurrente variando las pautas de administración del DSS, el cual se añade al agua de bebida. El protocolo usual dura de 5 a 10 días con una concentración de DSS de 1-5% [373]. Otros modelos químicos son la colitis por oxazolona, una colitis caracterizada por una respuesta Th2 principalmente, que asemeja la colitis ulcerosa humana [374] y el modelo de TNBS, que genera una respuesta Th1 [375].

-Modelos genéticamente modificados: conlleva la sobreexpresión o delección de genes específicos implicados en la patofisiología de la EII. Debido a su origen, son muy útiles para estudiar una determinada ruta inmune, pero no simulan la complejidad real de la EII. Hay una gran variedad de modelos dentro de este grupo. El más usado es el modelo IL10 KO. Estos ratones desarrollan colitis a los 3 meses de edad con muchas características similares a la EC. El desarrollo de la enfermedad es dependiente de la microbiota, ya que en condiciones GF no se produce inflamación [376]. Estos animales pueden llegar a desarrollar cáncer colorrectal asociado a colitis. Tanto el desarrollo de colitis como el de cáncer colorrectal está muy influenciado por la cepa del animal [377].

-Modelos de transferencia celular: Linfocitos T de animales receptores son transferidas a receptores que carecen de inmunidad adaptativa (ratones RAG o SCID). Se usan para el estudio del papel de los linfocitos en el desarrollo de la EII. Sin embargo, se basan en una situación de inmunodeficiencia no presente en la EC o CU [378].

-Modelos congénitos: Son cepas de ratones que desarrollan espontáneamente la enfermedad debido normalmente a factores genéticos. Son los modelos más complejos y quizá los más similares a la EII humana. Un ejemplo es la cepa C3H/HeJBir. No se tiene claro cuál es el mecanismo subyacente, pero se cree que se

debe a que los linfocitos T CD4+ de estos ratones son más fácilmente activados dando lugar a una respuesta mediada por células Th1 [379].

4 Cáncer colorrectal.

4.1 Generalidades y tipos.

El cáncer colorrectal (CRC) es el aquel que se origina en el colon o el recto. Es el tercer carcinoma epitelial más común [380]. Al inicio, suele ser una enfermedad silente, sin ningún tipo de síntoma. En etapas más avanzadas, los pacientes suelen presentar sangre en heces, malestar gástrico, diarrea o estreñimiento, heces más estrechas que normalmente y un cansancio constante o ante leves esfuerzos.

Dentro del CRC podemos distinguir varios tipos en función del origen. El 20% son hereditarios, es decir, hay una mutación congénita que incrementa el riesgo a padecer este carcinoma. Casi el 80% restante es esporádico, se produce una acumulación progresiva de mutaciones genéticas y epigenéticas en oncogenes y genes supresores de tumores que dan lugar a las distintas etapas de la enfermedad. A esta descripción de la evolución de la enfermedad se la conoce como "Vogelgram" [381]. A diferencia del anterior, el CRC esporádico se produce en etapas tardías de la vida y está influenciado por factores ambientales [382]. Por último, existe el cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC), que sólo supone un 3-4% del total de CRC. Es aquel que aparece en pacientes con EII. En estos casos, la inflamación crónica precede al desarrollo de cáncer, mientras que en el CRC esporádico la infiltración de células inmunes se produce cuando el tumor ya está formado. La respuesta inflamatoria es una consecuencia y no una causa como en el caso del CAC [383].

4.2 Factores de riesgo.

Los principales factores de riesgo para padecer CRC son la edad, el sexo masculino y tener antecedentes de cáncer colorrectal. Otros factores relacionados con el estilo de vida como por ejemplo un índice de masa corporal elevado, baja actividad física, ser fumador, alto consumo de carnes rojas o consumir alcohol parecen tener influencia en el caso del CRC esporádico, no está demostrado que sea así en el CAC.

Algunos de los factores de riesgo exclusivos en el CAC son la coexistencia de colangitis esclerosante, inflamación crónica activa, extensión y duración de las

lesiones, presencia de anomalías anatómicas como pseudopólipos, disminución de la luz del colon o foreshortened colon, historia de displasia con morfología plana. Así pues, el riesgo de padecer CAC se correlaciona con la duración, severidad, y extensión de la inflamación, siendo similar al de la población normal en pacientes de EII sin inflamación en el colon y muy alto en pacientes con colangitis esclerosante [384].

En los últimos años se ha producido una disminución progresiva en este exceso de riesgo de CRC en pacientes con EII, llegándose a no haber riesgo incrementado en un estudio realizado en la población danesa [385]. Esta disminución se cree que se debe a un mejor control de la inflamación, detección a tiempo con colonoscopias, mayor número de colectomías y el posible efecto protector de los 5-aminosalicilatos. En todo caso, en Norteamérica y la mayor parte de Europa, el hecho de padecer EII supone un 1.5-2 veces mayor riesgo de sufrir CRC que la población normal [386].

4.3 Alteraciones genéticas en el inicio del CRC y CAC.

Tanto el CRC esporádico como el CAC surgen a causa de una acumulación de mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores, genes relacionados con la reparación del DNA e inestabilidad genómica como aneuploidía, inestabilidad microsatélite o cromosómica. De esta forma, las lesiones benignas degeneran en malignas [387].

Sin embargo, hay diferencias en el momento en el que se producen estos fenómenos y la frecuencia de ciertas alteraciones, que se cree que se deben a distintos factores etiológicos y distintos ambientes celulares [384].

4.3.1 CRC esporádico.

El CRC surge debido a inestabilidad genómica, ya sea inestabilidad cromosómica (85%) o microsatélite (15%).

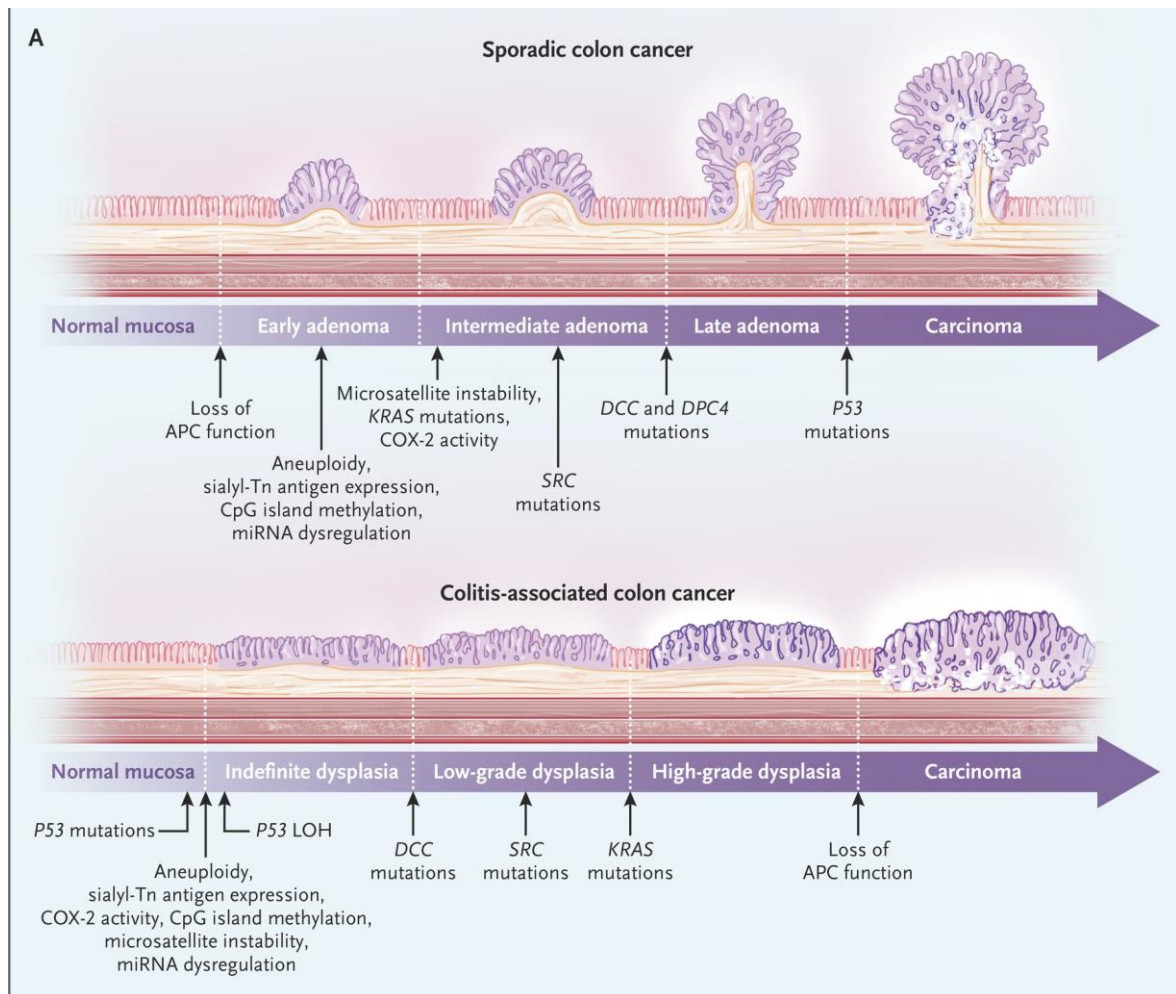
La inestabilidad cromosómica genera una segregación anormal de cromosomas y aneuploidías. La falta de heterocigosidad resultante da lugar a la pérdida de función de ciertos genes supresores de tumores, entre ellos el gen APC (*adenomatous polyposis coli*). Este gen interviene en diversos procesos, entre ellos la proliferación celular y la apoptosis al controlar los niveles de β -catenina y regular así la ruta Wnt. La mutación de APC se produce en fases tempranas, considerándose el primer paso en la mayoría de CRCs espontáneos. Esta mutación permite un ligero mayor crecimiento que las IECs normales. Una segunda mutación en el gen *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) permitirá la expansión de estas

células. La mutación en p53 y su consecuente pérdida de función aparece mucho más tarde y se considera el paso de adenoma y carcinoma.

Los tumores debidos a inestabilidad microsatélite se originan debido a una pérdida de función del sistema de reparación de bases desapareadas, que originan una acumulación de mutaciones en secuencias repetitivas cortas del DNA (microsatélites) [387].

4.3.2 CAC.

El ejemplo más claro de las diferencias entre CRC esporádico y CAC es la mutación en APC y p53. En el caso del CAC, la pérdida de función en APC es menos frecuente y se produce en fases tardías. Por el contrario, la mutación en p53 se da al inicio del proceso (Esquema 8).



Esquema 8. Patogénesis de CRC esporádico vs CAC. [384]

En el trabajo de Robles et al. [388] se describe una secuenciación del exón completo de 30 muestras de CAC humano. En primer lugar, en este trabajo se afirma que el CAC no es un tipo de cáncer en el que hay un mayor número de mutaciones que en el resto de carcinomas y CRC por el hecho de que se genere en un ambiente de inflamación. En segundo lugar, se describen las mutaciones comunes y diferenciales en CRC esporádico y CAC.

Como mutaciones similares a ambos tipos, se encuentran alteraciones en los genes *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4* o la ruta de *c-MYC*. Todos estos protooncogenes tienen funciones importantes en el ciclo celular.

En cuanto a las divergencias entre CRC esporádico y CAC, encontramos que en CAC están más frecuentemente mutados genes implicados en la remodelación del citoesqueleto (*RAC1*, *DOCK2* y *3*, *PREX2*), en la transcripción de p53 (*EP300* y *TRRAP*), o relacionados con la inmunidad, como *IL16*, esencial en la función

mieloide o *SOCS1*, quien tiene un papel antitumoral importante al bloquear la señalización excesiva de interferones y citoquinas.

Respecto a las dos grandes mutaciones diferenciales entre CRC esporádico y CAC (APC y p53, respectivamente), Robles et al. sostienen que, a pesar de que la mutación en APC es menos frecuente y más tardía en CAC, igualmente se produce una sobreexpresión de la vía Wnt/ β -catenina en fases tempranas. Sin embargo, ésta es debida a mutaciones corriente abajo. Por otro lado, la inflamación crónica característica de este tipo de carcinoma, genera la activación de factores de transcripción como NF- κ B o STAT3, que incrementan la ruta Wnt/ β -catenina, y con ello, genes relacionados con la proliferación y el crecimiento celular, aún en ausencia de mutaciones.

Referente a p53, se sabe que mutaciones en este gen pueden darse incluso en tejido inflamado normal [389], lo que sugiere que la inflamación crónica continua predispone al epitelio a cambios genómicos. Además, parece que estas mutaciones son las responsables de las lesiones planas y difíciles de detectar características del CAC (Esquema 8) y que, a pesar de que son similares en CAC y CRC esporádico, la distribución molecular es distinta.

Por último, la metilación aberrante de genes parece tener un papel importante en las alteraciones genéticas de CAC. Normalmente los genes metilados tienen funciones esenciales en el ciclo celular. La metilación de islas CpG precede a la displasia y es muy frecuente en el epitelio de pacientes de CU [387].

Esta tesis doctoral se centrará en el CAC, debido su origen en un ambiente inflamatorio y la importancia del GR en este proceso.

4.4 Influencia de la inflamación en el CAC.

Como se ha explicado anteriormente, la EII cursa con periodos sucesivos de inflamación y regeneración epitelial. Histológicamente, la evolución desde EII hasta CAC tiene varias etapas. En primer lugar, el epitelio intestinal se ve sometido a una inflamación, la cual, especialmente si se vuelve crónica, da lugar a displasia. La displasia es una neoplasia del epitelio sin llegar a invadir la *lamina propria*, que posteriormente evoluciona a carcinoma propiamente dicho.

Distintos factores derivados del proceso inflamatorio pueden mediar en el inicio del desarrollo de CAC.

Activación de la vía canónica Wnt/ β -catenina y la proliferación celular.

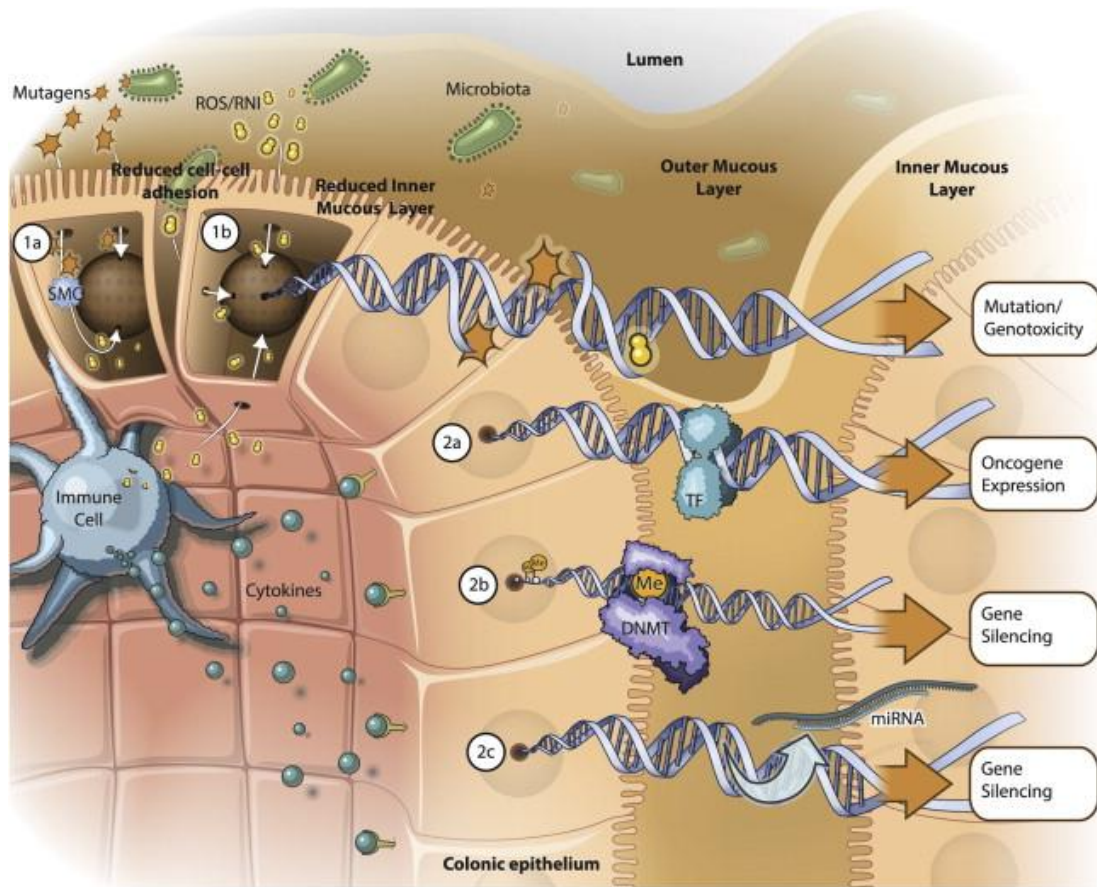
La ruta Wnt/ β -catenina tiene un papel fundamental en la proliferación epitelial y en el control de las células madre epiteliales. En ausencia de ligando de Wnt, la β -catenina es constantemente degradada mediante ubiquitinación. Esto se debe a que la β -catenina permanece unida a un complejo multiproteico que incluye a la Axina, APC, la proteína fosfatasa 2A, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y la caseína quinasa 1 α . Una vez se activa el receptor de Wnt, este complejo destructor es inhibido, de manera que la β -catenina se acumula en el citosol y posteriormente es traslocada al núcleo donde regula la expresión de genes que codifican la Ciclina D1, Axina 2, Lgr5 (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*) o c-Myc [390]. Ante el daño tisular, se necesita una rápida reepitelización. La sobreactivación de la ruta Wnt/ β -catenina como consecuencia de la inflamación, da lugar a un incremento en la proliferación celular, que resulta en un incremento en el número de mutaciones, y una retención de las IECs en las criptas para evitar su descamación hacia el lumen. Así pues, no es necesaria la mutación de APC en fases tempranas del desarrollo de CAC para sobreactivar esta ruta. Otros mediadores implicados en la mayor proliferación son IL6/STAT3, la liberación de factores de crecimiento como TGF β o factores que favorecen la angiogénesis como VEGFA. Otras citoquinas antiinflamatorias como IL10 o TGF β contribuyen a la evasión inmune del tumor [391].

Producción de alteraciones genéticas. Durante la respuesta inflamatoria, células inmunes (principalmente macrófagos y neutrófilos) e incluso IECs y la microbiota son capaces de producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden dañar el DNA (Esquema 9) [392], RNA, proteínas y lípidos. Como consecuencia, se producen alteraciones genéticas, inestabilidad genética y metilación aberrante. Se provocan así translocaciones, deleciones, amplificaciones de DNA o daño en los telómeros. La peroxidación de lípidos de membrana por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno genera aductos de DNA que derivan en mutaciones, frecuentemente en p53. Otro mecanismo adicional es que estos radicales libres inhiben los sistemas de reparación de bases desapareadas dando lugar a inestabilidad micorsatélite [387]. Además, el proceso inflamatorio favorece también la inducción de cambios epigenéticos. En primer lugar, porque citoquinas como IL6 o IL22 son capaces de estimular DNA-metiltransferasas como la DNMT1 y 3 [393, 394]. En segundo lugar, miRNAs que regulan genes esenciales en el transcurso de CAC, como APC, KRAS o SMAD4, pueden ser influenciados por la inflamación [395] (Esquema 9).

Protección de IECs pre-malignas frente a la apoptosis. La respuesta inflamatoria estimula la producción de citoquinas como TNF, IL1 o IL6 que activan los factores

de transcripción NF- κ B y STAT3 los cuales favorecen la expresión de genes anti-apoptóticos y de supervivencia. Al mismo tiempo, p53, esencial para inducir la apoptosis de células dañadas, sufre mutaciones al inicio del CAC. En resumen, la respuesta inflamatoria favorece la supervivencia de células pretumorales y tumorales [396, 397].

Así pues, se genera una presión evolutiva que favorece la supervivencia de células con mayores tasas de división y más resistentes a un entorno inflamatorio [398].



Esquema 9. Mecanismos que originan las alteraciones genéticas en el CAC[399].

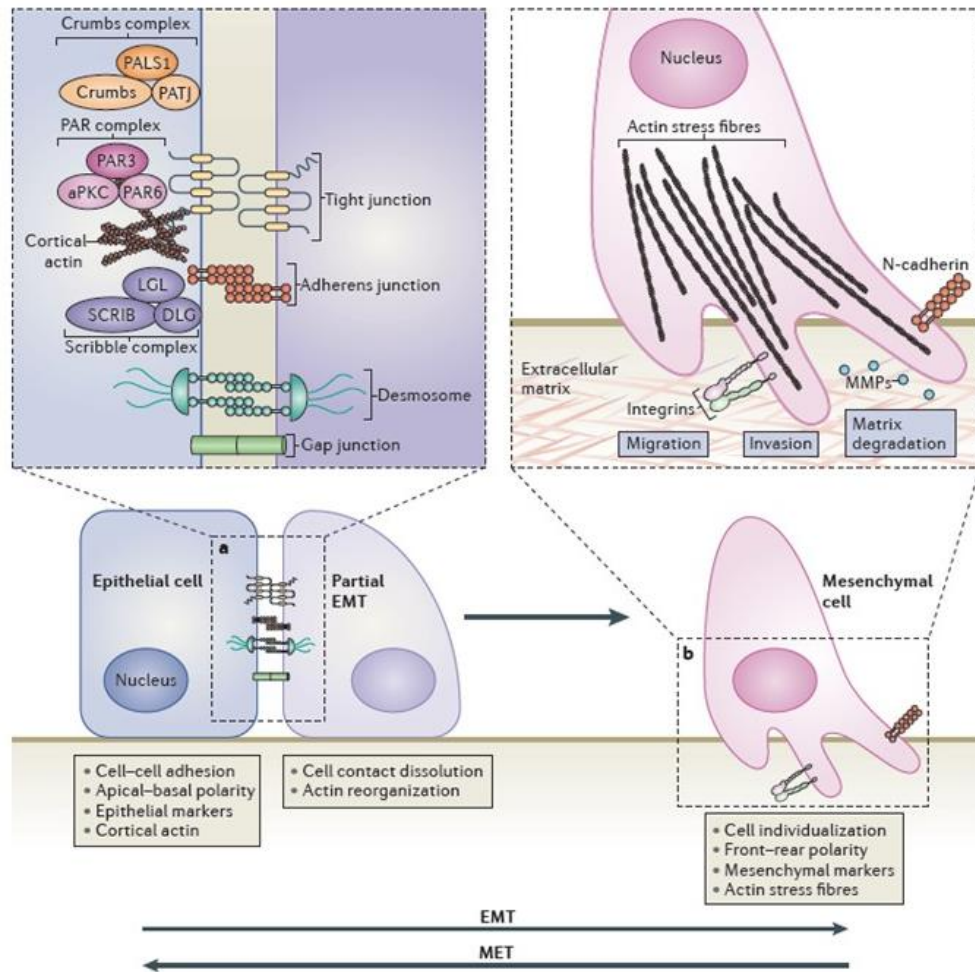
(1) Mutagénicos. (1a) Mutagénicos procedentes de la comida o producidos por la microbiota causan alteraciones genéticas o inducen enzimas como la espermina oxidasa (SMO) que genera especies reactivas de oxígeno (ROS). (1b) ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNI) liberadas por la microbiota o las células inmunes de la *lamina propria* causan la genotoxicidad. (2) La activación de diferentes rutas por la respuesta inflamatoria genera las alteraciones genéticas. (2a) Activación de ciertos factores de transcripción (TF) por citoquinas. (2b) Inducción de DNA-metiltransferasas (DNMT). (2c) Inducción de miRNA.

4.5 Promoción y progresión del CAC.

Tras el inicio del tumor, tiene lugar la promoción de éste, que consiste en el crecimiento y proliferación de un clon de células mutadas, mientras que la progresión, el siguiente paso, describe la fase en la cual el tumor se hace más agresivo.

Así pues, tras el inicio del tumor tiene lugar la transición epitelial a mesenquimal (EMT, *Epithelial Mesenchymal Transition*). Este proceso se caracteriza por la desdiferenciación de las IECs a células mesenquimales [400]. Tienen lugar varios acontecimientos (Esquema 10):

- Pérdida de la polaridad apical-basal.
- Disolución de las uniones intercelulares.
Se rompen las uniones estrechas debido una inhibición de la expresión de las claudinas y ocludina y a la menor presencia de ZO-1 en la membrana celular. También se desestabilizan las uniones adherentes: la E-cadherina es sustituida por N-cadherina, con menor afinidad por la β -catenina, la cual comienza a acumularse en el núcleo y que permite a la vez permite una mayor afinidad por células mesenquimales
- Reorganización del citoesqueleto hacia una forma más individualizada, móvil e invasiva.
Se produce debido a la inhibición de la expresión de citoqueratina y la mayor expresión de vimentina, filamento intermedio con menor afinidad por la E-cadherina y mayor por proteínas motoras.
- Habilidad para degradar la matrix extracelular.
Se incrementa la expresión de metaloproteasas (MMP), especialmente MMP2 y MMP9 que se encargan de la destrucción de la matriz extracelular, lo que favorece la invasión.
- Redefinición del conjunto de genes expresados.
Los principales factores de transcripción responsables de todos estos cambios son SNAIL1 y 2, TWIST y ZEB (*zinc-finger E-box-binding*) principalmente, los cuales se sobreexpresan en fases tempranas de la EMT.



Esquema 10. Transición epitelial a mesenquimal y viceversa [400].

4.6 Inmunidad y rutas proinflamatorias en el CAC.

4.6.1 TNF y NF- κ B.

Una de las citoquinas más importantes en la patología de la EII es TNF. Esta citoquina es liberada por células mieloides y células T ante estímulos inflamatorios. El TNF puede unirse a dos tipos de receptores distintos: TNFR1 y TNFR2. El primero, presente en células mieloides genera un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias y promueve la apoptosis, mientras que el segundo, ubicuo y por tanto presente en las IECs, favorece la supervivencia, mediante la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-X_L o BFL-1 y estimula la pérdida de las uniones estrechas y la liberación de citoquinas que promueven el avance del tumor (TNF, IL1 o IL6) [401]. En ambos casos, estas acciones se producen a través del factor de transcripción NF- κ B, clave en el CAC y la EII. Además de ser activado por TNF, otros estímulos como patógenos, daño al DNA o IL1 pueden hacerlo

también [402]. Además, la activación de NF- κ B por TNF, por la IL1 β segregada por macrófagos o la estimulación de TLR4 da lugar a la estabilización de β -catenina y su acumulación en el núcleo, ya que NF- κ B inactiva la GSK3, impidiendo la ubiquitinación de la β -catenina y su acumulación en el núcleo. Esto permite proteger a las células de la apoptosis derivada de la inflamación y permite la reepitelización. Sin embargo, la inflamación crónica deriva en una activación constante de ambas rutas que hacen posible el inicio del CAC [403]. Además, la acumulación de β -catenina genera una activación de la ruta no canónica de NF- κ B, dándose una comunicación cruzada entre ambas vías [383].

Otras acciones derivadas de la activación de NF- κ B son el incremento en la expresión de VEGF, que favorece la angiogénesis, y de MMP9, que contribuye a la metástasis.

4.6.2 IL6 y STAT3.

IL6 es otra citoquina clave en EII y CAC. Sus niveles en sangre se correlacionan con la severidad de la inflamación y el tamaño del tumor [404]. Durante el CAC, IL6 es producida principalmente por macrófagos infiltrados, células dendríticas, linfocitos T CD4+ y células cancerígenas. IL6 se unirá posteriormente a su receptor IL6R de membrana o al sIL6R (soluble) en el caso de células que carezcan del receptor de membrana. Cuando se une a este último se produce la llamada trans-señalización. La unión de IL6 a sus receptores genera una activación de las vías de señalización de STAT3/JAK, Ras/ERK y PI3K/AKT. IL6 parece tener un papel fundamental en el desarrollo del CAC, concretamente cuando se une al sIL6R, pues el estudio de Becker et al. [405] muestra cómo el bloqueo de este receptor suprime los tumores en el modelo murino de CAC inducido por azoximetano (AOM) y DSS. La activación de STAT3 por IL6 genera un aumento en la proliferación celular a través del aumento de expresión de ciclina D1 y PCNA en IECs. Por otro lado, también ocasiona una mayor supervivencia de las células tumorales y células T al estimular la expresión de Bcl-2 y Bcl-x.

Por último, la vía de STAT3 activa a su vez a la vía NF- κ B, amplificando así el crecimiento tumoral [401].

4.6.3 Ciclooxigenasa 2.

En el CAC se produce una activación aberrante de la ruta metabólica del ácido araquidónico como consecuencia de la respuesta inflamatoria y por tanto, de la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2). COX2 estimula la procarcinogénesis, promueve la angiogénesis e indirectamente incrementa la producción de radicales

libres [387]. Está demostrado que los inhibidores de la COX2, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), tienen efectos protectores frente al CRC [406]. La COX2, a través de la producción de prostaglandinas incrementa la expresión de BCL2 (antiapoptótico), CXCL1 (quimioquina con efectos angiogénicos), metaloproteasas y la ruta Wnt/ β -catenina a través de la Prostaglandina E₂ [401].

4.6.4 Linfocitos T.

El tejido neoplásico se encuentra infiltrado por múltiples tipos celulares inmunes, entre ellos, células CD4⁺, CD8⁺, linfocitos B, macrófagos o células NK. El equilibrio entre ellas puede hacer que se favorezca la supresión del tumor o bien el crecimiento de este.

Los linfocitos CD8⁺, células NK y la producción de IFN γ por las células Th1 participan en la actividad citotóxica contra las células cancerosas.

Por el contrario, la polarización hacia células Th17 se correlaciona con un peor pronóstico y un mayor crecimiento tumoral [407] [408].

La diferenciación de Th17 está estimulada por IL6 y TGF β al promover la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma\delta$. Este tipo celular es capaz de producir citoquinas de la familia IL17 (IL17A-IL17F), así como IL21 e IL22. Además, las células Th17 poseen IL23R (receptor de IL23), cuya estimulación, junto con la señalización de STAT3 estabiliza y expande la respuesta Th17[402].

Un aumento de señalización de Th17, de IL23R, así como una sobreexpresión de IL21 e IL22 está presente en pacientes con EII y CRC.

IL17A y IL17F pueden ser producidas por otros tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T $\gamma\delta$ o células NKT. Estudios en el modelo de CAC experimental inducido con AOM/DSS se demostró que IL17A promueve una mayor expresión de IL6, de STAT3, IFN γ , TNF, el crecimiento tumoral, la activación de la vía Wnt/ β -catenina, así como una inducción del ciclo celular a través de ciclina D1 [409]. Por el contrario, IL17F parece disminuir la expresión de VEGF y, por tanto, la angiogénesis, teniendo un papel protector [410].

En cuanto a la IL21, esta puede ser producida por otros tipos celulares distintos a las células Th17, aunque en menor medida. Las células epiteliales tienen receptores para IL21, (IL21R), cuya estimulación genera una activación de la vía de STAT3 principalmente, aunque también de NF- κ B, entre otros. En el modelo de AOM/DSS en ratones, se ha comprobado que la IL21 favorece la producción de IL6,

IL17A y la activación de STAT3. Se produce así un aumento de la proliferación epitelial, mayor supervivencia y mayor crecimiento tumoral [411] [412].

La IL22 tiene un conocido papel en la reepitelización y la reparación tisular [413]. Así pues, esta citoquina posee efectos tumorgénicos al incrementar la proliferación celular a través de la activación de STAT3 y la consiguiente sobreexpresión de ciclina D1 [414].

4.6.5 Microbiota.

La microbiota parece tener un papel fundamental en el desarrollo de CRC. Queda patente en los experimentos de Uronis et al. [415], que mostraron que ratones deficientes en IL10 en condiciones de esterilidad total a los que se les administró AOM no desarrollaron ni colitis ni CAC como aquellos crecidos en un ambiente normal [401].

No se sabe a ciencia cierta cuál es el mecanismo responsable. La disbiosis puede incrementar el grado de inflamación y posiblemente producir sustancias procarcinogénicas. *Bacteroides fragilis* y *Enterococcus faecalis* parecen ser dos cepas protumorgénicas. Además, la pérdida de FBI genera una invasión del adenoma por productos bacterianos, lo cual aumenta la producción de citoquinas protumorgénicas como IL17 o IL23.

Los receptores TLRs participan activamente en el desarrollo del CAC. La estimulación del receptor TLR4 promueve la tumorigénesis [416], probablemente a través de la activación de la respuesta Th17, mientras que TLR2 parece tener un papel protector en el CAC [10.1371/journal.pone.0013027](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013027). Es difícil de explicar, puesto que ambos actúan a través de MyD88.

Por último, la disbiosis generada por la deficiencia de NOD2 en ratones aumenta el riesgo de colitis y CAC. Es más, este riesgo pueden ser transmitido a ratones controles a través de la microbiota [399, 417].

4.6.6 Esteroidogénesis intestinal en el cáncer colorrectal.

Uno de los trabajos del doctor Brunner demuestra que las células cancerosas que componen los adenocarcinomas colónicos son capaces de producir de forma autónoma y constitutiva GC endógenos, a diferencia de la mucosa intestinal normal en condiciones basales. Los GC van a generar una evasión de la respuesta inmune citotóxica por parte del tumor debido a sus propiedades inmunosupresoras.

Por otro lado, LRH-1 induce de forma directa la proliferación debido a sus efectos sobre el ciclo celular al estimular de la ruta de la β -catenina y la consiguiente

expresión de ciclina D1, E1 y c-Myc. Además, en la neoplasia, la expresión de LRH-1 no se limita a las células en proliferación de las criptas, sino que lo expresan todas las células tumorales. Así pues, LRH-1 permite el desarrollo descontrolado del proceso neoplásico al mediar tanto la esteroidogénesis, como un estado basal hiperproliferativo mediante mecanismos independientes entre sí [418]. La importancia de LRH-1 en la neoplasia queda demostrada mediante el uso de ratones LRH-1^{+/-}, los cuales presentan menos tumores tanto en el modelo de AOM como en el de ratones Apc^{Min/+}F1. [419].

4.7 Glucocorticoides en el tratamiento del cáncer.

A diferencia de los genes que codifican otros receptores nucleares como el ER y el AR, el GR

no es considerado un oncogen. Es importante anotar que los GC son cruciales en el tratamiento de cánceres linfoides debido a su potente acción apoptótica y antiproliferativa en este tipo celular {Pufall, 2015 #3030}. Hay gran controversia sobre si los GC promueven o inhiben la progresión del cáncer no hematológico. Parece depender mucho del tipo de cáncer, de la dosis de GC y de la diferente expresión de GR [420]. En ciertos tipos de cáncer como el de mama tienen efectos beneficiosos, que se cree que se deben a una inhibición adrenocortical y a la interacción con el GR. Igual ocurre en el cáncer de próstata, debido a una disminución de la síntesis de andrógenos [421]. Se pone así de manifiesto la interacción del GR con otros receptores nucleares. Por otro lado, en cáncer de tipo gastrointestinal, su efecto es neutral y en cáncer de pulmón, perjudicial.

En cánceres no hematológicos, los GC se usan en combinación con el tratamiento antitumoral (quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia...) con el objetivo de paliar los síntomas de la enfermedad y reducir los efectos secundarios del resto de tratamientos [422]. Los GC incrementan el apetito, disminuyen la fatiga, los vómitos, la pérdida de peso y el dolor asociado a metástasis en hueso [420].

En el caso del CRC, las células tumorales expresan mucho menos GR que células procedentes de linfoma e incluso que el epitelio normal, pudiendo ser una de las causas de la diferente eficacia en el tratamiento entre ambos cánceres. La dexametasona tiene efectos apoptóticos y antiproliferativos en líneas tumorales de cáncer que expresan GR a través de su unión a GR y posterior inhibición de NF-κB.. Además, existe una correlación entre la expresión de GR y la diferenciación de células cáncer colónico [423]. Drebert et al. demuestran que los GC, concretamente la dexametasona, dificultan el crecimiento y la invasión del cáncer colorrectal de

forma indirecta al actuar sobre los fibroblastos asociados al cáncer. La dexametasona inhibe la producción de MMP2 y MMP9 por este tipo celular [422]. Otro de los mecanismos por los cuales los GC tienen efectos antitumorigénicos es debido a que inhiben la EMT derivada de la inducción de ROS por TGF β 1. Esto se ha demostrado usando dexametasona in vitro. Además, el mismo estudio revela que la dexametasona es incluso capaz de revertir la EMT al bloquear la inhibición de la expresión de E-cadherina por el factor de transcripción SNAIL1 [424].

Por el contrario, efectos perjudiciales de GC en el tratamiento del CRC también han sido puestos de manifiesto. Se ha demostrado que la dexametasona inhibe el efecto antitumoral de otros fármacos como 5-FU, cisplatino, gemcitabina o la radiación γ [425]. En el caso del cáncer de mama, se ha demostrado que los GC inducen quimioresistencia debido a que reducen la permeabilidad del tumor dificultando el contacto del fármaco con las células cancerosas [426].

4.8 Modelo experimental de CAC: Azoximetano/DSS.

El modelo experimental más usado para la inducción de CAC es la combinación de azoximetano (AOM) y DSS. Es un modelo de inducción química. Consiste en una única administración del pro-carcinogénico AOM y repetidos ciclos de DSS, normalmente tres.

El AOM en el hígado es metabolizado por el citocromo CYP2E1 a metilazoximetanol (MAM), el cual es capaz de adicionar grupos metilo al nucleótido de guanina resultando en la transición a adenosina. El MAM es excretado a través de la bilis y a continuación absorbido por el epitelio del colon dando lugar a mutagénesis. Los ciclos de DSS generan daño en el epitelio, inflamación y la subsecuente reepitelización, que además de acelerar el proceso de mutagénesis da lugar a displasia, primer paso en el desarrollo del CAC [427]. En este modelo se da una estimulación de la ruta Wnt/ β -catenina, una excesiva producción de IL6 y TNF que generan elevados niveles de *cMyc*, oncogen activador del ciclo celular [373].

5 Glucocorticoides y el entorno intestinal.

En este apartado se tendrá en cuenta el efecto de los GC en el contexto del estrés, de la inflamación, así como el efecto de la administración de GC exógenos.

5.1 Efectos sobre la función de barrera epitelial.

Es ampliamente conocido que los GC son capaces de modular la expresión y distribución de proteínas de uniones estrechas. El estudio de Boivin et al señala que, aunque los GC no tienen efectos directos sobre la función barrera de la línea celular Caco 2, sí que son capaces de prevenir el deterioro de la FBI causada por TNF al inhibir el incremento en la expresión de *myosin like chain kinase* (MLCK) inducido por esta citoquina [428]. Esto explicaría la normalización de la permeabilidad intestinal que sufren los pacientes de EC tras ser tratados con GC [429].

Sin embargo, nuestro grupo de investigación estudió el efecto de distintas dosis de budesonida como tratamiento de la colitis experimental en ratón. La budesonida, por escasa distribución sistémica, fue el GC de elección en dichos experimentos. Mediante inmunohistoquímica de bromodeoxiuridina se observó que la budesonida ejerció un papel inhibitorio de la proliferación en las IECs. Este efecto pudo observarse en la dosis de 12µg por ratón y día mediante una disminución de la expresión proteica de ciclina D1 y antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). La función barrera se vio afectada por la budesonida, aumentando la permeabilidad intestinal y disminuyendo la expresión proteica de claudina-2 y 4. Experimentos *in vitro* en IEC 4.1 revelaron que los GC inhiben la migración y la curación de herida, aún en presencia de IL22 y IL27, conocidos inductores proliferativos [430].

Curiosamente, los GC presentan otros efectos sobre las células epiteliales intestinales que se traducen en un refuerzo de la función de barrera, destacando un aumento de la expresión de TLR2 que facilita la respuesta reconstitutiva del epitelio ante una agresión [431] y una protección ante el estrés asociado a retículo endoplásmico [432].

El modo en que los GC contribuyen a la disfunción en la barrera epitelial intestinal continúa siendo objeto de gran controversia.

5.2 Efectos sobre el flujo hidroelectrolítico intestinal.

Los pacientes bajo estrés psíquico o físico muestran un aumento de la presencia de electrolitos y agua en la luz intestinal [197, 433]. Esto se debe a la reducción de los procesos de absorción iónica con un aumento de la secreción. Estos efectos aparecen en los diferentes segmentos intestinales e indistintamente asociados a los modelos de estrés agudo y crónico [434, 435]. Los efectos de la CRH directos sobre el epitelio intestinal, e independientes de la síntesis de GC, parecen los responsables

de estos efectos, ya que los antagonistas específicos de estos receptores, administrados intraperitonealmente corrigen las alteraciones antes mencionadas.

Se ha demostrado también que los GC, a través del GR del epitelio intestinal, estimulan la expresión de SGK1, NHE3 y SGLT1 provocando así una mayor absorción de glucosa y, por tanto, unos mayores niveles plasmáticos [128].

Dentro de la fisiopatología de la EII y los modelos de colitis experimental, la inhibición de los procesos de absorción y secreción iónica intestinal están directamente relacionadas con la inflamación, que se traduce en la acumulación de agua en la luz intestinal y en diarrea. Los GC contribuyen por tanto a la compensación de dicha disfunción epitelial asociada a la inflamación, no sólo mediante su acción antiinflamatoria, sino por su efecto directo sobre el transporte generando absorción electrogénica [436].

5.3 Efectos sobre la permeabilidad intestinal a antígenos bacterianos y otras macromoléculas.

En modelos de estrés experimental se observa un compromiso de la función de barrera y cierta inflamación intestinal, así como un incremento en la susceptibilidad en diferentes modelos de colitis experimental como el TNBS [437] y el DSS [200, 202, 438], estando estos últimos fenómenos relacionados en parte con un efecto estimulante de la CRH sobre los linfocitos de *lamina propria*.

Los mecanismos que relacionan el estrés con un intestino más permeable son básicamente dos. Por un lado, en el intestino de un animal sometido a estrés experimental se produce un aumento del número total de mastocitos y de su grado de desgranulación [439, 440]. La secreción del contenido granular de este tipo celular parece ser decisiva en el desarrollo de los cambios morfológicos, inflamatorios y de permeabilidad que se producen en el intestino de los animales estresados, ya que ratas deficientes en mastocitos sometidas a estrés no muestran dichas disfunciones. Este fenómeno es independiente de la acción de los GC endógenos, estando asociado en exclusiva a la acción de la CRH sobre los receptores CRHR1 y CRHR2 presentes en los mastocitos subepiteliales [198, 441]. Por otro lado, la barrera fisicoquímica de moco situada en contacto con el borde apical de las células epiteliales intestinales también se ve afectada. Por un lado la CRH promueve una depleción en el número de células caliciformes [442], al tiempo que los GC y la propia CRH inducen un aumento de expresión de mucinas y por tanto de secreción de moco por parte de las mismas [443]. A corto plazo, dicha estimulación funcional de las células caliciformes puede contribuir a la función de barrera epitelial

intestinal, pero se ha demostrado que en modelos de estrés más prolongados en el tiempo la reducción en su número genera un efecto opuesto que se traduce en un incremento de la adhesión bacteriana sobre el epitelio.

En general, la existencia de mucha más literatura describiendo la contribución de la CRH en las disfunciones intestinales asociadas al estrés, induce a pensar que ésta es la responsable casi en exclusiva de este fenómeno. Sin embargo, aunque más escasos, también hay estudios que revelan que la adrenalectomía o la inhibición farmacológica de la esteroidogénesis reduce significativamente la afectación intestinal asociada al estrés experimental [444]. Parece ser que la respuesta inflamatoria que se produce asociada al estrés se debe al aumento de permeabilidad intestinal derivado de la activación del eje HPA y del sistema nervioso simpático. Esto genera una mayor translocación de endotoxina procedente de la microbiota y la consecuente inflamación [445]. Además, la administración de GC a animales sanos produce síntomas intestinales que recuerdan a algunos de los ya mencionados, como el aumento de la adhesión bacteriana a la superficie epitelial y su tendencia a la translocación a tejidos extraintestinales [446, 447].

5.4 Microbiota, estrés y glucocorticoides.

La existencia de un eje biológico de comunicación bidireccional formado por la microbiota intestinal, el propio intestino y el cerebro comenzó a ser postulada con el hallazgo de la influencia de la presencia de bacterias en la luz intestinal sobre la gravedad de diversos modelos experimentales de estrés. En este sentido, los animales en esterilidad total sometidos a estrés sufren un incremento de los niveles de ACTH y corticosterona mucho mayor que aquellos estándar en términos microbiológicos y expresan menos GR y más CRH en el cortex. Además, el comportamiento de los animales axénicos en relación al estrés se normalizó al colonizarlos exclusivamente con *Bifidobacterium infantis* [448].

La influencia es bidireccional, ya que el estrés produce cambios cualitativos en la microbiota intestinal, que hacen más sensibles al animal a otros modelos experimentales de estrés y también a modelos de colitis de naturaleza infecciosa como la inducida por *Citrobacter rodentium* [449].

Con respecto a los GC exógenos, la administración de dexametasona exógena tiende a incrementar la proporción relativa de bacterias aerobias Gram (-), anaerobias totales y de lactobacilos [446, 447].

Por otro lado, la flora intestinal es capaz de metabolizar la corticosterona o cortisol dando lugar a intermediarios esteroideos con gran capacidad inhibitoria de

las enzimas 11β HSD1 y 2. La consecuencia más estudiada es que estos intermediarios son capaces de llegar al riñón a través de la circulación sistémica dando lugar a hipertensión, pues si la corticosterona o cortisol no son inactivados pueden estimular el MR [450].

5.5 Glucocorticoides en la inmunología intestinal.

Los GC sintetizados en la corteza suprarrenal, así como los producidos de forma local en tejidos como la mucosa intestinal, cerebro, epidermis o timo, juegan un papel clave en la regulación de la homeostasis inmunológica general y local. Los GC tienen principalmente efectos inmunosupresores en todos los tipos celulares inmunes. Sin embargo, su acción es dependiente de la dosis, el tiempo de exposición y el tipo celular en sí.

5.5.1 Efectos de los GC sobre células epiteliales.

Las células epiteliales en general, y las intestinales en particular, son diana para los GC desde el desarrollo embrionario y durante la edad adulta. En éstas, los GC favorecen la maduración del epitelio pulmonar, epidérmico e intestinal, no sólo durante el desarrollo embrionario, sino también durante las primeras semanas de vida [451-453]. Precisamente, de estos efectos derivan algunas de las aplicaciones clínicas que presentan los GC.

La administración de GC exógeno durante el desarrollo favorece la formación de la barrera epidérmica, relacionándolo con una inducción madurativa [454, 455]. Además, mediante el uso de ratones GR KO, *knock in* GR^{dim/dim} y con delección específica del GR en la epidermis, se ha mostrado que la epidermis de los ratones que no reciben GC durante su desarrollo muestra al nacer defectos graves en la función de barrera epitelial. Esta disfunción se acompaña de un estado inflamatorio basal e hiperproliferativo que los hace más sensibles a la inflamación cutánea inducida por exposición a detergentes. Cabe destacar que este efecto no es dependiente de un fenómeno de transactivación o represión clásica mediada por el GR, ya que los ratones GR^{dim/dim}, en los que no se da la homodimerización del GR no muestran alteración alguna si se les compara con un ratón no modificado genéticamente [58, 456].

Sin embargo, hay evidencias de un papel perjudicial de los GC sobre la homeostasis del epitelio intestinal o dérmico. La exposición de la epidermis completamente desarrollada y madura a GC provoca severas alteraciones en la homeostasis de este epitelio, que conllevan un aumento de la permeabilidad y una función de barrera comprometida [457].

5.5.2 Efectos sobre las células endoteliales.

Las células endoteliales son elementos muy relevantes en la inmunología intestinal, determinan la integridad de la red microvascular que irriga la mucosa intestinal y controlan en parte la extravasación leucocitaria hacia el foco inflamatorio. El promotor del gen de la ocludina contiene un GRE simple, de modo que cuando el GR activado por GC se une al mismo, se desencadena un fenómeno de transactivación [458]. Aunque ésta no es imprescindible para la formación de unas uniones estrechas bien desarrolladas a nivel estructural [459], la ocludina colabora en el adecuado ensamblaje de estas y en el control de la generación de poros [460, 461].

Las claudinas son proteínas que se integran dentro de la estructura de las uniones estrechas que regulan la función de barrera del endotelio vascular. Concretamente son las claudinas 1, 3, 5 y 12 las que se expresan en este tejido, siendo la claudina 5 la más importante en nuestro caso porque ejerce un papel positivo de cara a la función de barrera endotelial, reduciendo la permeabilidad paracelular. La expresión de claudina 5 se ve sustancialmente modificada por los GC [462-464].

La *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin) es el componente más importante de las *adherens junctions* (AJ), expresándose exclusivamente en el endotelio vascular, donde regula los procesos de adhesión mediados por Ca^{2+} [465]. El tratamiento de células vasculares endoteliales con dexametasona aumenta la expresión de VE-cadherin, aunque debe ser de forma indirecta pues el promotor de su gen carece de GRE [466]. Por tanto, globalmente los GC ejercen un papel beneficioso reduciendo la permeabilidad vascular [467].

Por otro lado, los GC reducen la extravasación leucocitaria en virtud de su capacidad para inhibir la expresión endotelial de proteínas de adhesión como *vascular cell adhesion 1* (VCA-1), *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1, 2, 3), E-selectina y P-selectina [468-470].

Aparte de los efectos de los GC sobre el endotelio, éstos inducen atrofia y una fragilidad en la microvasculatura del tejido óseo, piel y músculo esquelético [471-473].

Los GC tienen también efectos importantes en la angiogénesis. La angiogénesis es la creación de una nueva red vascular a partir de otra ya existente. Este proceso es fundamental en el desarrollo, la curación y también en el cáncer. Está estrechamente regulado en base al equilibrio de factores pro y antiangiogénicos. Durante la neoplasia, fibroblastos y macrófagos asociados al tumor liberan gran

cantidad de factores proangiogénicos como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y FGF (*fibroblast growth factor*), permitiendo un crecimiento descontrolado de la vasculatura que permite el aporte continuo de nutrientes y oxígeno. Los GC tienen efectos angiostáticos, aunque no se tiene claro el mecanismo, probablemente debido a mecanismos indirectos que generan la inhibición de la expresión de VEGF, metaloproteasas, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), IL1 α y β , entre otros y mecanismos directos que provocan la apoptosis de células endoteliales [474].

5.5.3 Efectos de los GC sobre células presentadoras de antígenos.

Células Dendríticas

Los GC inducen apoptosis en las células dendríticas que se encuentran en estado inmaduro, de un modo no dependiente de caspasas [475]. Sin embargo, no lo hacen sobre aquellas que ya están activadas por haber reconocido un PAMP o bien están recibiendo estimulación por parte de CD40L [476]. Los GC son capaces de inhibir la diferenciación y maduración de células dendríticas, a pesar de que son capaces de estimular la expresión de TLRs [477]. Los efectos sobre las células dendríticas activadas se caracterizan por una reducción en su recirculación hacia nódulos linfoides mesentéricos (MLN) [478], menor expresión de marcadores de activación como CD40, MHCII, CD80/86 y un perfil de producción de citoquinas atenuado [479, 480]. Además, el tratamiento con altas dosis de corticoides disminuye la concentración de células dendríticas en sangre periférica de los pacientes [477]. Todos estos efectos contribuyen a inducir un fenotipo tolerogénico en las células dendríticas, caracterizado por producción de IL10 e inducción de anergia en aquellas células T con las que establecen sinapsis inmunológica [481, 482]. Por tanto, no es extraño que existan estudios que revelan cómo la dexametasona contribuye en la inducción de este fenotipo tolerogénico. La co-transferencia de células dendríticas que recibieron dexametasona *ex vivo* además de vitamina D3 suprime el desarrollo del modelo de colitis por transferencia linfocitaria [483].

Macrófagos

A diferencia de otros tipos celulares como los neutrófilos, la inducción en la expresión de quimioatrayentes (*Ccl2* y *Cxcl11aa*) es independiente de GC. Sin embargo, son capaces de inhibir la diferenciación de macrófagos al fenotipo M1 o proinflamatorio [484]. Las respuestas celulares de los macrófagos, son dependientes de la unión PAMP a sus receptores PRR. Dado que la señalización intracelular de estos últimos es muy dependiente del eje NF- κ B/IRF3, el efecto inhibitorio de los GC

se ha achacado a la modulación por *tethering* de estos factores de transcripción [485]. De hecho, se asume que los macrófagos expuestos a GC tienen un comportamiento inmunosupresor caracterizado por una mayor producción de IL10, mayor expresión superficial de Gr1 y el receptor propio de “scavenger antiinflamatorios” CD163, así como una menor expresión de receptor de quimioquina (C-X3-C motif) ligando 1 (CX3CR1), que es un receptor de quimioquinas propio de monocitos inmunológicamente activados [486].

5.5.4 Efectos de los GC sobre los leucocitos polimorfonucleares.

Los efectos directos de los GC sobre los neutrófilos en un contexto inflamatorio se deben a una reducción de su extravasación e infiltración posterior en el tejido inflamado. Por un lado, los GC reducen la liberación de quimioquinas por parte de mastocitos y otras células mieloides, mientras que por el otro reducen la expresión de marcadores de “rolling” celular como *very late activation antigen 4* (VLA-4), *lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1) y *macrophage antigen 1* (MAC-1) en la superficie de los neutrófilos [468]. Independientemente de lo anterior, los GC curiosamente aumentan la producción de neutrófilos en la médula ósea y por tanto su presencia en el torrente sanguíneo, característica que es utilizada en la clínica para tratar la neutropenia en combinación con *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) [487].

5.5.5 Efectos sobre las células T.

En las células T periféricas se ha demostrado que una breve exposición a GC desorganiza el complejo multiproteico que utiliza el TCR para su señalización intracelular, probablemente debido a una interferencia cruzada de la proteína HSP90 y en todo caso independiente de un efecto del GR sobre la expresión génica [488, 489]. De hecho, existe un estudio que revela la necesidad del GR en estado quiescente en el citoplasma para una adecuada señalización del TCR, aunque otros investigadores han constatado señalización de TCR en ausencia de GR pudiendo explicarse dicho fenómeno por un mecanismo compensatorio [490].

De este modo, las células T CD4 Th1 ven reducida la acción de los factores de transcripción T-Bet y STAT4, así como la producción de citoquinas como IL2, TNF IFN γ . Las del subtipo Th2 sufren una reducción en la acción nuclear de moléculas como GATA3 y STAT6, así como de la producción de IL4, IL5 e IL13. Asimismo, las células Th17 ven reducido su número, ya que los GC inactivan STAT3 por un mecanismo de *tethering* y éste es imprescindible para la polarización hacia Th17 mediada por ROR γ t, efecto que se acompaña de una inhibición en la producción de

citoquinas como la IL17a o la IL22 en las células ya polarizadas [491]. En cambio, las células Treg sufren un aumento en su abundancia relativa como consecuencia de la exposición a GC. Esto parece estar relacionado con una menor sensibilidad de estas a la apoptosis inducida por GC comparado con los subtipos proinflamatorios, aunque también influye el hecho de que los GC inducen un fenotipo tolerogénico en las APC, lo que favorece la polarización preferencial de las células T vírgenes hacia este subtipo [492-494].

En los animales con la esteroidogénesis intestinal específicamente inhibida, las células T CD8 que forman parte de las poblaciones celulares descritas como IEL, o localizadas en la *lamina propria* o el GALT, presentan un estado basal de activación mayor monitorizada por un incremento en la producción de IFN γ [495].

6 Divergencias en la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides en función del sexo.

Es bien sabido que en múltiples enfermedades hay diferencias de prevalencia en función del sexo, convirtiéndose éste en un factor epidemiológico importante en muchos casos. Por ejemplo, las mujeres presentan mayor riesgo de sufrir enfermedades autoinmunes e inflamatorias como artritis reumatoide, esclerosis múltiple o lupus sistémico eritematoso, entre otras. Asimismo, también son más propensas a presentar enfermedades relacionadas con el estrés, como ansiedad, depresión o desórdenes alimenticios. Por el contrario, los hombres tienen mayor vulnerabilidad a enfermedades como esquizofrenia, autismo, síndrome de déficit de atención, Parkinson o cáncer hepatocelular. Las hormonas sexuales parecen tener un papel clave, pues durante el tercer trimestre de embarazo, cuando estrógenos y progesterona están en sus niveles más altos, las mujeres que sufren enfermedades inmunes suelen experimentar una mejora en su estado. Por otro lado, las pacientes de lupus eritematoso sistémico presentan un menor número de linfocitos Treg que los pacientes varones [496]. Es importante anotar que las células inmunes expresan tanto receptor de andrógenos como de estrógenos. Ante una inmunización, los ratones hembra son capaces de producir más anticuerpos, una mayor activación de linfocitos T, así como mayor producción de citoquinas Th1 [497]. En relación con la EII, y concretamente la EC experimental, Goodman et al. estudiaron la diferencia entre sexos en ratones SAMP1/YitFc (SAMP), los cuales desarrollan espontáneamente inflamación intestinal crónica. Las hembras SAMP presentaron la enfermedad antes que los machos y de forma más acusada. Según los autores, esto se debe a que las hembras tenían un menor número de linfocitos Treg en los GALT,

los cuales además presentaron menor actividad inmunosupresora. Por último, los linfocitos T procedentes de hembras respondieron en menor medida a la estimulación con agonistas de los receptores estrogénicos [498].

Los glucocorticoides son las principales hormonas antiinflamatorias y las desencadenantes de las consecuencias físicas del estrés, por tanto, es lógico pensar que existe una diferente regulación o sensibilidad a éstos en los dos sexos.

Las hormonas sexuales intervienen en múltiples procesos del desarrollo y los condicionan de distinta forma en función del género. De hecho, hay grandes interacciones entre el estrés, el sistema reproductivo y el inmune. Los GC inhiben la producción de hormonas sexuales a varios niveles: disminuyen la producción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), de hormona luteinizante (LH), de testosterona, estrógenos y progesterona. Además, al contrario que los GC, los estrógenos potencian la respuesta inflamatoria, en parte debido a que estimulan la liberación de CRH (con efectos proinflamatorios), mientras que los andrógenos inhiben la respuesta inflamatoria. Así pues, las hembras generan una respuesta inmune más potente, tanto celular como humoral, siendo más resistentes a padecer infecciones bacterianas como sepsis (aunque una vez instaurada la enfermedad, la mortalidad es igual o mayor en hembras debido a una respuesta inflamatoria descontrolada), mientras que son más vulnerables a enfermedades autoinmunes e inflamatorias [499, 500].

Duma et al. revelaron que había un cierto número de genes expresados de forma diferente en el hígado de ratas en machos y hembras. Curiosamente, la administración de GC incrementó en gran medida estas divergencias, siendo mayor el número de genes modulados en machos. Además, demuestran que los machos son más sensibles a la acción antiinflamatoria de la dexametasona ante la sepsis provocada por LPS. De hecho, esta menor mortalidad por la acción de GC en machos se sigue manteniendo, aunque de forma menos acentuada, tras la gonadectomía y la consecuente ausencia de hormonas sexuales [501], mostrando así que las éstas no son las únicas responsables de las divergencias entre sexos. La diferente susceptibilidad de los genes localizados en el cromosoma X podría tener gran influencia.

Queda patente así la interacción entre glucocorticoides, hormonas inflamatorias, estrés, inflamación y respuesta inmune.

OBJETIVOS

Con base en los experimentos anteriores realizados por nuestro laboratorio que muestran un papel determinante del GR en la homeostasis del epitelio intestinal, se formularon los siguientes objetivos:

1. Esclarecer las causas y consecuencias de la inflamación colónica transitoria debida a la ausencia del GR epitelial intestinal en condiciones basales.
2. Caracterizar en profundidad el papel dual del GR del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS.
3. Caracterizar la influencia del receptor NR3C1 del epitelio intestinal en la regulación de la esteroidogénesis sistémica e intestinal local, así como la consecuente modulación de la respuesta inflamatoria.
4. Estudiar el papel del GR epitelial intestinal en el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a colitis.

MATERIAL
Y
MÉTODOS

1 Reactivos.

Todos los reactivos empleados, excepto donde se indique lo contrario, han sido suministrados por MilliporeSigma® (Madrid, España).

2 Animales de experimentación y modelos animales.

Ratones C57BL/6J que presentan el gen que codifica el GR (*Nr3c1*) flanqueado por secuencias lox (B6.Cg-Nr3c1^{tm1.1Jda}/J), (*Nr3c1*^{loxp/loxp}) [502] fueron cruzados con ratones que expresan la enzima Cre recombinasa inducida por tamoxifeno bajo el control del promotor de la villina Tg (*Vil Cre/ERT2*) 23Syr (*Vil-Cre*) [503]. Los primeros fueron proporcionados por Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), mientras que los segundos fueron generosamente compartidos por la Dra. Sagrario Ortega (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), con permiso de la investigadora que originalmente los generó, Dra Sylvie Robine. Se obtuvieron así ratones B6-Cg-Nr3c1-VilCre/ERT2, a los que denominaremos NR3C1^{ΔIEC}.

La administración de tamoxifeno a estos animales genera la excisión específica de *Nr3c1* en enterocitos. Brevemente, la enzima recombinasa Cre, capaz de reconocer las secuencias lox, permanece secuestrada en el citoplasma en estado basal. En presencia de tamoxifeno, debido a que se encuentra unida a un receptor de estrógenos mutado, es capaz de entrar al núcleo y excindir el gen *Nr3c1*. Esto sólo ocurre en células del epitelio intestinal porque la expresión de la enzima Cre se encuentra bajo el control del promotor de la Villina [504].

Para obtener los animales utilizados en los experimentos de esta tesis, se cruzaron ratones *Nr3c1*^{loxp/loxp} con ratones NR3C1^{ΔIEC}, de forma que la descendencia que presentó la enzima CRE fueron NR3C1^{ΔIEC} y los que no, se utilizaron como controles, a los que denominaremos WT.

Los animales fueron mantenidos bajo estrictas condiciones libres de patógenos específicos en jaulas de Makrolon® sometidas a microventilación automática y a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad en la Unidad de Experimentación Animal (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Para su alimentación se empleó una dieta estándar para roedores (Harlan-Teklad 2014), y agua *ad libitum*, excepto en el caso del modelo de cáncer colorrectal o colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS). Dichos estudios *in vivo* han sido aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada y se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU.

2.1 Genotipado de los ratones NR3C1^{ΔIEC}.

Para la extracción de DNA se tomó una muestra de oreja de ratón con un punzón de 2 mm de diámetro y se introdujo en un tubo de 200 μ l. A continuación se añadieron 75 μ l de una solución 25mM NaOH y 0.2 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se sometió a 98°C durante 1 hora seguido de un enfriamiento rápido hasta 4°C. Posteriormente se equilibró el pH incorporando 75 μ l de Tris HCl 40 mM (pH 5.5).

El DNA extraído anteriormente sometió a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todos los casos se usó 2 μ l de DNA, 12.5 μ l de REExtract-N-AmpTM PCR ReadyMixTM y un volumen final de 25 μ l.

Para el genotipaje de ratones *Nr3c1*^{loxP/loxP}, la mezcla de PCR contenía los siguientes cebadores (0.6 μ M): cebador *Nr3c1* sentido 5'-ATG CCT GCT AGG CAA ATG AT-3' y cebador *Nr3c1* antisentido 3'-TTC CAG GGC TAT AGG AAG CA-5' que amplifican un fragmento del gen *Nr3c1* mutado de 300pb o normal de 247pb. El protocolo de PCR se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Protocolo de PCR para el genotipaje del gen *Nr3c1* flanqueado por secuencias lox.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	0:20	10 ciclos
65°C	0:15	
68°C	0:10	
94°C	0:15	28 ciclos
65°C	0:15	
72°C	0:10	
72°C	2:00	

Para el genotipaje de los ratones Vil-Cre la mezcla de PCR contenía los siguientes cebadores (0.5 μ M): un cebador del gen Cre sentido : 5'-ACT ATC CAG CAA CAT TTG GGC CAG-3', un cebador del gen Cre antisentido: 3'-GAT CCT GGC AAT TTC GGC TAT ACG-5' y dos cebadores correspondientes a un control interno a la misma concentración, siendo las secuencias de los cebadores sentido y antisentido las siguientes: 5'-CTA CAG CAT ACC TGC TTC ACT GTG-3' y 3'-GCC TTT CTG TGG GTT CCA-5'. Los cebadores del control interno amplifican un fragmento de

434pb, mientras que el fragmento de Cre contiene 282pb. El protocolo de PCR se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Protocolo de PCR para el genotipaje de la enzima Cre.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	5:00	
94° C	0:20	35 ciclos
55° C	0:30	
72° C	0:30	
72° C	10:00	

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1.8% en tampón TAE y se visualizó en transiluminador ultravioleta gracias a la incorporación en el gel de Midori Green (Nippon genetics, Japón)

2.1.1 Inducción de la delección del gen Nr3c1 en el epitelio intestinal.

La delección del gen fue inducida mediante la administración intraperitoneal de 100 µl de tamoxifeno (Molekula, Rimini, Italia) 10 mg/ml en etanol/aceite de girasol (1:10) durante 5 días consecutivos. Dicha solución fue recibida tanto por los ratones NR3C1^{ΔIEC} como por los WT.

2.2 Diseños experimentales de los experimentos realizados.

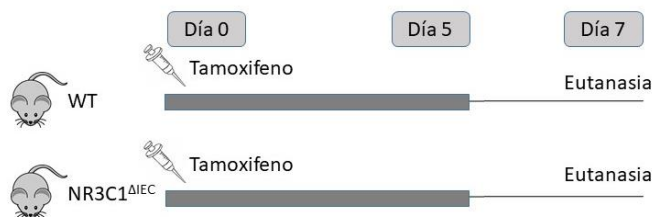
2.2.1 Diseño experimental de la caracterización en profundidad del fenotipo de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en estado basal.

Ratones WT o NR3C1^{ΔIEC}, con igual número de machos y hembras, recibieron tamoxifeno y a los 7 días desde la primera administración se procedió al sacrificio de los animales (Esquema 11, Apartado 2 de Resultados). Este experimento se repitió 3 veces debido a la incompatibilidad entre las distintas medidas.

En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, para el sacrificio los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una solución de ketamina (Ketamidol[®], Richter Pharma, Viena, Austria) y xilacina (Nerfasin, FATRO, Barcelona, España), preparados a una concentración de 24 mg/ml y 1,6 mg/ml respectivamente. Una vez perdido el reflejo plantar en los ratones, se procedió su exanguinación vía intracardiaca, y seguidamente se les practicó la dislocación cervical. Se extrajeron los órganos de los animales y, según

la finalidad de los mismos, fueron procesados en el momento o congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Todo ello será detallado en el apartado correspondiente.

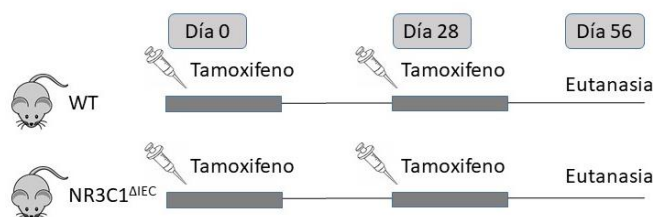
Para la obtención de las muestras de RNA que posteriormente fue secuenciado se usó un n=3 (Apartado 2.1 de Resultados). Para el análisis mediante citometría de los linfocitos intraepiteliales y lámina propia n=9 (Apartado 2.2 de Resultados). Para el estudio de la función barrera, n=6 (Apartado 2.3 de Resultados).



Esquema 11. Diseño experimental de la caracterización en profundidad del fenotipo de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en estado basal en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

2.2.2 Diseño experimental del estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en el epitelio intestinal a largo plazo.

El diseño experimental fue muy similar al anterior. Las variantes fueron que el sacrificio se produjo a las 8 semanas (56 días) y que a las 4 semanas se les administró de nuevo tamoxifeno durante 5 días consecutivos para asegurar la delección durante todo el proceso (Esquema 12, Apartado 2.4 de Resultados).



Esquema 12. Diseño experimental del estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en el epitelio intestinal a largo plazo en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

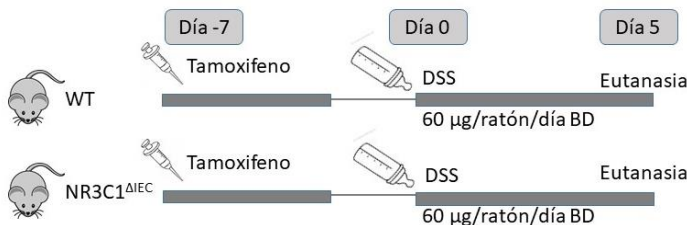
2.2.3 Diseño experimental para la caracterización del efecto de la delección de *Nr3c1* sobre la supervivencia de ratones.

En todos los experimentos de esta tesis doctoral en los que se induce colitis experimental, se hace usando DSS (MPBio, Santa Ana, CA, EEUU) al 2,5% (p/v) en agua de bebida [372].

En el experimento de supervivencia (Apartado 3.1 de Resultados), tras la administración de tamoxifeno, ratones macho WT y NR3C1^{ΔIEC} (n=10) fueron sometidos a 21 días de DSS, anotándose día a día las muertes. El día 21, todos los supervivientes fueron sacrificados.

2.2.4 Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en la respuesta a glucocorticoides durante la colitis experimental.

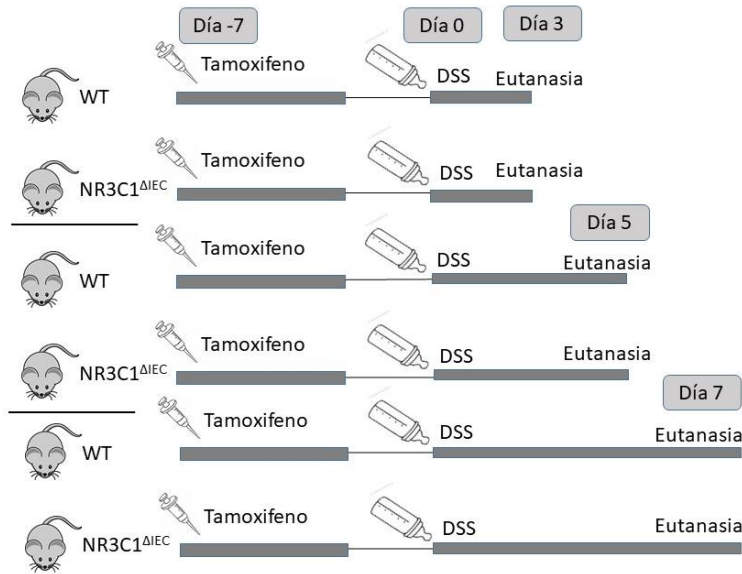
A ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, machos y hembras (n=10 de cada sexo) se les administró tamoxifeno. Al día 7 desde la primera inoculación se comenzó con la inducción de colitis experimental mediante DSS al 2,5%. Ese mismo día, los animales comenzaron a recibir diariamente 60 μg de budesonida (BD) (Molekula, Rimini, Italia) vía oral utilizando como vehículo metilcelulosa al 1%. (Esquema 13, Apartado 3.2 de Resultados).



Esquema 13. Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en la respuesta a glucocorticoides durante la colitis experimental en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

2.2.5 Diseño experimental en el estudio del efecto la delección de *Nr3c1* en la evolución de la colitis experimental.

Tras la administración de tamoxifeno, ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} (n=6-7) fueron sometidos a colitis experimental inducida por DSS al 2,5%. La eutanasia se produjo los días 3, 5 y 7 de DSS (Apartado 4.1 de Resultados, Esquema 14).

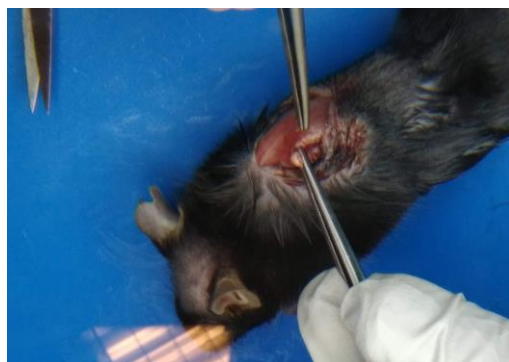


Esquema 14. Diseño experimental en el estudio del efecto la delección de *Nr3c1* en la evolución de la colitis experimental en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

2.2.6 Diseño experimental en el estudio de la esteroidogénesis local en ratones adrenalectomizados.

En este caso el diseño experimental fue 2x2, siendo las variables el genotipo (WT o NR3C1^{ΔIEC}) y la presencia o no de glándulas suprarrenales (n=7) (Esquema 16, Apartado 4.2 de Resultados). Se usaron igual número de machos y hembras.

En primer lugar, como es habitual, a los animales se les administró tamoxifeno. Posteriormente, fueron trasladados a la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neira. Al séptimo día tras la primera administración de tamoxifeno, los animales fueron divididos en dos grupos. Los del primero fueron sometidos a una doble adrenalectomía (ADX) (Esquema 15) realizada por la veterinaria Clara Sánchez González. A los del segundo grupo, se les hizo una pequeña hendidura en piel y la pared abdominal sin ningún tipo de resección (SHAM).

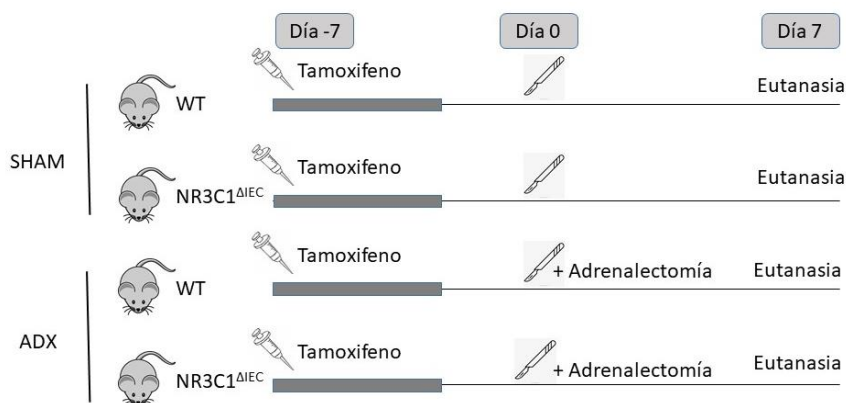


Esquema 15. Adrenalectomía.

La anestesia utilizada fue de nuevo una mezcla de ketamina/xilacina (100 mg/Kg y 10 mg/kg respectivamente) en PBS. En concreto, la adrenalectomía se llevo a cabo de la siguiente manera: cuando los ratones perdieron el reflejo plantar, se procedió a afeitar la parte dorsal, la cual posteriormente se esterilizó con clohexidina. A continuación, se hizo una hendidura en la piel a lo largo de la línea media dorsal. Posteriormente, la cavidad abdominal se abrió a uno y otro lado justo debajo de la última costilla para proceder a la extirpación de ambas glándulas. Utilizando unas pinzas, los adrenes se separaron del tejido colindante y se extrajeron. Por último, las hendiduras fueron cerradas con monofilamento de polipropileno reabsorbible (SURGIPRO) de 5-0, se aplicó clohexidina a la herida externa y se les administró suero salino (1 ml vía intraperitoneal), atipamezol (0.5 mg/kg vía intraperitoneal) para revertir los efectos sedantes y/o secundarios de la xilacina y meloxicam (2 mg/kg vía subcutánea) como analgesia. Hubo una mortalidad del 25%.

Tras la operación los animales fueron colocados sobre una manta eléctrica para evitar hipotermia y acelerar la recuperación. Una vez despiertos, se les administró un analgésico opioide, butorfanol (2 mg/kg vía subcutánea).

Durante los 4 días posteriores a la operación quirúrgica, tanto los animales del grupo ADX como los del SHAM recibieron meloxicam y/o butorfanol dependiendo de su estado. Como agua de bebida, los ratones ADX recibieron suero glucosalino (Cloruro sódico 0.9%, glucosa 2.5%) para mantener el balance de sodio y favorecer la recuperación. 7 días tras la operación quirúrgica, los animales fueron sacrificados.



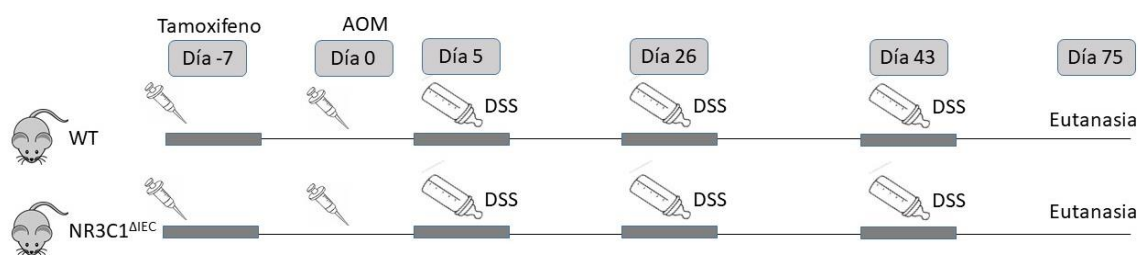
Esquema 16. Diseño experimental del estudio de la esteroidogénesis local en ratones adrenalectomizados.

2.2.7 Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en la inducción del cáncer colorrectal asociado a colitis.

Para la inducción de cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC) se utilizó el modelo de Azoximetano (AOM)/DSS [427].

En primer lugar, se administró tamoxifeno a ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, en igual número de machos y hembras (n=7-8). A continuación, se administró azoximetano 12mg/Kg vía intraperitoneal. A los 5 días, se comenzó con el primer ciclo de DSS al 2% (p/v) en agua de bebida durante 5 días. Tras ello, el DSS se sustituyó por agua durante 16 días. Este protocolo se volvió a repetir dos veces más. A los 75 días de la administración de AOM, los animales fueron sacrificados (Esquema 17, Apartado Figura 37 de Resultados).

Para garantizar la delección durante las más de 10 semanas de experimento, 1 semana después de retirar el DSS de cada ciclo, se administró tamoxifeno durante 3 días consecutivos.



Esquema 17. Diseño experimental para el estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* en la inducción del cáncer colorrectal asociado a colitis en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

La monitorización del estado de los animales fue similar a la realizada durante la colitis por DSS (ver Apartado 2.3.1).

2.3 Evaluación patológica de los modelos *in vivo*.

A continuación se indican las técnicas utilizadas en esta tesis doctoral para la evaluación de los distintos modelos. En el apartado de Resultados se indicarán las técnicas utilizadas de evaluación de cada diseño experimental.

2.3.1 Monitorización del estado de los ratones durante el desarrollo de colitis experimental inducida por DSS.

La monitorización del estado de los animales se realizó atendiendo a los criterios recogidos en el índice de daño de la enfermedad (DAI, *Disease Activity Index*) (Tabla

1). Del mismo modo, se realizó un seguimiento diario de la evolución del peso corporal, representado de forma relativa al peso inicial de cada animal.

Tabla 1. Criterios de valoración del índice de actividad de la enfermedad (DAI) asociado a la colitis por DSS.

Valor	Pérdida de Peso (%)	Consistencia de las heces	Sangre en heces
0	Ninguna	Normal	No
1	1-5	Blanda	No
2	5-10	Blanda	Hemocult positivo
3	10-15	Diarrea	Hemocult positivo
4	>15	Diarrea	Sangrado rectal

2.3.2 Evaluación macroscópica del daño intestinal.

Inmediatamente después de la muerte del animal, el colon fue extraído y fotografiado. Se limpió con solución salina para eliminar los restos de heces y se anotaron los valores de peso y longitud, sometiendo el órgano a un peso constante de 2 g. Una vez tomadas estas medidas se obtuvieron pequeños segmentos transversales de la zona distal destinados a la extracción de RNA e histología (conservados en RNA later y formalina al 4%, respectivamente). Posteriormente el colon fue abierto longitudinalmente. Para el cultivo del explantes se utilizó un punzón para biopsias de 3 mm de diámetro. El resto de tejido fue rápidamente congelado en nitrógeno líquido en distintas alícuotas, conservadas a -80°C hasta su posterior uso. En el caso del estudio del cáncer colorrectal, las muestras destinadas a la extracción de RNA, *western blot* y explantes se obtuvieron de zonas tumorales y zonas adyacentes y fueron procesadas de forma independiente.

2.4 Obtención del plasma.

La extracción de sangre se realizó vía intracardiaca en el momento del sacrificio de los animales. Se utilizó heparina de litio como anticoagulante (5000 UI/ml) y se depositó en tubos BD Microtainer PST LH. La sangre fue sometida a una centrifugación a 6000 g durante 10 minutos a 4°C para obtener el plasma. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su uso.

2.5 Obtención de explantes: cultivos *ex vivo*.

Con objeto de estudiar la producción de citoquinas del colon de ratón y de esa forma evaluar el grado de activación de determinados ejes pro/antiinflamatorios pro/antitumorígenicos, se cultivó un segmento del órgano de 3 mm de diámetro, siguiendo el siguiente protocolo. Para eliminar en la medida de lo posible microorganismos provenientes del lumen intestinal, los fragmentos fueron sumergidos durante al menos 15 minutos en una mezcla antimicrobiana preparada en tampón fosfato salino (PBS) con: anfotericina B (12.5 µg/ml), penicilina (500 U/ml), estreptomycin (0.5 mg/ml) y gentamicina (10 µg/ml). Seguidamente los fragmentos de tejido intestinal fueron sumergidos en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero bovino fetal (FBS) filtrado por carbón activo (10% v/v), L-glutamina (2 mM) y antimicrobianos: penicilina (100 U/ml), estreptomycin (0.1 mg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml) e incubados durante 24 horas en una atmósfera con el 5% de CO₂ y a 37°C.

Tras la incubación, el medio de cultivo fue centrifugado a 10000 rpm, 5 min a 4°C para eliminar restos de tejido y el sobrenadante fue conservado a -80°C hasta su uso para la determinación de citoquinas por ELISA.

2.6 Aislamiento de células intestinales epiteliales, linfocitos epiteliales y lámina propia.

Para la separación de células epiteliales intestinales (IECs), linfocitos intraepiteliales (IELs) y células inmunes de la *lamina propria* (LPMCs) se utilizó el método descrito por Neurath et al [505] con algunas modificaciones adaptadas por Mucida et al [506-508]. Brevemente, se limpiaron los fragmentos de intestino con PBS, diferenciando desde ahora intestino delgado y grueso, se escindieron las placas de Peyer, se abrieron longitudinalmente, se limpió en una solución de HBSS (*Hanks balanced salt solution*) y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.5cm. Los fragmentos se sometieron a 2 incubaciones sucesivas de 20 min a 37°C en HBSS con FBS 5%, Ditiotretol (DTT) 1mM y EDTA 5mM. Tras un percoll 80:40 (v/v), se obtuvieron las IECs y los IELs. Los fragmentos restantes, tras una homogeneización manual con tijera, fueron sometidos a una nueva incubación de 1 hora a 37°C con DNAsa I 0,1mg/ml y Liberase™ TL Reseach Grade, una mezcla de colagenasas. Un nuevo percoll 80:40 (v/v) permitió obtener las LPMCs.

2.7 Obtención de organoides de yeyuno de ratón: estudios *in vitro*:

El desarrollo de organoides es una técnica relativamente reciente. En ella, a partir de las células madre intestinales se generan unas estructuras tridimensionales que

contienen todos los tipos celulares existentes a nivel intestinal. Los organoides, que contienen estructuras tipo criptas y en las que el lumen se localiza hacia el interior, son considerados la mejor aproximación para el estudio del epitelio intestinal *in vitro*.

Para su obtención, tras sacrificar el ratón, el yeyuno se extrae y se limpia con PBS frío. A continuación, se abre longitudinalmente y se corta en fragmentos pequeños de aproximadamente 0,5 cm. Para completar el lavado, se pasan a un tubo de 15 ml con 5 ml de PBS, el cual se mantiene en agitación durante 5 minutos en frío. Transcurrido este tiempo, se retira el PBS y se añaden otros 10 ml de PBS con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración final de 2 mM. En este medio, los fragmentos se mantienen en agitación durante 30 minutos a 4°C. Tras la incubación, se dejan sedimentar los fragmentos de tejido antes de retirar el sobrenadante. El tejido sedimentado se resuspende en 10 ml de DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM, para, tras ello, realizar una agitación a mano durante 2 minutos. Este proceso es suficiente para extraer las criptas, en las que se encuentran las células madre. Después de filtrar a través de un filtro de 70 µm (Falcon®, 352350, Corning®), se procede a contar las criptas. Se sembrarán en unas pequeñas gotas de un volumen total de 50 µl, compuestas por un volumen igual de suspensión de criptas en medio (750 criptas por pocillo) y de Matrigel™ (Corning®). Las placas se introducen en el incubador durante 15 minutos, dado que a 37°C el matrigel va a solidificar. Una vez la gota es estable, se adicionan 500 µl de IntestiCult™ Organoid Growth Medium (STEMCELL®, Vancouver, Canadá). Los experimentos llevados a cabo sobre los organoides se realizaron tras dos pases y en el día 5-7 después de la siembra, tiempo suficiente para el completo desarrollo de los mismos.

Se obtuvieron organoides de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. Para garantizar la delección, el día después de la siembra de cada experimento, se adicionó tamoxifeno (1µM) durante 24 h a los organoides de ambos genotipos. Para estimular la respuesta inflamatoria, los organoides fueron tratados con TNF (10 ng/ml) (eBioscences®, San Diego, California, EE.UU.), FBS 5% y LPS (1µg/ml). Con el objetivo de inhibir la biosíntesis *de novo* de corticosterona, se añadió metirapona (200 µg/ml), un inhibidor del CYP11B1. Tras 4h de incubación el sobrenadante se conservó a -80°C para posteriormente medir la concentración de corticosterona y los organoides fueron procesados para la extracción de RNA.

3 Técnicas generales.

3.1 Citometría de flujo.

Para el análisis de la expresión de determinados marcadores celulares y ,por tanto, el estudio de la abundancia relativa de diferentes subpoblaciones celulares de carácter inmunológico en los ratones, se hizo uso de dos citómetros: un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences®, California EEUU) para el análisis de ganglios mesentéricos del experimento de AOM/DSS (Apartado 6.8 de Resultados) y FACS Aria™ III (BD Biosciences®, California EEUU) para el análisis de IELs y LPMC del Apartado 2.2 de Resultados.

3.1.1 Citometría de flujo en FACSCalibur™.

Las células fueron marcadas y preparadas para su análisis de la siguiente manera. Tras su obtención, fueron lavadas con tampón de marcaje para citometría de flujo: PBS, FBS 1 % (v/v), EDTA 0,5 mM, azida sódica 0.1% (p/v). Seguidamente, se les realizó el marcaje de moléculas superficiales mediante anticuerpos específicos, suministrados por BD Biosciences®, eBiosciences® (California, EEUU) o Miltenyi Biotec® (Bergisch Gladbach, Alemania). Los anticuerpos específicos se utilizaron en diluciones que oscilan entre 1:100 y 1:200 (v/v). En la misma solución de marcaje se incluyó mouse Fc-Block Anti-CD16/CD32 eBiosciences® a una dilución de 1:500 (v/v). Transcurridos 30 minutos de exposición a anticuerpos superficiales a 4°C, las células fueron lavadas y fijadas en PBS-paraformaldehído al 2 % (p/v) durante 10 minutos a 4°C. Tras lavar de nuevo, las células fueron resuspendidas en tampón de marcaje hasta su estudio en el citómetro.

En el caso del marcaje de forkhead box p-3 (Foxp3) de localización nuclear, una vez realizado el marcaje de moléculas superficiales, las células fueron permeabilizadas usando el kit específico de permeabilización nuclear (Foxp3 transcription factor fixation/permeabilization, eBiosciences®) y marcadas usando el anticuerpo PercP-Foxp3 (eBiosciences®) a una dilución de 1:150 (v/v) e incubados durante toda la noche a 4°C. Los datos arrojados por el citómetro de flujo fueron analizados mediante el software informático FlowJo (Tree Star, California, EEUU).

Los marcajes dos marcajes que se hicieron fueron: CD3-FITC, CD4-PE, Foxp3-PercP, CD8-APC y CD45-FITC, NK-PE, CD11c-PercP, CD19-APC.

3.1.2 Citometría de flujo en FACS Aria™ III.

La razón de usar este citómetro fue que dispone de más láseres y detectores, haciendo posible marcajes más complejos. El protocolo de tinción es el mismo que en el caso anterior, con la salvedad de que se incluyeron cuentas marcadas: CountBright™ Absolute Counting Beads (ThermoFisher, Waltham, MA, EEUU) con el objetivo de poder expresar los resultados de forma absoluta, y un marcador de la viabilidad celular, Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (ThermoFisher, Waltham, MA, EEUU).

Así pues, tras la obtención de las células, éstas se lavaron con PBS y se incubaron 30 min con Live/Dead™ Fixable Aqua Dead Cell Stain.

Posteriormente se siguió el protocolo del apartado anterior. Las cuentas marcadas se añadieron justo antes de pasar las muestras por el citómetro (10µl por muestra).

Los marcajes fueron los siguientes:

- Para IELs: CD4-FITC, TCR $\gamma\delta$ -PE, TCR β -PECy7, CD3 ϵ -PercPCy5, CD8 α -APC, CD45-APCeFluor 780, CD8 β -Super Bright 436.
- Para LPMCs: CD4-FITC, CD11b-PE, CD11c-PECy7, CD3 ϵ -PercPCy5.5, Ly6G-APC, CD45-APCeFluor 780, CD8 α -Super Bright 436.

3.2 Microscopía.

3.2.1 Estudio histológico.

Una de las secciones transversales de colon obtenidas tras el sacrificio fue conservada en formaldehído al 4% (p/v). A continuación, estas muestras se incluyeron en bloques de parafina para posteriormente realizar cortes de un grosor de 5 µm empleando un microtomo de parafina. Los cortes realizados fueron montados en portas y utilizados para inmunohistoquímica (IHC, *immunohistochemistry*) o sometidos a una tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H&E), que permite el estudio de la morfología, integridad y grado de infiltración del tejido objeto de estudio. Las imágenes estudiadas se capturaron con un microscopio Leica DMI3000 B, con un aumento 10x en todos los casos.

La evaluación del índice tumoral se hizo en base a tres parámetros: pérdida de la estructura y morfología epitelial (0-3), tamaño del tumor (0-3) y grado de invasión de éste (0=tumor relegado a la parte epitelial, 1= invasión de la *muscularis mucosa*, 2= invasión de la capa externa muscular).

3.2.2 Inmunohistoquímica.

Mediante IHC se detectó Ki67, un marcador de proliferación, empleando para ello anticuerpos específicos. En primer lugar, las muestras se desparafinaron y rehidrataron mediante incubaciones en xileno primero y, después, etanol a un porcentaje decreciente (99%, 90% y 70%). La recuperación antigénica se llevó a cabo exponiendo las secciones de tejido al tampón citrato sódico 10 mM (pH 6) durante 30 minutos a 100 °C. Una vez enfriados y lavados los cortes con TBS (Tris 50 mM y NaCl 0.15 M), las peroxidases endógenas se bloquearon con un tratamiento de H₂O₂ al 3% en metanol durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron bajo agua corriente y se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas empleando R.T.U. Animal Free Blocker™ and Diluent (VECTOR Laboratories® Burlingame, California, EE.UU.), que se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente y en humedad. A continuación, se añadió el anticuerpo primario, anti-Ki67 (1/400) (Cell Signaling Technology®, Massachusetts, EEUU) que fue incubado a 4 °C, de nuevo en atmósfera húmeda, durante toda la noche. Al día siguiente, las secciones se lavaron tres veces con TBS antes de incubarse con el anticuerpo secundario biotinilado provisto en Vectastain®ABC kit (VECTOR Laboratories®) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en humedad. Tras lavar de nuevo tres veces con TBS, se incubaron las secciones durante otros 30 minutos, en idénticas condiciones, con el complejo enzimático avidina/biotina de Vectastain®ABC kit (VECTOR Laboratories®). Finalizada la incubación y tras realizar 3 lavados en TBS y un último en agua destilada, las secciones fueron reveladas utilizando DAB+chromogen (1/50 en Substrate buffer) (DAKO Real™, Agilent®, Santa Clara, California, EE.UU.). Tras lavar con agua del grifo, se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina de Harris durante 3 segundos. Por último, las secciones son deshidratadas con etanol de creciente concentración y, finalmente, xileno antes de proceder a su montaje final. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Leica DMI3000 B con aumento de 10x.

3.2.3 Inmunofluorescencia.

Una sección de colon de cada ratón fue conservada en formaldehído al 4% (p/v) durante 4h. Posteriormente, fueron transferidas a una solución de sacarosa al 30% en PBS conservada en frío y a continuación incluidas en OCT para realizar cortes de 8 µm de grosor en el criostato. Los cortes fueron montados en portas y conservados a -20°C.

Para la tinción, los portas se atemperaron y se hidrataron en PBS. Después, permanecieron 30 min a 100°C en Tampón citrato 10mM pH6.0. Tras enfriarse

durante 20 min, se sometieron a una solución de Tritón-X al 0,1% en PBS durante 10 min. A continuación, tras 3 lavados en PBS, las muestras se bloquearon con suero de cabra (NGS) (R&D Systems Inc., Minneapolis, EEUU) y albúmina sérica bovina (BSA), ambos al 4% durante 30 min en atmósfera húmeda. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario: anti-ZO1 (Life Technologies®, Nueva York, EEUU) o anti-Occludin (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (1:1000) en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Tras 3 lavados con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 594 dirigido a conejo (1:2000) (ThermoFisher, Waltham, MA, EEUU) y 1h y 30 min en oscuridad y atmósfera húmeda. Tanto los anticuerpos primarios como secundario fueron diluidos en solución de bloqueo. Por último, se añadió DAPI (1,5 µg/ml) durante 10 min para teñir los núcleos antes de montar.

La solución de montaje usada fue Fluorescent Mounting Medium (Dako, Santa Clara, CA, EEUU).

Las fotografías fueron tomadas con el microscopio confocal Espectral de Alta Velocidad y Multifotón Leica TCS-SP5 II con el objetivo de 40x y un zoom de 5,10x o bien 2,10x.

A continuación se evaluó la cantidad y posición en el epitelio de ZO-1 y occludina a simple ciego.

3.3 Estudio de la permeabilidad intestinal.

3.3.1 Estudio de la permeabilidad intestinal a ovoalbúmina.

Plasma de ratones que 5 horas antes del sacrificio habían recibido 100µg de ovoalbúmina vía oral fue analizado mediante ELISA (Abyntek Biopharma, Derio, España) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.3.2 Estudio de la permeabilidad paracelular en tejido colónico distal *ex vivo*.

El ensayo de permeabilidad *ex vivo* se realizó tomando una pieza de aproximadamente 0.5 cm de colon distal de ratón que se sumergió en solución Ringer fría (en mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 2.4 K₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, y 10 glucosa). Se hicieron montajes de tejido intacto sobre cámaras de Ussing con dispositivos de voltaje DVC-1000 (World Precision Instruments, Aston, United Kingdom). Transcurridos 10-15 minutos del montaje del tejido se consiguió la estabilización de los valores de I_{sc} (I₀) y conductancia (G₀). A continuación se añadió carbacol (300 µM), agonista colinérgico que actúa como secretagogo, anotándose la respuesta de I_{sc} del tejido colónico. Así mismo, se añadió FITC-Dextrano (3mg/ml) a la zona apical para después tomar muestras de la zona

basolateral en tiempo 0, 30, 50 y 70 min con el objetivo de medir la fluorescencia en ellas mediante el fluorímetro POLAStar Optima®.

3.4 Determinación de haptoglobina plasmática.

La haptoglobina plasmática se determinó mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (R&D Systems Inc., Minneapolis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Determinación de corticosterona.

La concentración de corticosterona plasmática o en explantes fue determinada mediante ELISA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY), mientras que la medida de corticosterona en el sobrenadante de organoides se hizo usando el kit de ELISA procedente de R&D Systems Inc. (Minneapolis, EEUU). En ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6 Determinación de la producción de citoquinas por análisis Multiplex®.

En el sobrenadante obtenido de los explantes de colon se determinó la concentración de distintos mediadores proteicos secretados por el colon haciendo uso de un kit Luminex Mouse Magnetic Assay® (R&D Systems®, Minneapolis, MN) de 7 analitos: TNF, IL6, MMP2, MMP3, MMP8, VEGF y TIMP-1 y otro de 1 analito, MMP9, debido a la incompatibilidad entre ellos. La lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation).

3.7 Estudio de la expresión proteica mediante *Western blot*.

3.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas para análisis por *Western blot*.

El tejido objeto de estudio fue sometido a homogenización mecánica en tampón de lisis RIPA frío compuesto por dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1%, desoxicolato sódico 0.1% y Tritón X-100 1% en PBS, conteniendo un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, P8340) en una proporción de 1:200 (v/v) así como de fosfatasas (SC-45045, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, EEUU) en una proporción de 1:100 (v/v). Seguidamente el homogenado se expuso a ultrasonidos para forzar la completa lisis celular y finalmente se sometió a centrifugación a 9520xg, 10 min y a 4°C con objeto de eliminar los restos celulares. En el sobrenadante obtenido tras la centrifugación se determinó la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinónico [509], empleando BSA como estándar.

3.7.2 *Western blot.*

Las muestras obtenidas mediante el procedimiento anterior fueron mezcladas en la proporción adecuada con el tampón de carga comercial 4X suministrado por BioRad® (Hércules, CA, EEUU) y calentadas a 95°C durante 5 minutos. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de gradiente de concentración de acrilamida comprendido entre 4-16%, éstas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.25 µm (BioRad®). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando para ello leche en polvo desnatada al 5% en TBS-T (Tris 50mM, NaCl 0.15 M y Tween-20 1% (v/v)). A continuación, la membrana fue expuesta al anticuerpo primario específico durante toda la noche a 4°C en agitación. Los anticuerpos y las diluciones (v/v) empleados fueron: actina (1:1000) de Hybridoma Bank (Iowa, EEUU); PCNA (1:1000) de la casa BD Biosciences® (California, EEUU); GR (1:1000), pGR (1:1000), pSTAT3 (1:2000), STAT3 (1:1000), Ciclina D1 (1:1000), ERK (1000), pERK (1:1000), AKT (1:2000), pAKT (1:2000), SMAD2/3 (1:1000), pSMAD2/3 (1:1000), Caspasa 3 (1:1000), β-catenina (1:4000), pβ-catenina (1:4000), MLC2 (1:1000) y pMLC2 (1:1000) de Cell Signaling Technology® (Massachusetts, EEUU) y S100A9 de R&D Systems® (Minneapolis, MN). Todos estos anticuerpos fueron diluidos en TBS-T con albúmina sérica bovina al 5% (p/v). Como control de carga genérico se usó la expresión de actina, excepto en aquellos casos en los que se hace una relación directa entre la expresión de la proteína fosforilada y la de la proteína total. Las membranas fueron posteriormente expuestas durante 60 minutos al anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, de la especie apropiada según el anticuerpo primario empleado. Las bandas fueron detectadas usando un reactivo generador de quimioluminiscencia suministrado por Perkin Elmer, Life Sciences (Boston, MA, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el software Image J.

3.8 Estudio de la expresión génica.

3.8.1 Extracción de RNA.

El RNA total se obtuvo usando RNeasy Mini Kit (Qiagen®, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la extracción de RNA de organoides se utilizó QIAzol Lysis Reagent (Qiagen®, California, EEUU), siguiendo igualmente las instrucciones del fabricante. La cuantificación de RNA de las distintas muestras se realizó usando un Nanodrop® (Thermo Scientific) considerando asimismo la relación 260 nm/280 nm con el fin de estimar la pureza e integridad del ácido nucleico.

3.8.2 Reacción de retrotranscripción.

Una cantidad total de 1 µg de RNA por muestra fue retrotranscrito para la obtención del DNA complementario, utilizando transcriptasa inversa según las indicaciones del fabricante del kit (iScript Select cDNA Synthesis Kit, Biorad Laboratories®, California, EEUU). El DNA complementario se mantuvo congelado a -20°C hasta su uso, mientras que el RNA restante se conservó a -80°C.

3.8.3 Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Sybr Green como fluoróforo (GoTaq®qPCR Supermix, Promega®, Madison, WI, EEUU) para el análisis de la expresión de diversos genes. Los genes de referencia elegidos fueron generalmente la subunidad 18S del RNA ribosómico (*18s*), hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (*Hprt*) y peptidil-prolil cis-trans isomerasa B (*Ppib*) siendo generalmente el promedio de su expresión empleado como control de carga en los distintos experimentos. Los cebadores empleados en cada caso vienen detallados en la Tabla 2 .

3.8.4 RNAseq.

El RNA obtenido de muestras enriquecidas en IECs (n=3) de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a 7 días postdelección (n=3) fueron analizadas mediante una secuenciación completa (RNAseq). Se realizó en colaboración con el CIC bioGUNE. El control de calidad de las muestras secuenciadas se hizo usando el *software* FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las diferentes lecturas fueron contrastadas con el genoma de referencia de ratón (*mm10*) mediante el programa *Tophat* [510]. Los alineamientos *BAM* obtenidos de cada muestra fueron transformados en una tabla de lecturas en bruto (*raw counts*) a través de la función *summarize Overlaps* (en modo unión) del bioconductor *GenomicAlignments* [511]. La tabla de lecturas obtenida fue usada para el análisis de expresión diferencial, llevado a cabo por *DESeq2* [512], para distinguir los genes expresados de forma diferente en función de las diferentes condiciones, en este caso la presencia o ausencia del GR del epitelio intestinal. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático con la plataforma PANTHER-GO [513]. El conjunto de datos está disponible en GSE126366.

4 Análisis estadístico.

Todos los resultados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (SEM). Para determinar la significación estadística, se utilizó, según el caso, un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) y un test de significación *a posteriori* (Fisher LSD). En caso de comparación de muestras apareadas se utilizó el análisis t-Student. En el análisis estadístico de las curvas de supervivencia se usó el test de Mantel-Cox. La significancia estadística se consideró para un valor de $P < 0.05$. El análisis estadístico descrito se realizó mediante GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Gen	Hebra sentido 5'-3'	Hebra sentido 3'-5'
<i>18s</i>	TGGTGGAGCGATTTGTCTGG	ACGCTGAGCCAGTCAGTGTACG
<i>Birc5</i>	TAGAGGAGCATAGAAAGCAC	CTCTTTTGTCTTGTGTTGG
<i>Ccl2</i>	CAAGATGATCCCAATGAGTAG	TGGTGACAAAACTACAGC
<i>Ccnd1</i>	GTCCTACTGTTGCGGCITG	GCAGACGCCTCTTGGGTCTACAATA
<i>Cdh1</i>	CATGTTCACTGTCAATAGGG	GTGTATGTAGGGTAACTCTCTC
<i>Cxcl1</i>	CCGAAGTCATAGCCCACTCAAG	ACCAGACAGGTGCCATCAGAG
<i>Cyp11a1</i>	CAGCTGCCTGGGATGTGATTT	ACCAGGGTACTGGCTGAAGT
<i>Cyp11b1</i>	CATTTTCAGGCACAGTGTAG	CTCTATGGACTATCCAGGATTC
<i>Defa1</i>	GTCCTACTCTTTGCCCTTG	GCAGCCTCTTGATCTACAATA
<i>Egfr1</i>	CTGTCGCAAAGTTTGTAATG	GAATTTCTAGTTCTCGTGGG
<i>Esr1</i>	GTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	CCGTGTGCAATGACTATGCC
<i>Esr2</i>	GGAATCTCTTCCCAGCAGCA	GGGACCACATTTTTGCACTT
<i>Hp</i>	ATGGACTTTGAAGATGACAG	GTAGTCTGTAGAACTGTCCG
<i>Hprt</i>	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG
<i>Hsd11b1</i>	CTCATAGACACAGAAACAGC	TCAAAGGCGATTTGTCATAG
<i>Hsd11b2</i>	CAATAGCACTGCTTATGGAC	CATTAGTCACTGCATCTGTC
<i>Ifng</i>	TGAGTATTGCCAAGTTTGAG	CTTATTGGGACAATCTCTTCC
<i>Il10</i>	CAGGACTTTAAGGGTACTTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
<i>Il6</i>	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
<i>Lgr5</i>	AGAACACTGACTTTGAATGG	CACTTGGAGATTAGGTAAGT
<i>Mmp8</i>	AACTATGGATTCCCAAGGAG	CTTTGATTGTCATATCTCCAGC
<i>Mmp9</i>	CTCCAGTACCAAGACAAAG	ACCTTGTTACCTCATTG

<i>Myc</i>	TTTTGTCTATTTGGGGACAG	CATAGTTCCTGTTGGTGAAG
<i>Nr3c1</i>	CTTCTCTCCTCAGTTCCTAAG	CCAATTCTGACTGGAGTTTC
<i>Nr3c4</i>	GGCGGTCCTTCACTAATGTCAACT	GAGACTTGTGCATGCGGTACTCAT
<i>Nr5a2</i>	TTGAGTGGGCCAGGAGTAGT	ACGCGACTTCTGTGTGTGAG
<i>Pla2g2a</i>	CAAGAAACCATAACCACCATC	TCTTAAGCCGAATCATTTC
<i>Ppib</i>	CAAATCCTTTCTCTCCTGTAG	TGGAGATGAATCTGTAGGAC
<i>Ptgs2</i>	AGTCAAAGACACTCAGGTAGA	GAGTCTGCTGGTTTGGAAATAG
<i>Reg3g</i>	CAGAGGTGGATGGGAGTGGAG	CACAGTGATTGCCTGAGGAAGAGA
<i>S100a8</i>	GCCCTCTACAAGAATGACTTCAAG	ATCACCATCGCAAGGAACTCC
<i>S100a9</i>	CTTTAGCCTTGAGCAAGAAG	TCCTTCCTAGAGTATTGATGG
<i>Smad7</i>	CTCTGTGAACTAGAGTCTCC	GAAGTTGGGAATCTGAAAGC
<i>Snai1</i>	AGTTGACTACCGACCTTG	AAGGTGAACTCCACACAC
<i>Snai2</i>	GACACATTAGAACTCACACTG	GACATTCTGGAGAAGGTTTTG
<i>Star</i>	GCGGAATATGAAAGGATTAAGG	GTCACTATAGAGTGTTGCTTC
<i>Tff3</i>	TATCAGTCGGATCGAGGCTATG	AGGTACCGATCCCATCTGTGT
<i>Tgfb1</i>	CCCTATTTAAGAACACCC	AAGGTGTCTCAGTATAACCAC
<i>Tjp1</i>	GGGGCCTACACTGATCAAGA	TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
<i>Tnf</i>	CGTGGAAGTGGCAGAAGAGG	CAGGAATGAGAAGAGGCTGAGAC
<i>Tsc22d3</i>	CAAGCTGAACAACATAATGC	GCTCAATCTTGTGTCTAGG
<i>Vegfa</i>	TAGAGTACATCTTCAAGCCG	TCTTTCTTTGGTCTGCATTC
<i>Vim</i>	GAACCTGAGAGAACTAACC	GATGCTGAGAAGTCTCATTG

RESULTADOS

1 Resultados previos.

1.1 Antecedentes y generación de ratones NR3C1^{ΔIEC}.

El origen de esta tesis doctoral se encuentra en estudios previos realizados por nuestro equipo en los que se demuestra una acción dual de la BD como tratamiento en la colitis inducida por DSS en ratones [430], datos más ampliamente recogidos en la tesis de Carlos J. Aranda Clemente. Por un lado, la BD tiene un efecto antiinflamatorio sobre la colitis, reflejado en parámetros como la actividad mieloperoxidasa colónica o la producción de IL6 por explantes de este mismo tejido, los cuales se ven claramente disminuidos. Sin embargo, al mismo tiempo la BD produce un empeoramiento del estado general de los animales. Éste se debe principalmente, por un lado, a que este corticoide debilita la función barrera intestinal y la reepitelización debido a sus efectos antiproliferativos y, por otro lado, a su acción inmunosupresora. En definitiva, se favorece la aparición de sepsis y se produce un aumento de la mortalidad.

Nuestra hipótesis es que estos efectos perjudiciales se producen en gran medida debido a la acción de la BD sobre el epitelio intestinal. Para comprobarlo, nuestro laboratorio generó los ratones NR3C1^{ΔIEC} que, como se ha explicado en Material y Métodos, tienen una delección condicional y específica del GR en el epitelio intestinal, inducida tras la administración de tamoxifeno por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos.

En el año 2012 Reichardt et al. ya generaron ratones con delección específica del GR en el epitelio intestinal [128]. En su caso fue una delección constitutiva, con el objetivo de estudiar el papel del GR epitelial en el transporte de glucosa por los enterocitos. En nuestro caso, decidimos que la delección fuese inducible para evitar los posibles efectos del GR en el desarrollo epitelial, así como posibles compensaciones a largo plazo que enmascarasen el efecto de la delección (ver Discusión).

1.2 Caracterización del fenotipo NR3C1^{ΔIEC}.

Los resultados de la caracterización del fenotipo NR3C1^{ΔIEC} en estado basal se incluyen en el artículo que acompaña esta tesis. Además, también están recogidos en parte en la tesis de Carlos J. Aranda, junto con el estudio del papel del GR en la colitis inducida por DSS. El objetivo de este apartado es hacer un breve resumen como introducción a los resultados de esta tesis doctoral.

En primer lugar, se comprobó que la delección tiene lugar y que es específica. Para ello, se analizó la expresión proteica de GR en el epitelio intestinal, así como en otros órganos, en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 (D7) y 14 días (D14) de la primera dosis de tamoxifeno. La elección de estos tiempos se debió a que el tratamiento con DSS para generar colitis normalmente suele ser 7 días. Como se puede ver en la Figura 1, hay una pérdida casi total de GR en células del epitelio intestinal de ratones NR3C1^{ΔIEC} con respecto a animales WT, mientras que en otros órganos como riñón, bazo, hígado, pulmón o corazón no se produce este fenómeno.

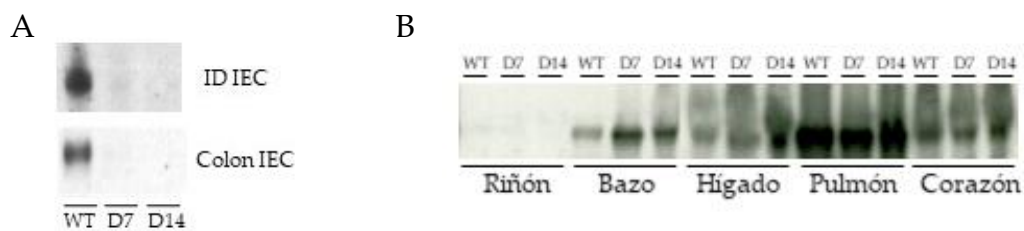


Figura 1. A. Expresión proteica de GR medida por Western Blot en IECs aisladas de intestino delgado (ID) y colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 días (D7) y 14 días (D14) desde la primera administración de tamoxifeno. B. Expresión proteica de GR en distintos órganos en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} (D7 y D14).

Posteriormente, se procedió a caracterizar el efecto de la deficiencia de GR epitelial en la homeostasis intestinal. Sorprendentemente, a los 7 días de la pérdida del receptor los ratones NR3C1^{ΔIEC} experimentan inflamación intestinal, más concretamente colónica. Esta inflamación es visible macroscópicamente sólo en algunos de los animales: 2 de 8 estudiados inicialmente presentaban claros signos de inflamación, 3 de 8 un menor grado inflamatorio y los tres restantes eran indistinguibles de colonos WT (Figura 2 A). Sin embargo, del grupo D14 no se observó ningún signo claro de inflamación. A nivel bioquímico, los datos eran mucho más homogéneos.

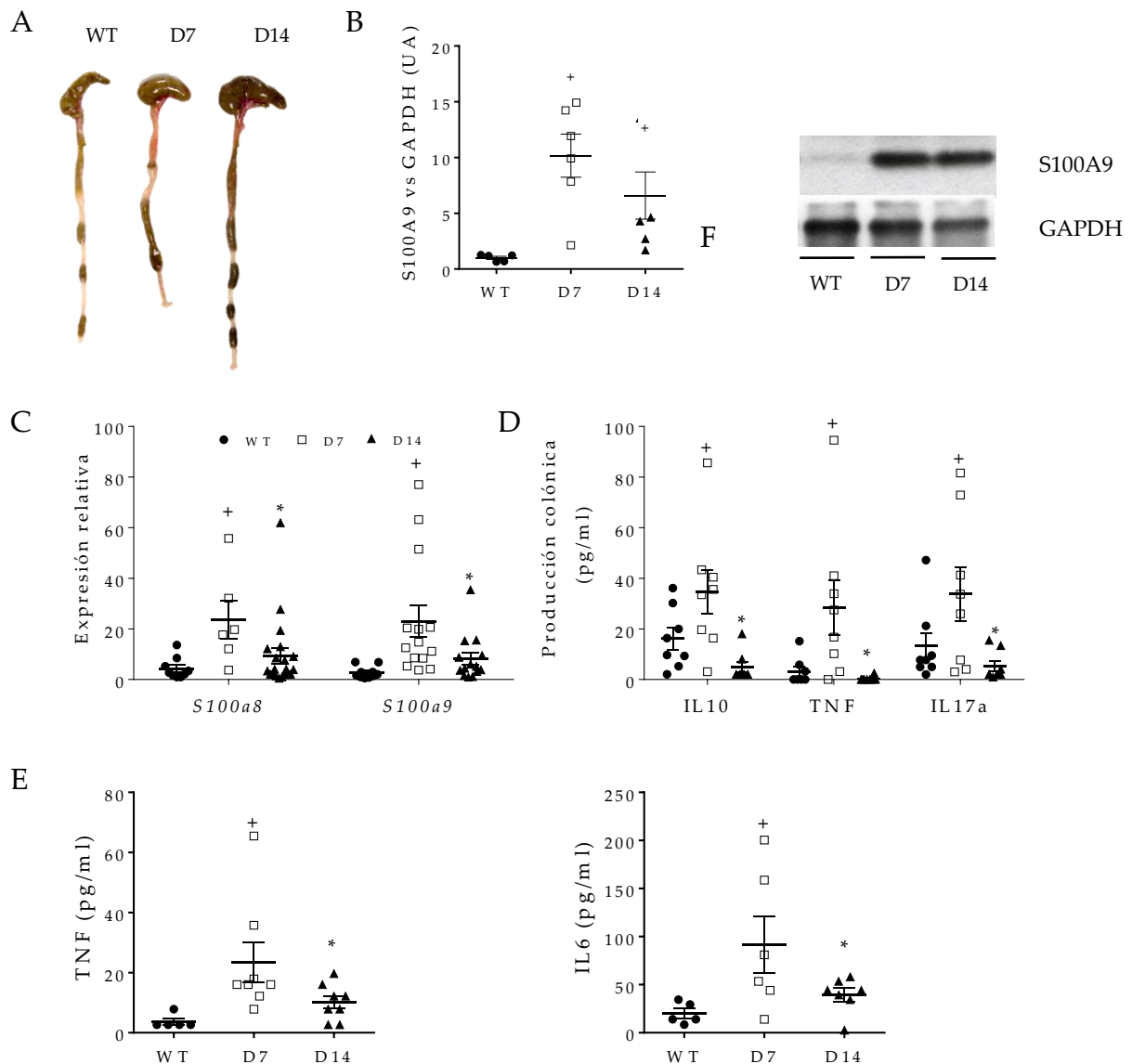


Figura 2. Caracterización del fenotipo NR3C1^{ΔIEC} en estado basal. A. Fotografías representativas del colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los 7 (D7) y 14 (D14) días del inicio de la administración de tamoxifeno. B. Expresión proteica de S100A9 y GAPDH como control de carga medida mediante western blot en IECs aisladas de colon de WT, D7 y D14 (n=5). C. Expresión génica de *S100a8* y *S100a9* en colon de ratón medido por RT-qPCR. Datos representativos de dos experimentos (n=8) *18s* y *Ppib* fueron usados como genes de referencia. D. Producción de IL10, TNF y IL17a por explantes de colon de ratones WT, D7 y D14 mediante kit ProcartaPlex® (Affimetrix, eBioscience, Inc.). La lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation). Los explantes fueron cultivados durante 24 horas en medio carente de GC. E. Medida de IL6 y TNF en plasma de ratones WT, D7 y D14 mediante un kit Milliplex® diseñado para estos analitos (EMD Millipore Merck, Darmstadt, Alemania). La lectura se realizó en un equipo Luminex 200 (Luminex Corporation). Datos representativos de experimento de n=8. Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de una vía. *P<0,05 vs. WT; *P<0,05 vs. D7.

Los ratones NR3C1^{ΔIEC} presentan un aumento en la expresión proteica de S100A9 en IECs aisladas de colon comparado con ratones WT, más notablemente a los 7 días de la delección, aunque en ambos casos significativo (Figura 2B). Igualmente, a los 7 días de la ausencia de GR se produce un aumento de la expresión de *S100a8* y *S100a9* (Figura 2B). Se midió también la producción de ciertas citoquinas por explantes de colon. En la Figura 2C se muestran IL10, TNF e IL17a, todas con el mismo perfil: un aumento a los 7 días postdelección, que posteriormente se reduce hasta quedar por debajo incluso de los niveles de WT. Este conjunto de datos nos indica que la pérdida de GR por sí misma genera una inflamación moderada y autolimitada en el colon y que, por tanto, éste tiene un papel relevante en la homeostasis intestinal. Además, esta inflamación tiene consecuencias a nivel sistémico, reflejadas en un aumento de IL6 y TNF plasmáticas, que igualmente, se revierte a los 14 días (Figura 2D).

Por otro lado, se estudió la síntesis de GC endógenos. Como se ha explicado en la introducción, el epitelio intestinal es capaz de producir GC *de novo*, proceso fundamental en la homeostasis intestinal. Así pues, se midió la producción de corticosterona por explantes colónicos y la corticosterona plasmática.

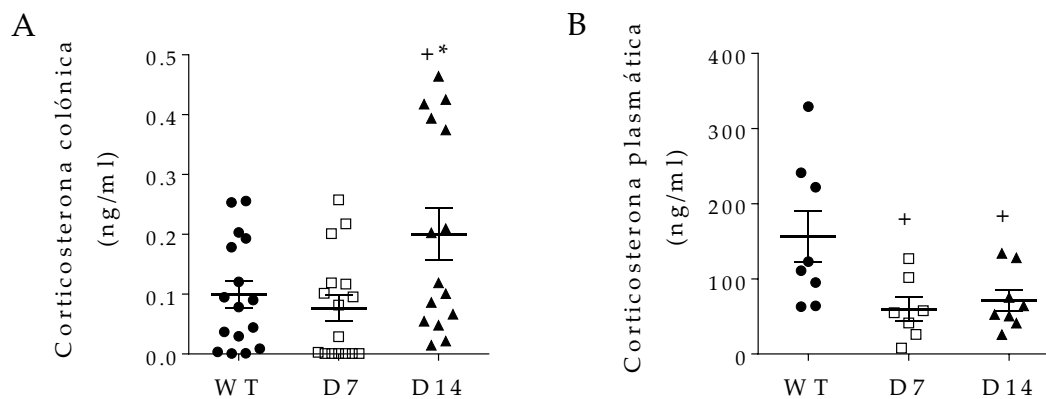


Figura 3. Medida de corticosterona en explantes de colon (A) o plasma (B) mediante ELISA a ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 días (D7) o 14 (D14) del inicio de la administración de tamoxifeno. Los datos que se muestran son representativos de dos experimentos (n=8) y se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de una vía. +P<0,05 vs. WT; *P<0,05 vs. D7.

Sorprendentemente, el colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} produce más corticosterona a las dos semanas postdelección comparado con WT, aún cuando los signos de inflamación se producen a una semana. Además, la pérdida de GR intestinal tiene consecuencias en la regulación del eje HPA, ya que los ratones NR3C1^{ΔIEC}

presentan una menor concentración plasmática de corticosterona. La causa de estas alteraciones es desconocida.

1.3 Papel del GR en la colitis inducida por DSS.

Tras caracterizar el fenotipo basal de los animales NR3C1^{ΔIEC}, se procedió a estudiar el impacto de la delección del GR del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS. El diseño experimental fue 2x2, siendo las variables el genotipo y el tratamiento con budesonida a dosis de 6 μg/día.

Normalmente, en este modelo los animales comienzan a perder peso y tener diarrea (signos claros de colitis) a partir del día 5 del tratamiento con DSS, procediéndose al sacrificio el día 7, cuando la enfermedad está totalmente instaurada.

Como puede verse en la Figura 4, los animales WT siguieron el comportamiento predecible. Los ratones WT a los que se les administró BD perdieron peso de forma mucho más acusada, al igual que en experimentos anteriores. En el caso de los ratones NR3C1^{ΔIEC}, aunque perdieron más peso los primeros días de colitis, a partir del día 5 la situación revirtió, terminando en mejor estado que los ratones WT. Además, hay que destacar que el efecto perjudicial de la BD en la colitis experimental por DSS desaparece en ausencia del GR del epitelio intestinal.

Debido a que en el día 1 los ratones NR3C1^{ΔIEC}, a diferencia de los WT, presentaban sangre en heces, se estudió la respuesta temprana (1 día) y tardía (7 días) en la colitis experimental inducida por DSS.

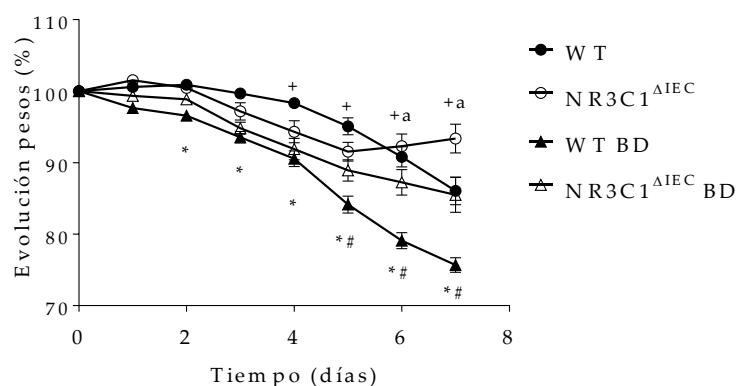


Figura 4. Evolución de pesos en la colitis inducida por DSS. Evolución del peso de los animales durante el transcurso de la colitis inducida por DSS en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, no tratados o bajo tratamiento con budesonida (BD) 6 μg/ratón/día. Los resultados son expresados como % de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento. Datos representativos de 2 experimentos independientes de n=8 cada uno. Los datos se

expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió utilizando múltiples análisis de t-Student. $^+P < 0,05$ NR3C1 Δ IEC vs. WT; $^*P < 0,05$ WT BD vs. WT; $^#P < 0,05$ WT BD vs. NR3C1 Δ IEC BD; $^aP < 0,05$ NR3C1 Δ IEC vs. NR3C1 Δ IEC BD.

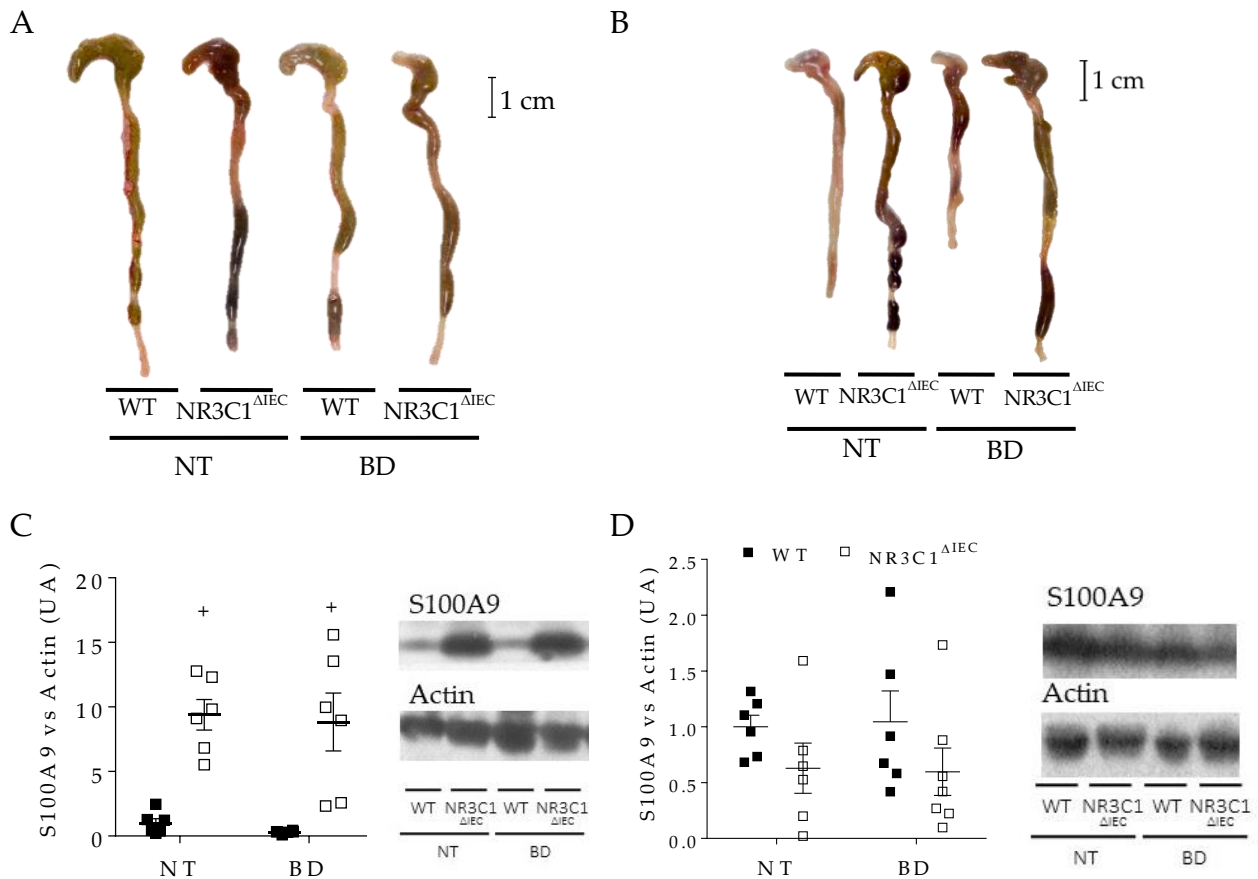


Figura 5. Aspecto macroscópico del colon y expresión proteica de S100A9 en la colitis inducida por DSS en fase temprana (1 día) y tardía (7 días) en ratones WT y NR3C1 Δ IEC, no tratados (NT) o bajo tratamiento con budesonida (BD) 6 μ g/día. Fotografías representativas de colon tras 1 día (A) y 7 días (B) de DSS. Expresión proteica de S100A9 en extractos proteicos totales de colon de ratones tras 1 día (C) y 7 días (D) de DSS evaluados mediante *western blot*. Los niveles de actina se usaron como control de carga. Membrana representativa de los resultados obtenidos en la gráfica. Datos representativos de 2 experimentos de n=8. Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. $^+P < 0,05$ NR3C1 Δ IEC vs. WT.

En la Figura 5 se muestra el aspecto macroscópico de los cólores, así como la expresión proteica de S100A9 en el tejido colónico. Con ambos resultados se confirma que la delección epitelial intestinal de GR empeora en gran medida la respuesta inflamatoria inicial al DSS, pero tiene un papel protector en la etapa tardía, probablemente debido a una modulación en el tráfico de leucocitos y a una atenuación del proceso de translocación/sepsis.

Una vez descritos sumariamente los antecedentes, que quedan recogidos en detalle en las tesis y publicaciones anteriores de nuestro grupo, se expondrán a continuación los resultados de la presente tesis doctoral.

2 Caracterización en profundidad del fenotipo de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en estado basal.

2.1 Análisis transcriptómico (RNAseq) de muestras enriquecidas en IECs colónicas.

Con el objetivo de tener una visión mucho más amplia de las consecuencias de la ausencia de GR en el epitelio intestinal, se hizo un análisis del transcriptoma epitelial mediante RNAseq, realizado en colaboración con el CIC bioGUNE. Con este fin se obtuvieron muestras enriquecidas en IECs (n=3) de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a 7 días postdelección (n=3), obtenidas mediante un gradiente de densidad con Percoll. Debido a esto, aunque el mRNA procede fundamentalmente de IECs, no debe considerarse pura, ya que contiene típicamente en torno a un 10% de células de la *lamina propria*. Pese a ello, la información que ofrece es de gran interés desde el punto de vista de la caracterización del fenotipo epitelial.

El análisis de los datos transcriptómicos se llevó a cabo a dos niveles: manual y a través de plataformas informáticas. Los datos se expresan como tanto por uno (*fold change*) en forma logarítmica (base 2). Inicialmente se realizó un análisis de clasificación de los perfiles de expresión de las distintas muestras (*clustering*). Para ser incluidos en el mapa térmico, los genes debían tener al menos 1000 lecturas en el conjunto de todas las muestras, así como una desviación estándar del log₂ de las diferencias de expresión mayor a dos. El resultado se muestra en el mapa térmico de la Figura 6, el cual muestra los dos grupos de clasificación generados que, como se esperaba, corresponden a los dos diferentes genotipos. Los perfiles de expresión son por tanto claramente diferenciados.

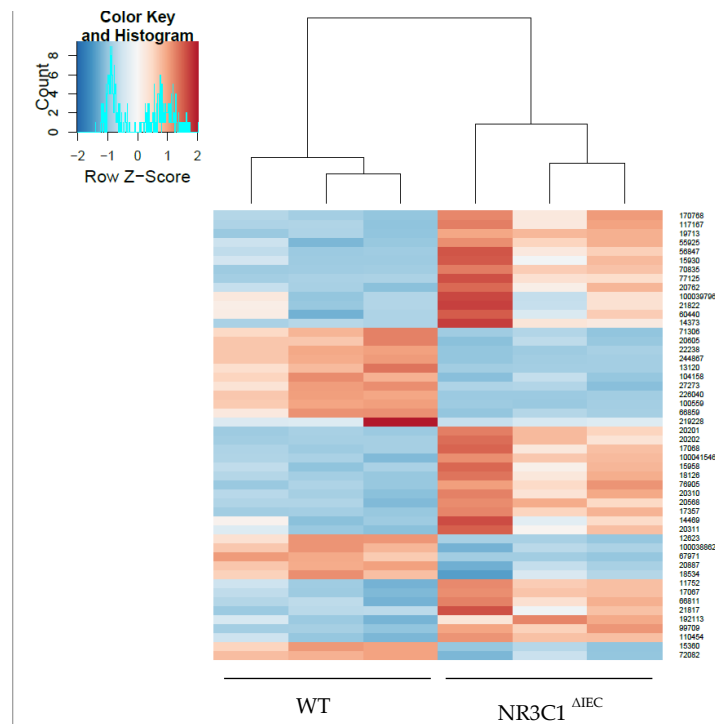


Figura 6. RNAseq procedente de muestras enriquecidas de IECs de colon obtenidas por gradiente de percoll de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} (n=3). Mapa térmico del RNAseq que muestra el agrupamiento de IECs colónicas de WT y NR3C1^{ΔIEC}.

El número de genes con diferente expresión en ambos grupos ($p < 0,05$) fue 4181, de los cuales 2159 estuvieron sobreexpresados. Se realizaron medidas por RT-qPCR de alguno de los genes con cambios sustanciales para corroborar los resultados del RNAseq (Figura 7).

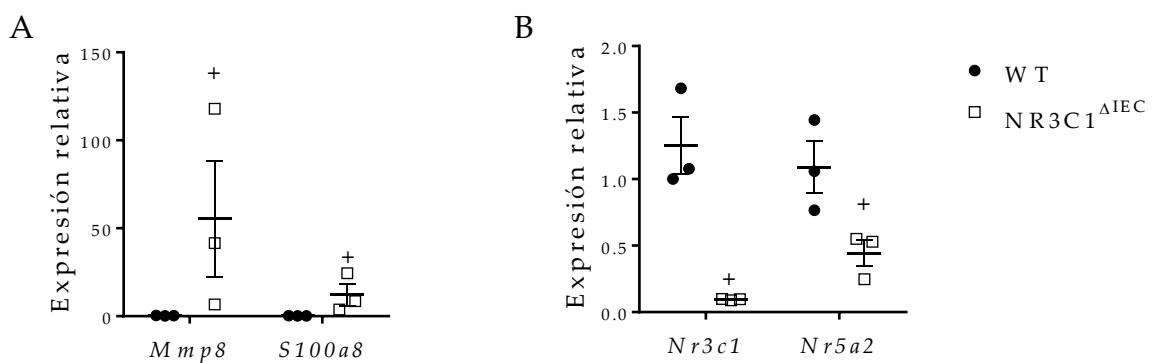


Figura 7. Confirmación de los resultados del RNAseq por RT-qPCR. Expresión génica de dos genes sobreexpresados (*Mmp8* y *S100a8*) (A) y dos genes inhibidos (*Nr3c1* y *Nr5a2*) (B) según los datos de RNAseq en colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} comparado con WT (n=3). *Ppib*

RESULTADOS

fue usado como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando el análisis t-Student. $^+P < 0,05$ WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

El análisis bioinformático con la plataforma PANTHER-GO reveló que los principales procesos biológicos alterados por la ausencia de GR en el epitelio intestinal, de acuerdo al valor de p ajustado, estaban relacionados con inmunidad e inflamación (Figura 8).

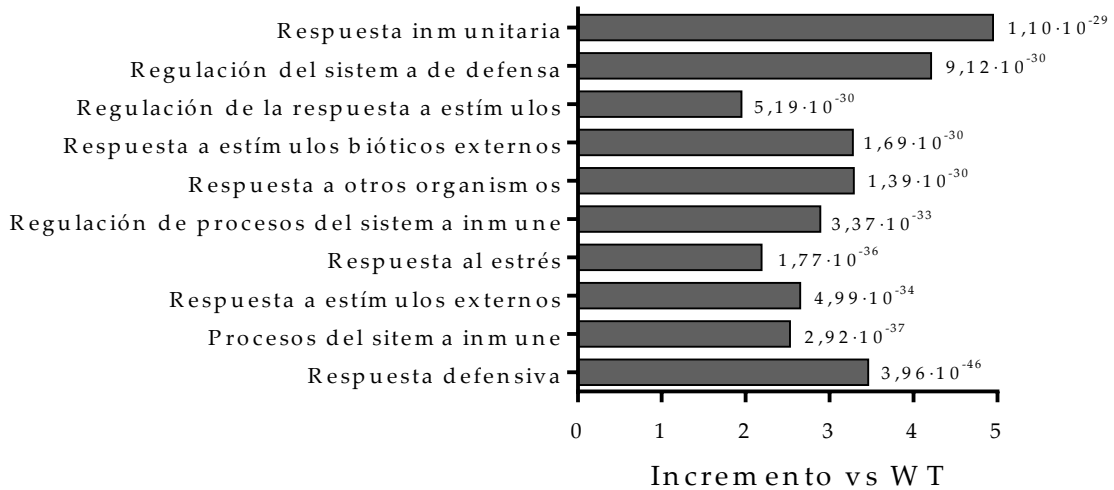


Figura 8. Diez procesos biológicos más alterados en IECs de colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} ordenados según su valor de p ajustado ($padj$). Elaborado usando PANTHER 14.0. El gráfico muestra el incremento vs WT y el $padj$ a la derecha de cada barra.

Para ver más detalladamente cuáles son los genes implicados en estas rutas, la Figura 9 A muestra dos tablas que recogen algunos de los más relevantes desde el punto de vista cuantitativo. La tabla de la izquierda incluye quimioquinas, mientras que la de la derecha incluye genes relacionados con procesos inflamatorios.

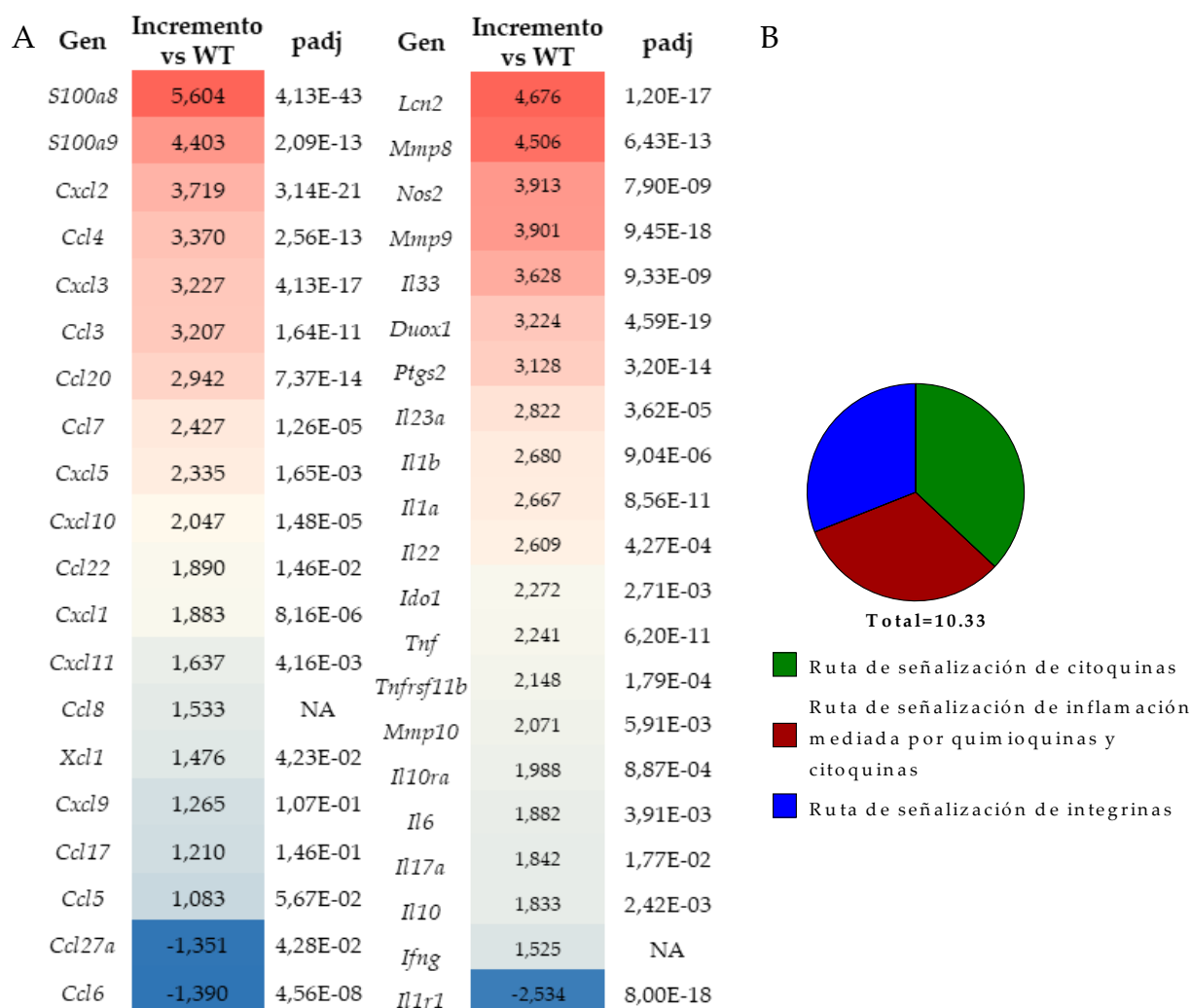


Figura 9. Principales genes y rutas alterados por la ausencia de GR en IECs de colon. A. Tabla de genes alterados relacionados con la quimiotaxis (izquierda) y procesos inflamatorios (derecha). Se incluye el incremento vs WT y el valor de p ajustado (*padj*). B. Gráfico sectorial del incremento vs WT de rutas alteradas en IECs de colon de NR3C1^{ΔIEC} usando PANTHER14.0 como software, PANTHER PATHWAY como base de datos, de acuerdo con GO Ontology (01/01/2019) y usando el test de Fisher con la corrección de FDR.

Es importante destacar que la mayoría de las quimioquinas se ven sobreexpresadas en IECs de ratones NR3C1^{ΔIEC}, sin apuntar concretamente a ningún tipo celular. Así pues, S100A8/9 y CXCL1-5 son atrayentes de neutrófilos, mientras que CXCL11 y 9 lo son para linfocitos Th1 y células NK. CCL3, 4 y 7

corresponden principalmente a monocitos y macrófagos. En cuanto a la tabla de la derecha, igualmente las citoquinas, sus receptores, metaloproteasas, así como iNOS (*Nos2*) y COX2 (*Ptgs2*), entre otros, se encuentran sobreexpresados en ratones NR3C1^{ΔIEC} en comparación con los WT. Esto confirma el estado inflamatorio observado en el colon de los animales NR3C1^{ΔIEC} en estado basal descrito en la anterior sección. El gen con un mayor incremento de expresión de esta tabla es el que codifica lipocalina 2, implicado en el transporte de lípidos y hormonas esteroideas, así como con importantes funciones antibacterianas. A continuación en la tabla, *Mmp8* y *Mmp9* tienen un papel esencial en la activación de neutrófilos, y la última en la activación de quimioquinas y citoquinas como IL1β, así como en cáncer y angiogénesis. También están sobreexpresados los genes que codifican la IL1β, IL6, IL10, TNF o IL17A.

Por otro lado, también se detectaron grandes cambios en el transportoma del epitelio intestinal. Los principales genes modificados se muestran en la Tabla 3. Sin embargo, los genes principalmente involucrados en la absorción de NaCl: *Slc9a3* (NHE3) y *Slc26a3* (DRA) no se vieron afectados, lo que sugiere que GR no tiene un papel fundamental en el transporte electrolítico del colon en condiciones basales, aunque sí puede ser más relevante en transportadores de aminoácidos, vitaminas o nucleótidos. El estudio antes mencionado de Reichardt et al. investiga el impacto de la ausencia de GR del epitelio intestinal en el transporte de glucosa. Por ello, no se indagó más en el tema.

Tabla 3. Principales genes que codifican transportadores afectados por la ausencia de GR en el epitelio intestinal. Se muestra el nombre del gen, el log₂ del incremento vs WT y el valor de p ajustado (*p*adj).

Gen	Log₂	<i>p</i> adj	Gen	Log₂	<i>p</i> adj
	Incremento vs			Incremento vs	
	WT			WT	
<i>Slc4a11</i>	4,380	NA	<i>Slc16a2</i>	-2,080	0,0006004
<i>Slc7a9</i>	3,071	2,73E-16	<i>Slc51a</i>	-2,173	1,63E-13
<i>Slc16a3</i>	2,995	7,01E-22	<i>Slc35e3</i>	-2,315	6,67E-24
<i>Clca4</i>	2,944	4,61E-19	<i>Slc4a4</i>	-2,463	3,30E-26
<i>Slc25a48</i>	2,794	1,06E-08	<i>Slc25a23</i>	-2,464	8,86E-10

<i>Slc2a3</i>	2,713	0,00011724	<i>Slco2b1</i>	-3,006	3,75E-15
<i>Clca1</i>	2,669	4,67E-14	<i>Slc16a9</i>	-3,112	NA
<i>Clca2</i>	2,521	3,95E-11	<i>Slc47a1</i>	-3,134	8,75E-09
<i>Clca6</i>	2,470	1,69E-18	<i>Slc22a3</i>	-3,272	1,26E-06
<i>Slc25a31</i>	2,180	0,00425567	<i>Slc8a1</i>	-3,457	1,28E-42
<i>Slc12a4</i>	2,127	6,21E-05	<i>Slc30a10</i>	-3,482	2,67E-11
<i>Slc6a19</i>	2,031	NA	<i>Slc17a2</i>	-3,686	4,65E-08

En cuanto a genes que codifican proteínas implicadas en las uniones estrechas, no hubo cambios en genes que codifican claudinas (*Cldn9*, *Cldn10*, *Cldnd2*, *Cldn1*, *Cldn15*), Ocludina (*Ocln*) o ZO-1 (*Tjp1*).

2.2 Análisis de los linfocitos intraepiteliales y lamina propria.

Confirmado el estado inflamatorio del colon en ratones NR3C1^{ΔIEC} a 7 días postdelección, y visto que los resultados de RNAseq no sugieren la infiltración de un tipo celular concreto, se decidió analizar por citometría los linfocitos intraepiteliales (IELs) y la lamina propria (LPMC) de estos ratones para tratar de identificar las células involucradas.

En primer lugar, se obtuvieron células de la lamina propria de colon de animales WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 días de delección, momento en el cual presentaron inflamación. La selección de las poblaciones fue la siguiente:

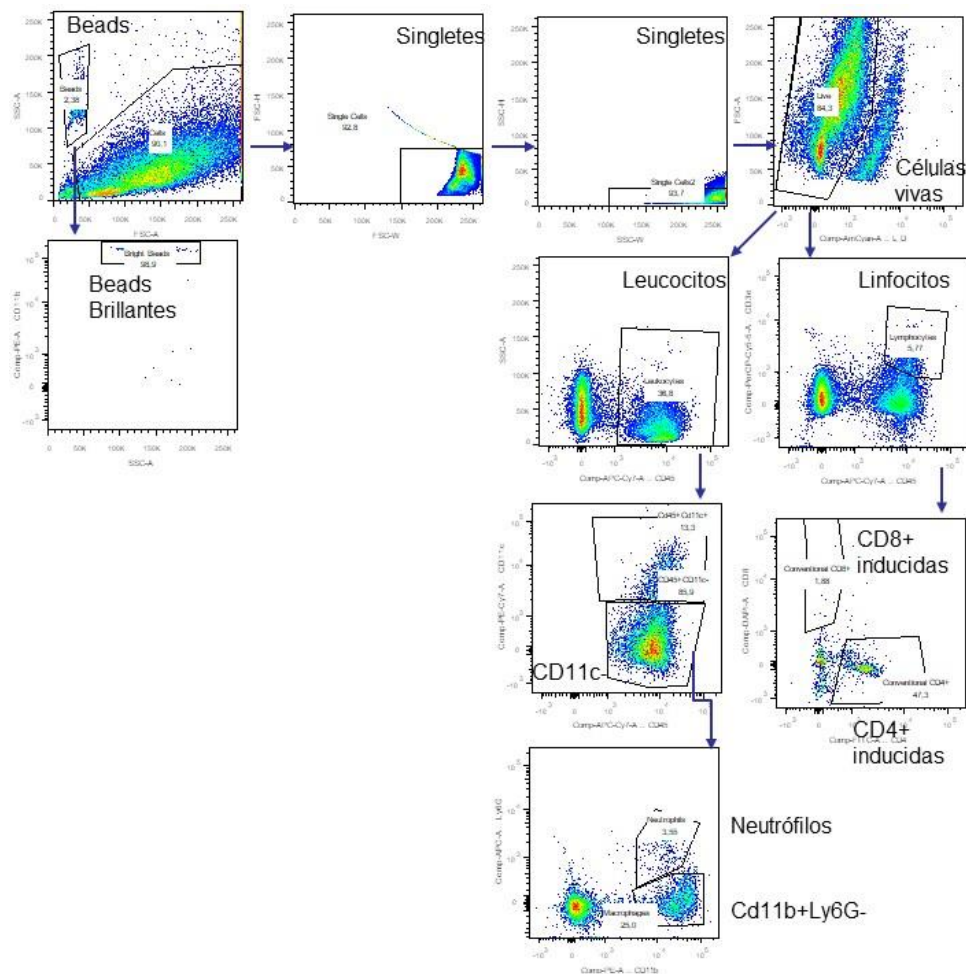


Figura 10. Selección de poblaciones de LPMCs obtenidas de colon. En primer lugar se seleccionaron las CountBright™ Absolute Counting Beads (Beads) y, entre ellas, aquellas fluorescentes para PE (Beads brillantes). Por otro lado, se seleccionaron las células, descartándose dobles y células muertas. Dentro de las células vivas, se seleccionaron, por un lado, los leucocitos (CD45+), y por otro los linfocitos T (CD3+CD45+). Dentro de los leucocitos, se escogió la población negativa para CD11c, y, dentro de ella, se enfrentó CD11b y Ly6G. La población positiva para ambos constituye los neutrófilos. Dentro de los linfocitos T, se seleccionaron las CD4+ o CD8+ inducidas.

Los resultados obtenidos están reflejados en la Figura 11:

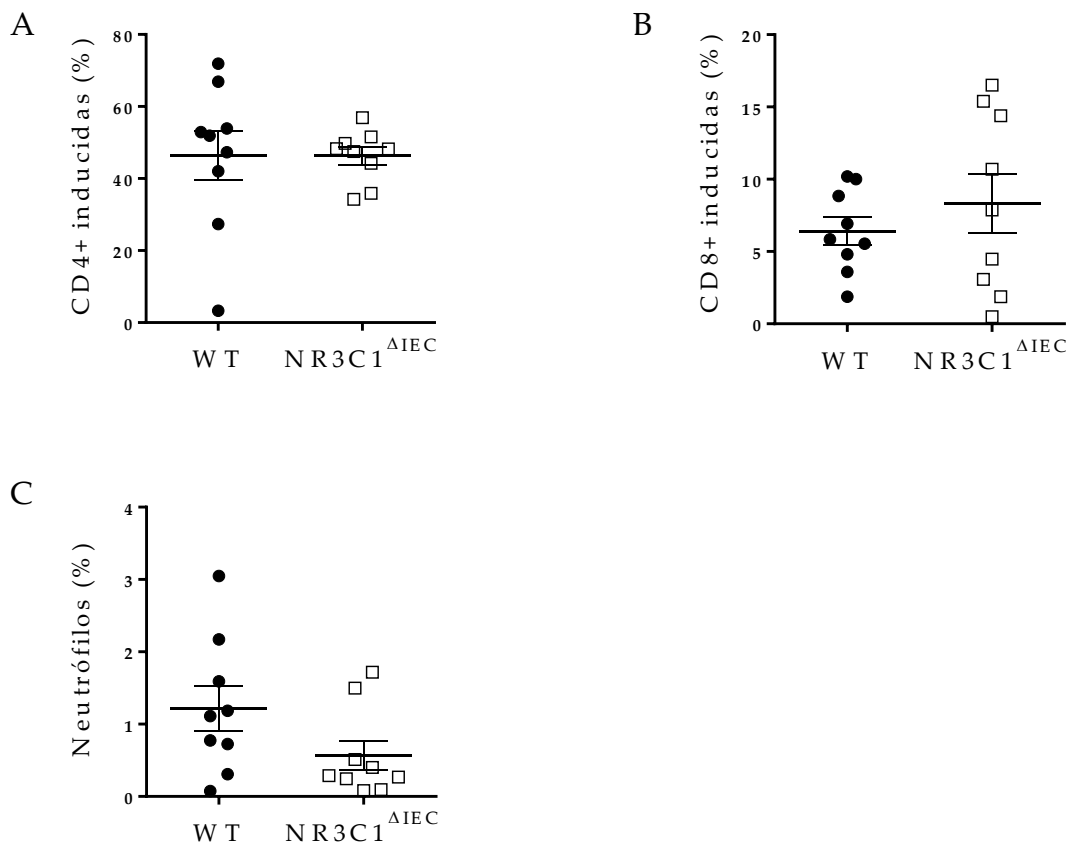


Figura 11. Citometría de LPMCs de colon de animales WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. En todos los casos el gate son los linfocitos T (CD45+CD3+). A. CD4+ inducidas (CD45+CD3+CD4+), gate linfocitos T (CD45+CD3+). B. CD8β+ inducidas (CD45+CD3+CD8β+), gate linfocitos T (CD45+CD3+). C. Neutrófilos (CD45+CD11c-CD11b+Ly6G+), gate leucocitos (CD45+) (n=8-9).

Nuestra primera hipótesis fue que la principal población infiltrada podría constar principalmente de neutrófilos, ya que *S100a8*, *S100a9*, *Cxcl2* y *Cxcl3*, atrayentes de este tipo celular, se encuentran entre las quimioquinas más sobreexpresadas en colon de NR3C1^{ΔIEC} según los datos del RNAseq. Se trata además de los leucocitos que suelen protagonizar las respuestas inflamatorias agudas. No obstante, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos de la *lamina propria* en WT frente a NR3C1^{ΔIEC}, e incluso una tendencia a ser menor en los segundos ($p=0,0977$).

En cuanto a las IELs, se obtuvieron tanto de intestino delgado como de colon. La selección de las poblaciones fue la siguiente en ambos casos:

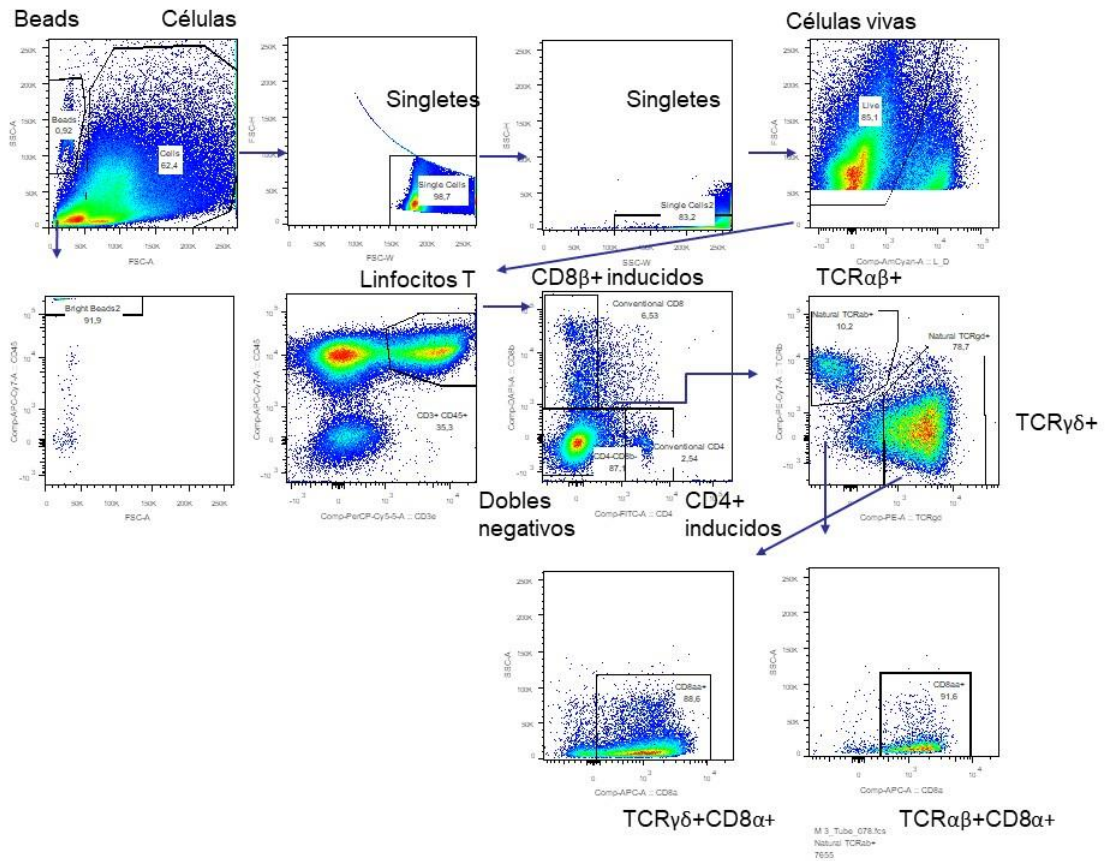


Figura 12. Selección de poblaciones en las IELs obtenidas de intestino delgado y colon. En primer lugar se seleccionaron las CountBright™ Absolute Counting Beads (Beads) y, entre ellas, aquellas fluorescentes para APCCy7 (Beads brillantes). Por otro lado, se seleccionaron las células, descartándose dobles y células muertas. Dentro de las células vivas, se seleccionaron los linfocitos T (CD3+CD45+), que constituyen el *gate* de todas las gráficas posteriores. A continuación, se seleccionaron las CD8+ inducidas (CD8β+), CD4+ inducidas (CD4+) y dobles negativos (CD4-CD8β-). Dentro de esta última población, se seleccionó TCRαβ+ o TCRγδ+. Además, dentro de cada una de ellas, se seleccionó la población positiva para CD8α.

En el caso del intestino delgado, hubo un claro aumento de células TCR $\gamma\delta$ + naturales (CD3+CD45+CD8 β -CD4+) (Figura 13E) en los animales NR3C1 Δ IEC. La mayoría de estas células fueron CD8 $\alpha\alpha$ +, y esta población resultó ser también significativamente mayor en ausencia de GR intestinal (Figura 13F). Además, aunque no llegó a ser significativo, hubo una tendencia a un menor porcentaje de células CD4+ en ratones NR3C1 Δ IEC.

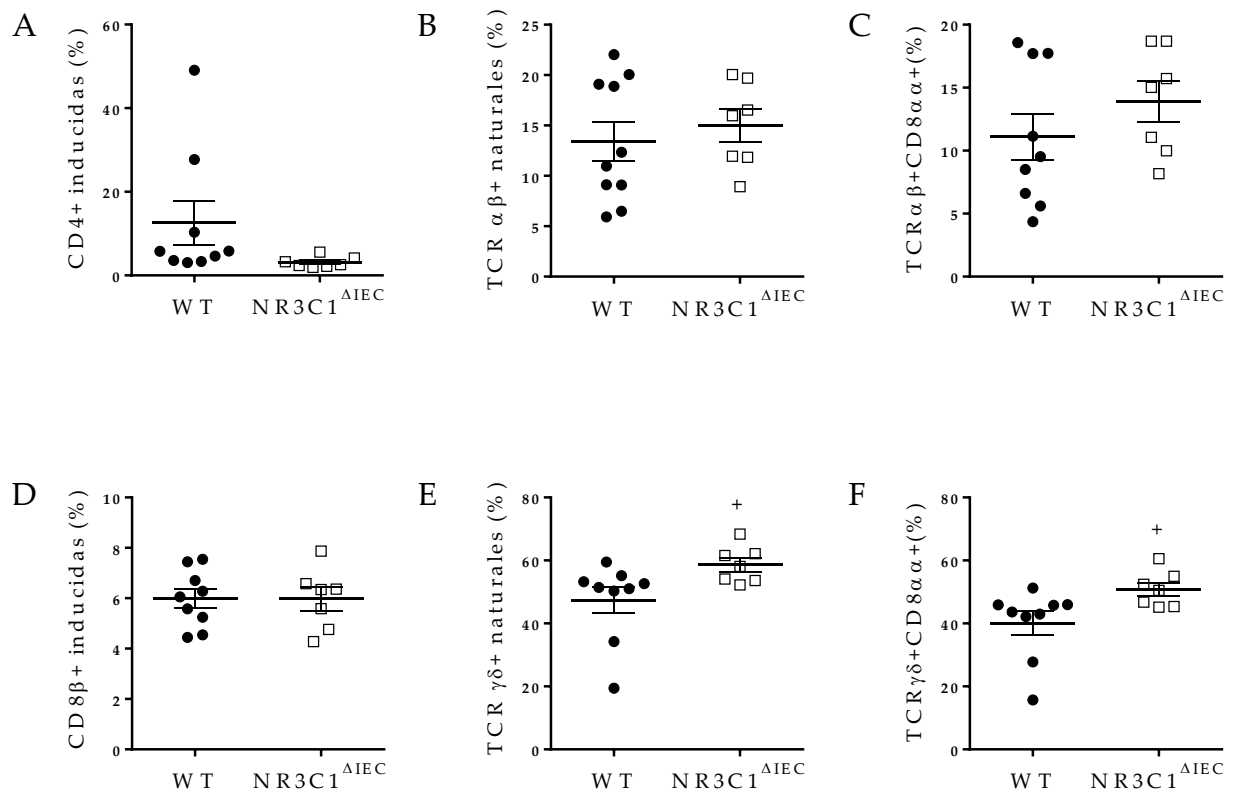


Figura 13. Citometría de linfocitos intraepiteliales de intestino delgado de animales WT y NR3C1 Δ IEC tras 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. En todos caso el *gate* son los linfocitos T (CD45+CD3+). A. CD4+ inducidas (CD45+CD3+CD4+). B. TCR $\alpha\beta$ + naturales (CD45+CD3+CD4-CD8 β -TCR β +), C. TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + naturales (CD45+CD3+CD4-CD8 β -TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ +). D. CD8 β + inducidas (CD45+CD3+CD8 β +). E. TCR $\gamma\delta$ + naturales (CD45+CD3+CD4-CD8 β -TCR $\gamma\delta$ +), F. TCR $\gamma\delta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + naturales (CD45+CD3+CD4-CD8 β -TCR $\gamma\delta$ + CD8 $\alpha\alpha$ +). (n=7-9). Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando el análisis t-Student. *P<0,05 WTvs NR3C1 Δ IEC.

En cuanto al colon, el perfil obtenido fue muy similar, aunque esta vez sin ser significativo en ningún caso. En concreto, volvió a haber una tendencia a un menor porcentaje de CD4+ inducidas y mayor cantidad de TCR $\gamma\delta$ + naturales (Figura 14).

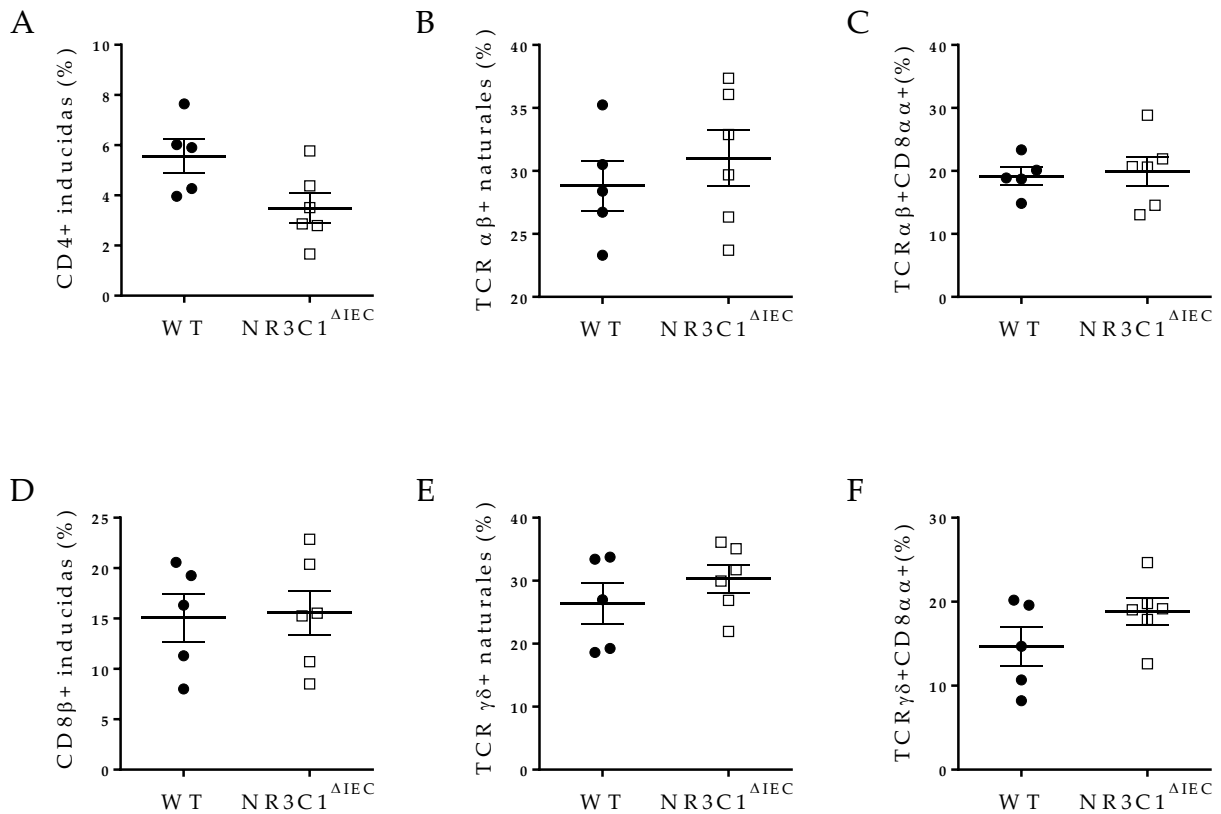


Figura 14. Citometría de linfocitos intraepiteliales de colon de animales WT y NR3C1^{ΔIEC} tras 7 días del inicio de la administración de tamoxifeno. En todos caso el *gate* son los linfocitos T (CD45+CD3+). A. CD4+ inducidas (CD45+CD3+CD4+). B. TCRαβ+ naturales (CD45+CD3+CD4-CD8β-TCRβ+), C. TCRαβ+ CD8αα+ naturales (CD45+CD3+CD4-CD8β-TCRβ+CD8α+). D. CD8β+ inducidas (CD45+CD3+CD8β+). E. TCRγδ+ naturales (CD45+CD3+CD4-CD8β-TCRγδ+), F. TCRγδ+ CD8αα+ naturales (CD45+CD3+CD4-CD8β-TCRγδ+ CD8α+). Los datos se expresan como media ± error estándar. (n=5-6)

Estos datos son difíciles de explicar, puesto que los fenómenos inflamatorios por la pérdida de GR del epitelio intestinal se dan en el colon, no habiendo signos claros en el intestino delgado. Puede que en el caso del colon, el porcentaje de linfocitos TCRγδ+ naturales no sea significativo porque en este caso el n es menor.

2.3 Estudio de la función barrera en ratones NR3C1^{ΔIEC}.

Una posible explicación de la inflamación colónica en los ratones NR3C1^{ΔIEC} es una alteración en la FBI, lo que daría lugar a una mayor translocación y una

respuesta proinflamatoria. Para comprobarlo, en primer lugar se evaluó la permeabilidad del colon *ex vivo*. Para ello, fragmentos de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} fueron montados en cámaras de Ussing, se añadió FITC-Dextrano 4 kD a la parte apical y a continuación, se midió la fluorescencia en la parte basolateral a lo largo de 70 minutos. Debido al tamaño del dextrano marcado, esta medida nos informa sobre la permeabilidad paracelular del colon.

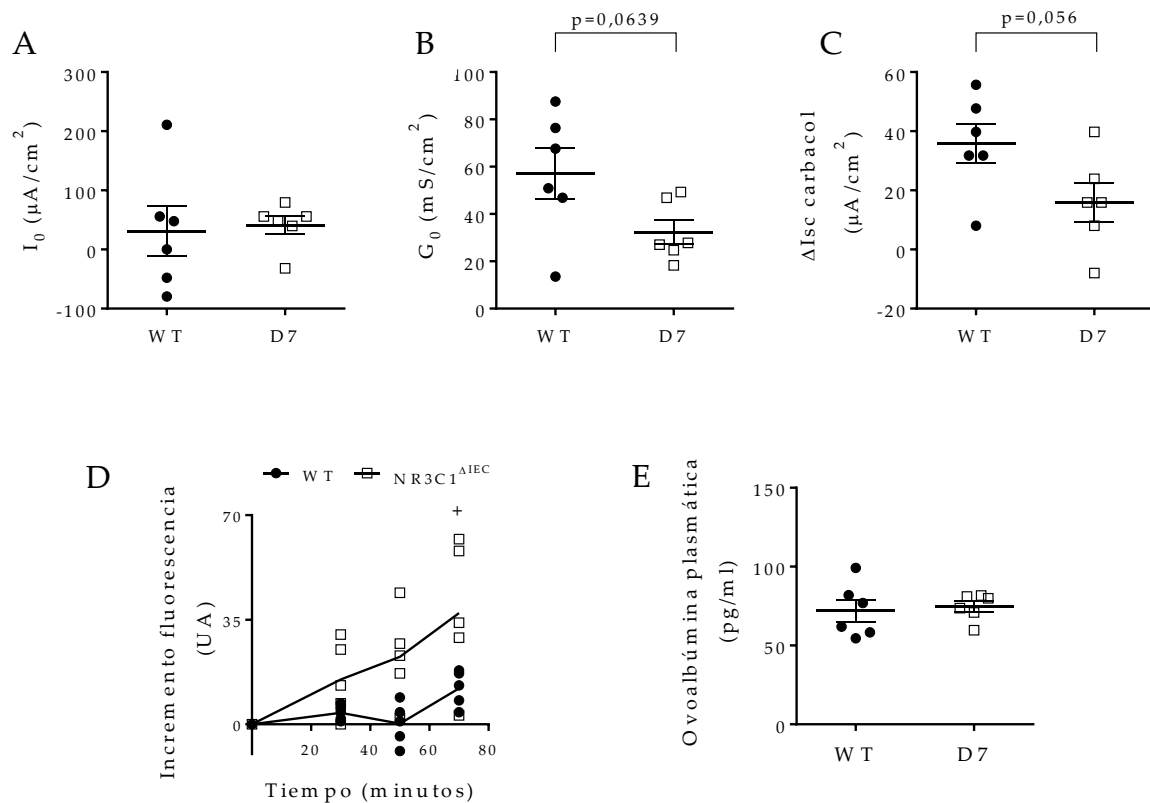


Figura 15. Evaluación de la permeabilidad paracelular y el transporte electrogénico en fragmentos de tejido colónico de WT y NR3C1^{ΔIEC} a 7 días postdelección (D7) en cámara de Ussing. A. Corriente de cortocircuito basal (I₀) (μA/cm²). B. Conductancia inicial (mS/cm²). C. Modificación de la corriente de cortocircuito tras la adición de carbacol 0,3 mM (μA/cm²). D. Incremento de fluorescencia durante 70 min en la parte basolateral. E. Ovoalbúmina plasmática medida mediante ELISA. Los datos se expresan como media ± error estándar (n=6). La significación estadística se estudió usando el análisis t-Student. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

Como puede verse en la Figura 15 D, hubo un mayor paso de FITC-Dextrano en el colon de ratones NR3C1^{ΔIEC}, posible consecuencia de un defecto en las uniones estrechas.

Por otro lado, se estudió también el transporte iónico electrogénico mediante la técnica de fijación de voltaje en cámara de Ussing en el mismo tejido colónico. La corriente de cortocircuito (Isc) basal no se vio afectada (Figura 15A). Sin embargo,

al evaluar la respuesta del tejido a la estimulación con el secretagogo carbacol a concentración submáxima (0.3 mM), se observó una disminución de la corriente de cortocircuito en el colon de NR3C1^{ΔIEC} que no llegó a alcanzar la significación estadística, aunque sí se quedó muy cerca del umbral (Figura 15C). La misma tendencia se observó en la conductancia (Figura 15B). En su conjunto, estos datos indican alteraciones en el transporte iónico debidas a la ausencia de GR en el epitelio intestinal. Por otra parte, se midió la permeabilidad a ovalbúmina *in vivo*. La ovalbúmina presenta un peso molecular unas 10 veces superior al FITC dextrano (concretamente 43 kD). Al tratarse de una prueba de absorción *in vivo* y con un período de latencia de 5 h, los niveles plasmáticos resultantes representan la contribución tanto del intestino delgado como del intestino grueso. En este caso los valores obtenidos fueron idénticos en los dos grupos (Figura 15E).

Para comprobar si los ratones NR3C1^{ΔIEC} presentan alteraciones en las uniones estrechas se evaluó la cantidad y posición en el epitelio de ZO-1 y ocludina mediante inmunofluorescencia en cortes de colon, dado que la regulación de las mismas tiene lugar no sólo a nivel transcripcional sino también postranscripcional, incluyendo el propio ensamblaje de las proteínas.

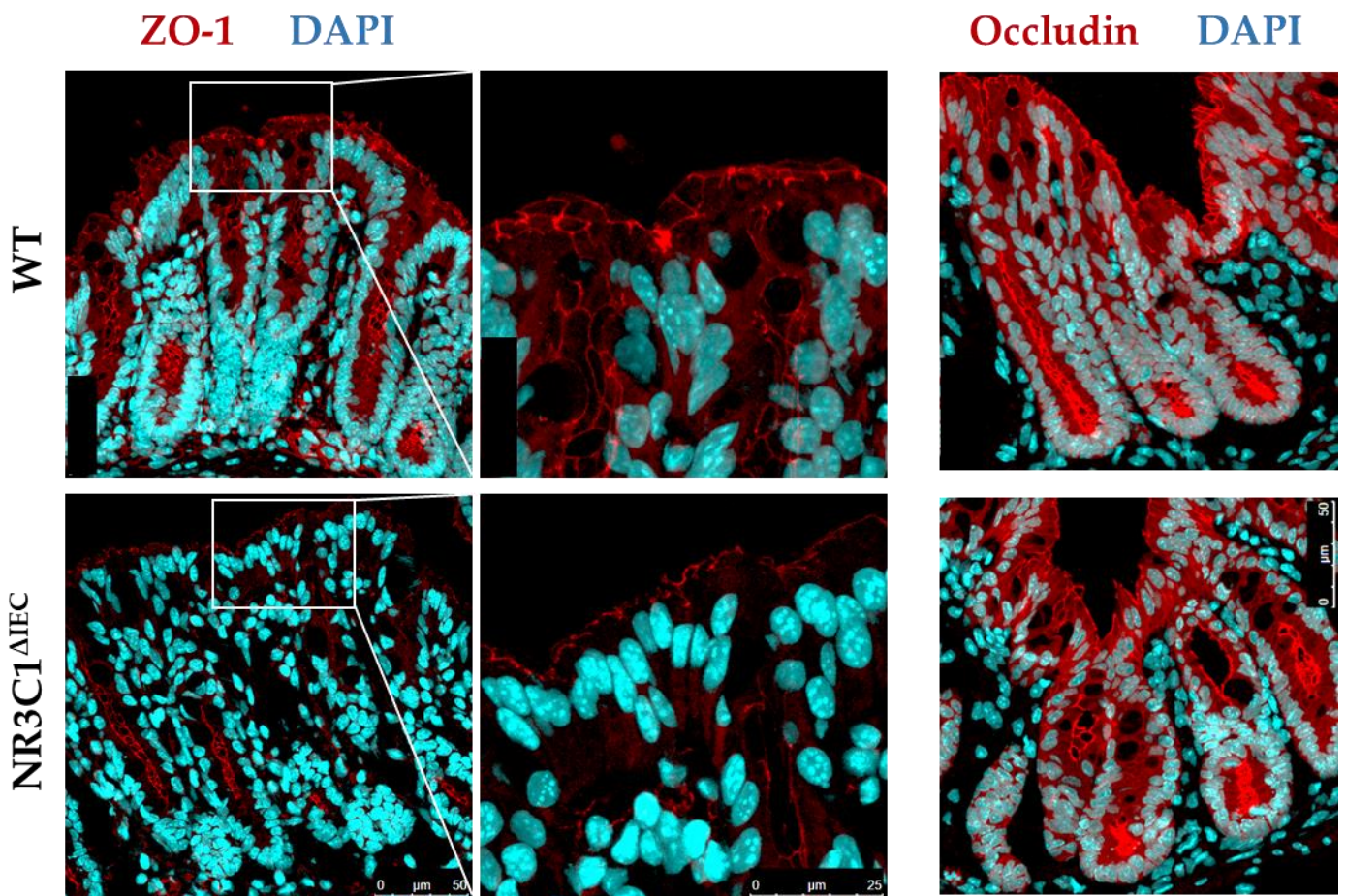


Figura 16. Inmunofluorescencia de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a 7 días postdelección.

Las imágenes muestran ZO-1 (rojo) (izquierda) y ocludina (rojo) (derecha). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. El panel central es una ampliación de una sección de la superficie del epitelio de la tinción de ZO-1.

Los resultados se muestran en la Figura 16. Las imágenes obtenidas no indican cambios apreciables en la expresión u organización de la ocludina. Por el contrario, se puso de manifiesto que las células epiteliales superficiales expresan una cantidad sensiblemente menor de ZO-1, en tanto que la expresión de esta proteína parece ser comparable en las criptas.

2.4 Estudio del efecto de la delección de *Nr3c1* del epitelio intestinal a largo plazo.

Como se ha explicado en el apartado de antecedentes, la inflamación causada por la ausencia de GR en el epitelio intestinal es autolimitante, es decir, aparece a los 7 días de la delección, pero a los 14 días, la mayoría de marcadores vuelven o se acercan al estado basal, presumiblemente por mecanismos de compensación. Con el objeto de verificar el fenotipo a largo plazo, se realizó un experimento adicional fijando un periodo de tiempo de 8 semanas.

Para ello, se administró tamoxifeno durante 5 días consecutivos, como en las ocasiones anteriores a ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, con igual número de machos y hembras (n=7-11). Se dio una dosis de recuerdo de tamoxifeno a las 4 semanas para asegurar la delección en todo momento. Tras 8 semanas de la primera administración, los animales fueron sacrificados.

En esta ocasión, macroscópicamente, ningún colon presentaba signo alguno de inflamación (datos no mostrados).

Mediante RT-qPCR se estudió en colon completo la expresión de genes que convencionalmente aumentan en modelos de colitis, y en ratones NR3C1^{ΔIEC} 7 días postdelección, como son *S100a8* y *S100a9*.

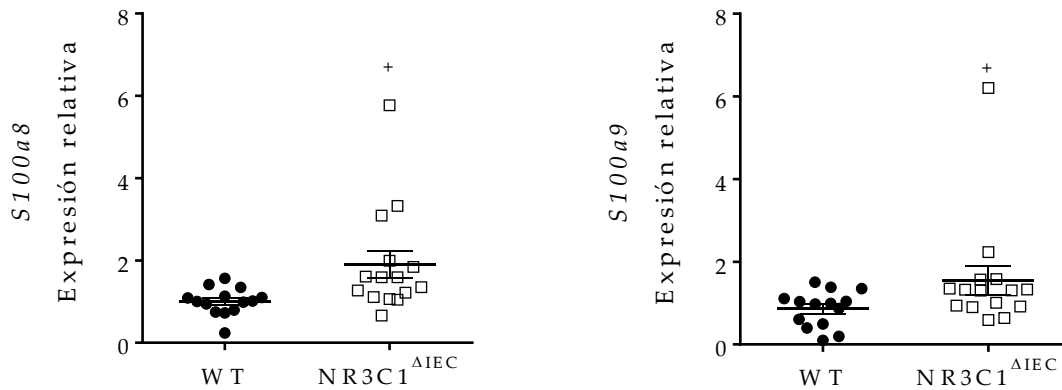


Figura 17. Expresión génica de *S100a8* y *S100a9* en colon completo medida por RT-qPCR. *Ppib*, *Hprt* y *18s* fueron usados como genes de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando el análisis t-Student (n=14-15) *P<0,05 WTvs NR3C1^{ΔIEC}.

Como puede observarse en la Figura 17, hubo un aumento significativo de la expresión génica tanto de *S100a8* como de *S100a9* en el colon asociado a la ausencia de GR. No obstante, el aumento fue mucho menor que tras 7 o 14 días de delección, donde el incremento llegaba a ser de 8-12 veces respecto a WT (Figura 2), mientras que en este caso sólo llegó a ser el doble como media, con un solapamiento considerable entre los dos grupos.

Debido a que anteriormente en la delección a 7 días los cólores más afectados fueron de hembras, se decidió analizar los datos por separado en función del sexo. En la Figura 18 puede verse que el aumento de la expresión génica de *S100a8* y *S100a9* correspondió a las hembras.

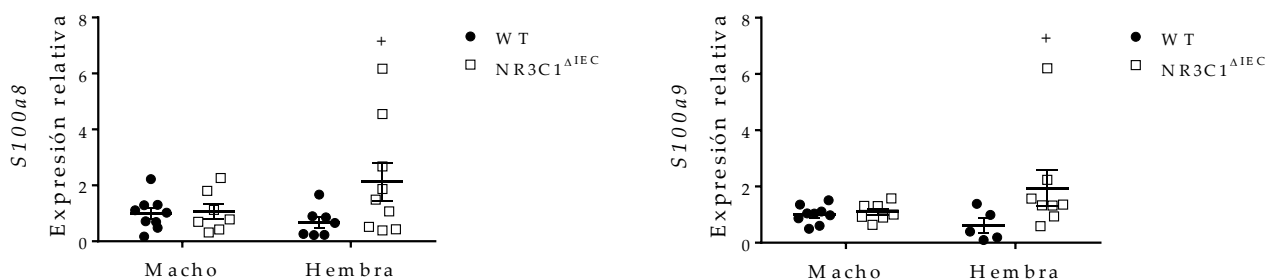


Figura 18. Expresión relativa de *S100a8* y *S100a9* en colon completo medido por RT-qPCR en función del sexo. *Ppib*, *Hprt* y *18s* fueron usados como genes de referencia. (n=5-9). Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1 Δ IEC.

Se midió también la expresión proteica de STAT3 en colon total, ya que su fosforilación estuvo incrementada a 7 días de deleción, y es un factor de transcripción que promueve respuestas inflamatorias, incluyendo la unión directa al promotor de *S100a9* para estimular su expresión.

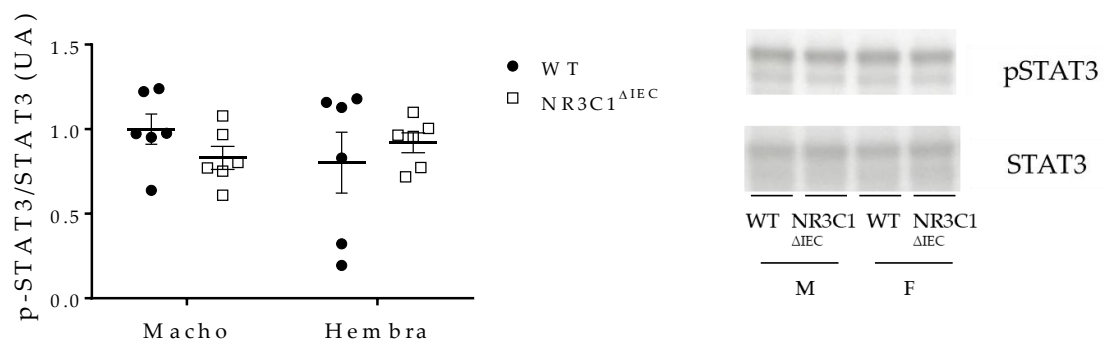


Figura 19. Estudio de la fosforilación de STAT3 en colon debido a la ausencia de GR en el epitelio intestinal a largo plazo. La expresión proteica de p-STAT3 se evaluó mediante *western blot* en extractos proteicos de colon de animales WT y NR3C1 Δ IEC tras 8 semanas de la primera administración de tamoxifeno. Membrana representativa de los resultados obtenidos en la gráfica (n=6) Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. (M= Macho, F=Hembra)

Como puede verse en la Figura 19, a las 8 semanas de deleción los niveles de fosforilación de STAT3 en ratones NR3C1 Δ IEC fueron similares a los de WT.

Se estudió también el nivel de haptoglobina plasmática, una proteína de fase aguda, como marcador de inflamación sistémica. En este caso, el resultado no difirió en función del sexo (datos no mostrados).

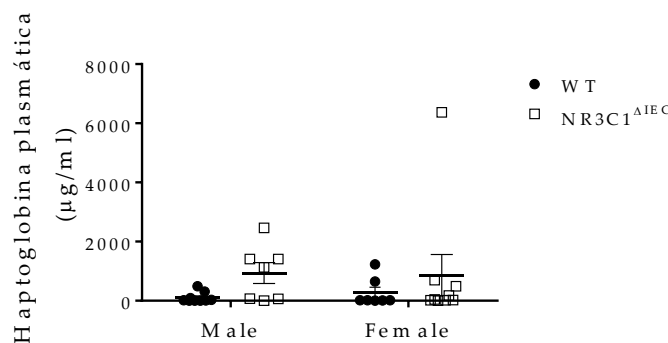


Figura 20. Concentración de haptoglobina plasmática. Determinación en animales WT y NR3C1 Δ IEC tras 8 semanas de la primera administración de tamoxifeno (n=7-9). Los datos se

expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías.

Como puede verse en la Figura 20, aunque hubo una tendencia a un aumento de haptoglobina en plasma en animales con ausencia de GR en el intestino, no se llegó a alcanzar la significancia debido a la variabilidad entre ratones.

En resumen, estos datos sugieren que si bien la pérdida de GR en el epitelio intestinal genera una moderada inflamación espontánea en el colon a los 7 días, tras 8 semanas ésta se atenúa, quedando apenas un vestigio, a pesar de la delección sostenida en el tiempo de la expresión del receptor.

3 Profundización en la implicación del receptor de glucocorticoides NR3C1 del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS y la respuesta a glucocorticoides.

3.1 Papel perjudicial de NR3C1 del epitelio intestinal en la colitis experimental inducida por DSS.

Debido a los resultados tan prometedores explicados en el apartado 1.3, donde se demuestra el efecto perjudicial del GR del epitelio intestinal, se decidió llevar a cabo un experimento de supervivencia en el que se sometió a animales WT y NR3C1^{ΔIEC} a DSS al 2,5% durante 21 días. Se trata de un protocolo de colitis crónica asociado a una mortalidad sustancial a partir de aproximadamente una semana de exposición al DSS, el cual se utiliza precisamente con el objeto de poder poner de manifiesto un posible efecto protector. En este caso los ratones no recibieron tratamiento farmacológico adicional alguno.

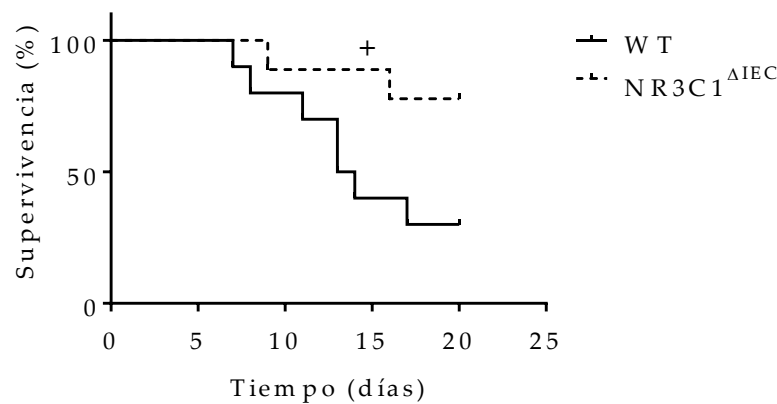


Figura 21. Curva de supervivencia de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a colitis inducida por DSS.

Ratones de ambos genotipos fueron sometidos a DSS 2,5% en agua de bebida durante 21 días. La significación estadística se hizo usando el test de Mantel-Cox (n=10).

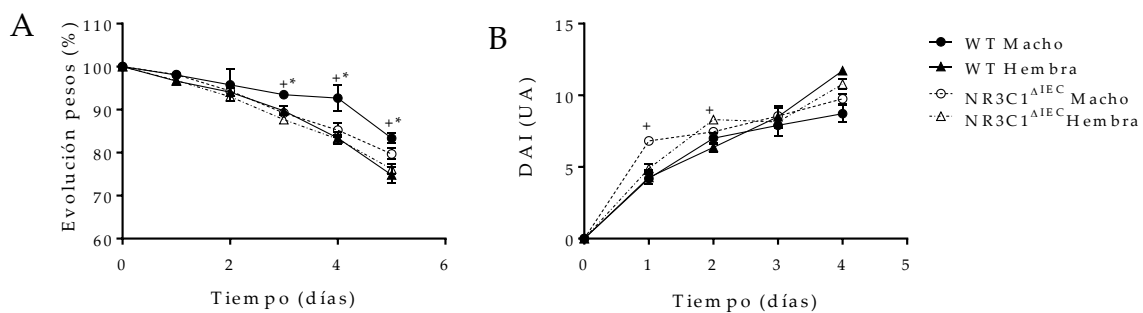
En la curva de supervivencia de la Figura 21 puede observarse cómo la ausencia de GR en el epitelio intestinal provocó una disminución significativa en el número de muertes por colitis, siendo éste de 7/10 en el grupo WT y 2/9 en el grupo NR3C1^{ΔIEC}. Este resultado confirma el papel perjudicial de este receptor en la colitis inducida por DSS.

3.2 Papel de NR3C1 del epitelio intestinal en la respuesta a glucocorticoides durante la colitis experimental inducida por DSS.

3.2.1 Evolución del estado general de ratones NR3C1^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.

Como se ha explicado en la introducción, los corticoides son el tratamiento de elección en los brotes agudos de EII. Anteriormente se han puesto de manifiesto los efectos contraproducentes del GR intestinal en la colitis por DSS. En la medida en que las acciones epiteliales de los GC puedan resultar, por tanto, limitantes en cuanto al efecto terapéutico global de estos fármacos, la ausencia de su receptor podría dar lugar no sólo a una mejor respuesta a dosis convencionales, sino también a dosis elevadas. Con el fin de contrastar esta hipótesis se decidió investigar a continuación el papel del GR del epitelio intestinal ante altas dosis de budesonida en la colitis experimental inducida por DSS.

Así pues, se administraron 60 µg/ratón/día de BD por vía oral a ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} durante un periodo de 5 días de colitis por DSS. Esta dosis es la máxima ensayada anteriormente por nuestro grupo en la colitis por DSS, y constituye una dosis alta, en la medida en que produce efectos sistémicos, además de una alteración sustancial de la FBI [430]. Los grupos se dividieron en machos y hembras debido a las diferencias en la respuesta inflamatoria en función del sexo expuestas anteriormente.



C

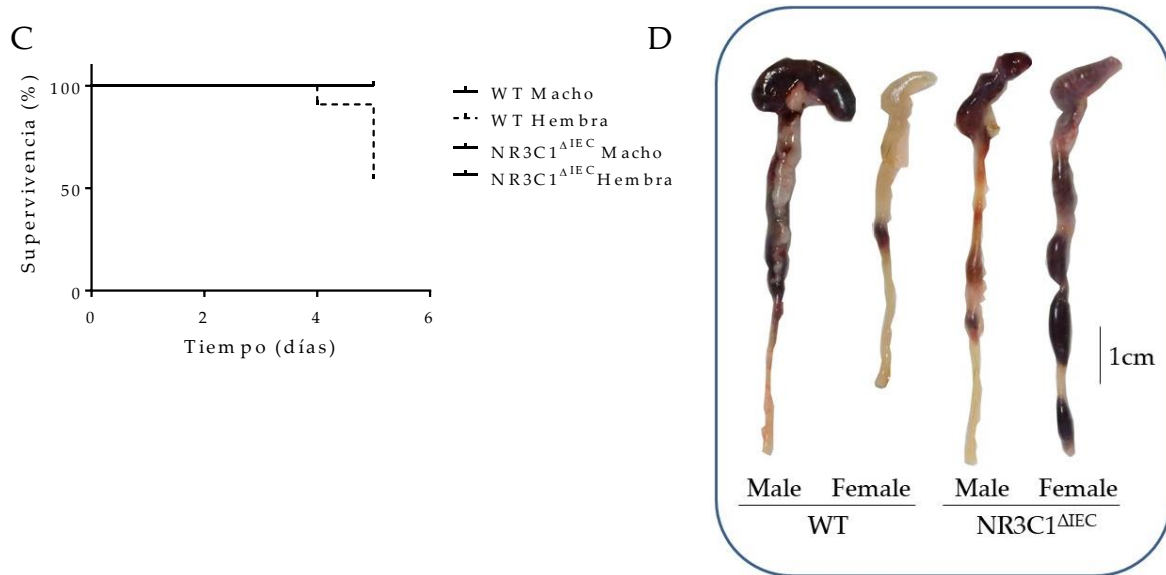


Figura 22. Evolución del estado general en colitis inducida por DSS y en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} bajo tratamiento con budesonida (BD) a 60 μg/ratón/día. A. Evolución del peso de los animales durante el transcurso de la colitis inducida por DSS. Los resultados son expresados como % de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento. B. Evolución del índice de daño macroscópico de los animales. Se valoró la pérdida de peso (1-4), sangre en heces (1-4) y consistencia de las heces (1-4). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. C. Curva de supervivencia. La significación estadística se analizó usando el test de Mantel-Cox (n=10-11). D. Aspecto macroscópico de colon. Fotografías representativas. Los datos se expresan como media ± error estándar. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Macho vs Hembra.

En primer lugar, es necesario comentar que el tratamiento duró sólo 5 días, y no 7 como es habitual, por motivos éticos, dado el deterioro general del estado de los animales asociado a esta dosis de BD. En la Figura 22A se muestra la evolución de pesos de los grupos, expresados como porcentaje del peso inicial. Puede constatarse cómo, efectivamente, la pérdida de peso rondó el 20% al quinto día de la exposición a DSS. El grupo de machos WT es el que menos peso perdió a lo largo del experimento. Los ratones carentes de GR intestinal presentaron un DAI mayor que los WT al inicio de la enfermedad, hecho que revirtió al final de la colitis. Es importante constatar también que en ratones WT hubo diferencias significativas en peso y DAI en función del sexo, de forma que las hembras presentaron una respuesta inflamatoria mayor a los machos. Sorprendentemente, estas diferencias por sexo se difuminaron ante la ausencia de GR intestinal. Este hecho quedó patente al comparar la supervivencia entre grupos, pues sólo se produjeron bajas en hembras WT, en concreto 5/11 (Figura 22C). En cuanto al aspecto macroscópico de los cólores (Figura 22D), hay que destacar la alta

presencia de sangre en el lumen intestinal. Algunos cólores de hembras WT aparecen prácticamente vacíos debido a la mayor diarrea sanguinolienta que presentó este grupo. En cuanto a la longitud o ratio peso/longitud colónica, no hubo diferencias significativas entre genotipos o sexos (datos no mostrados).

3.2.2 Estudio de parámetros inflamatorios en colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.

Para evaluar el grado de inflamación del colon, se estudió la expresión génica de genes como *S100a8*, *S100a9*, *Tnf* o *Il6*, mediante RT-qPCR.

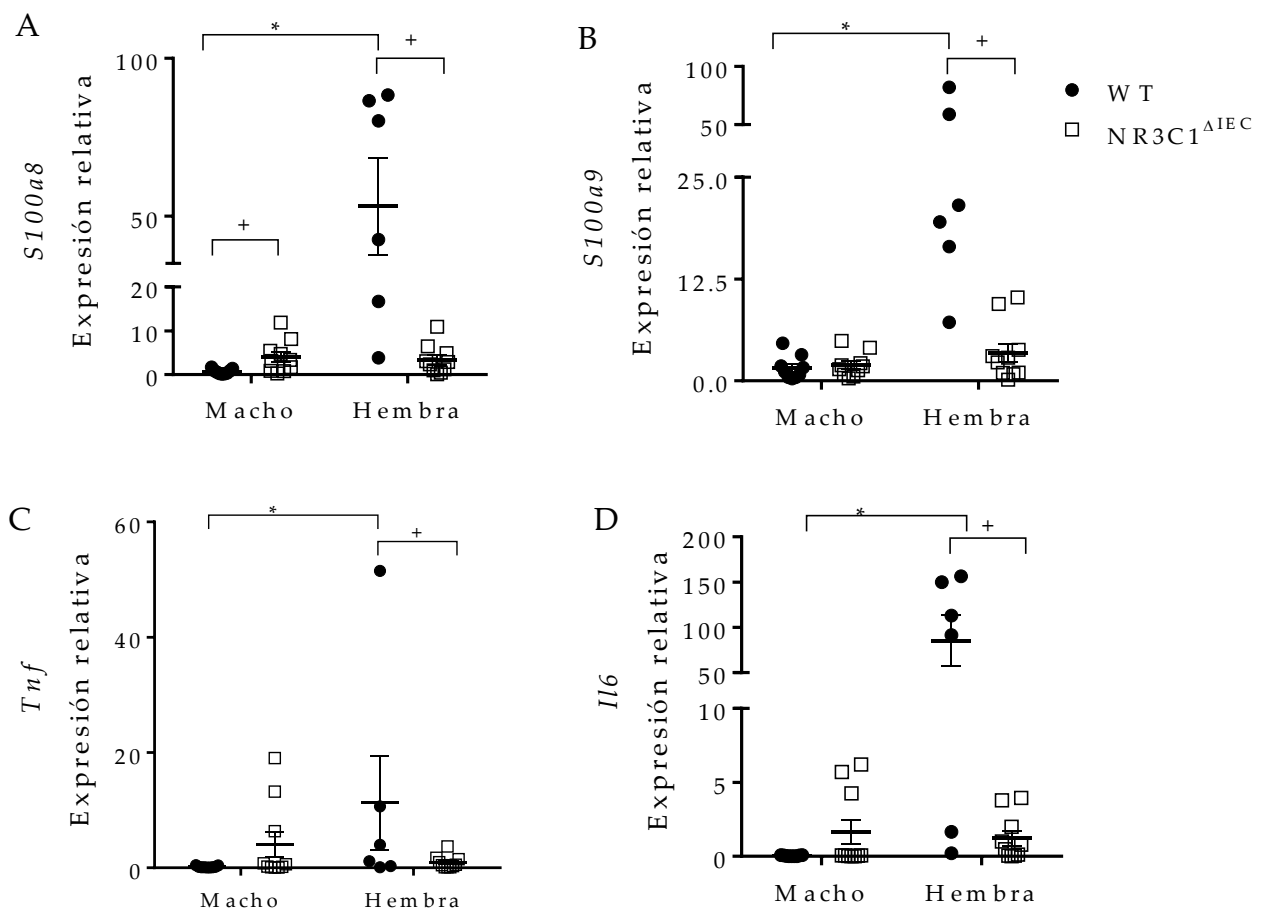


Figura 23. Evaluación del estado inflamatorio del colon en ratones colíticos tratados con dosis altas de budesonida. Medida de la expresión génica de *S100a8* (A), *S100a9* (B), *Tnf* (C) e *Il6* (D) en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} sometidos a 60 μg/día/ratón de budesonida y DSS al 2,5% en agua de bebida durante 5 días consecutivos. *Hprt* y *18s* fueron usados como genes de referencia. (n=6-10). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Macho vs Hembra.

Como puede observarse en la Figura 23, la expresión génica de S100A8 y S100A9, así como de las citoquinas proinflamatorias IL6 y TNF, estuvo claramente aumentada en las hembras WT respecto a las hembras NR3C1^{ΔIEC}. Sorprendentemente, no es así en los machos, donde, en el caso de *S100a8*, sucedió lo contrario: los niveles de expresión son más altos en NR3C1^{ΔIEC} que en WT. Se aprecia una tendencia similar con *Tnf* e *Il6*.

Posteriormente, se analizó la expresión proteica de S100A9 y la fosforilación de STAT3 mediante *western blot*.

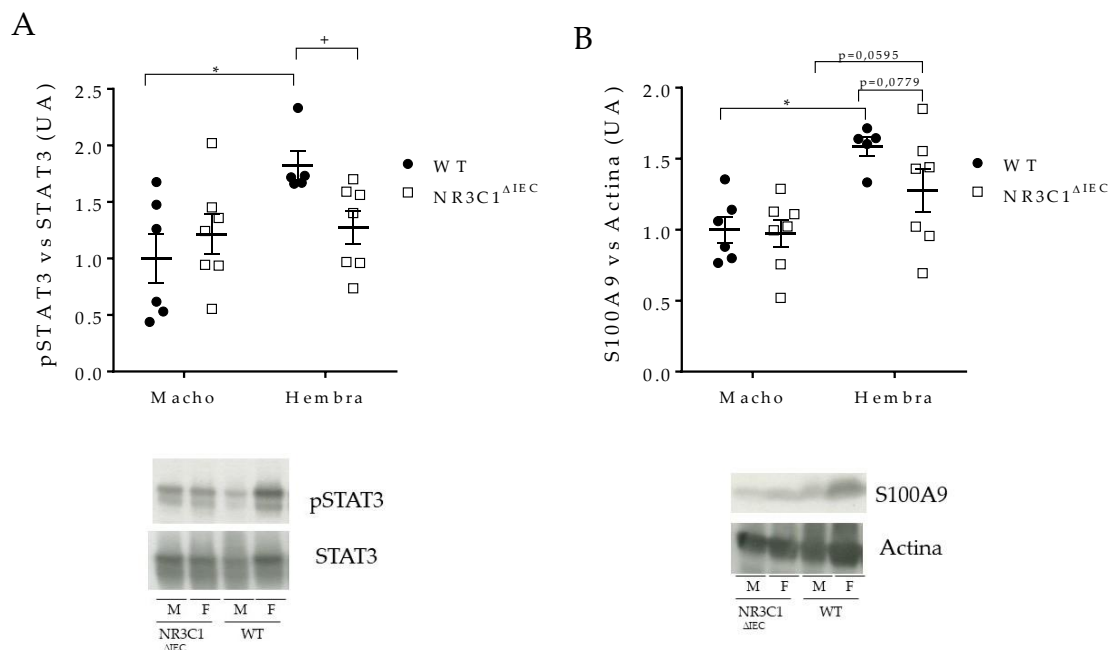


Figura 24. Expresión proteica de parámetros inflamatorios mediante western blot.

Cuantificación de la expresión pSTAT3 y STAT3 (A) y S100A9 (B) en extractos proteicos totales de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, Machos (M) y Hembras (H) tras 5 días de tratamiento con budesonida 60 μg/ratón/día y DSS al 2,5% en agua de bebida. (UA=Unidades arbitrarias) (n=5-7). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Macho vs Hembra.

Aunque, a nivel proteico, las diferencias entre genotipos y sexo no fueron tan marcadas, en las hembras WT hay un incremento significativo de la fosforilación de STAT3 comparado con el sexo y genotipo contrario (Figura 24A), lo cual se traduce en un aumento de la expresión de S100A9, esta vez no significativo, entre las hembras de ambos genotipos.

En conclusión, a nivel de parámetros inflamatorios, la pérdida de GR en el epitelio intestinal tiene un papel protector frente a la colitis tratada con dosis altas

de budesonida en las hembras, mientras que en el caso de los machos no parece producir ningún efecto destacable.

3.2.3 Estudio de parámetros relacionados con la proliferación epitelial en colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} tratados con altas dosis de budesonida durante la colitis inducida por DSS.

Debido a la actividad antiproliferativa de los GC, se estudió la proliferación celular en el colon de estos ratones. Mediante RT-qPCR se midieron los genes que codifican ciclina D1 y cMyc, esenciales en la regulación del ciclo celular.

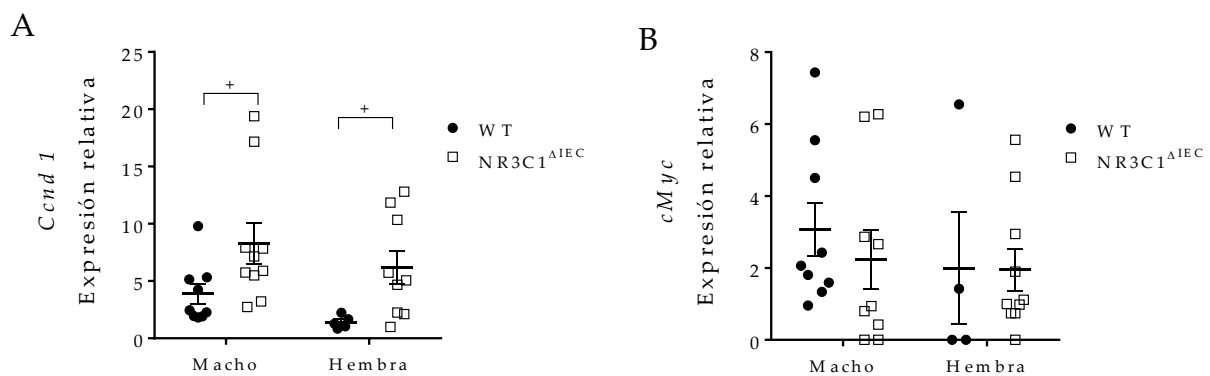
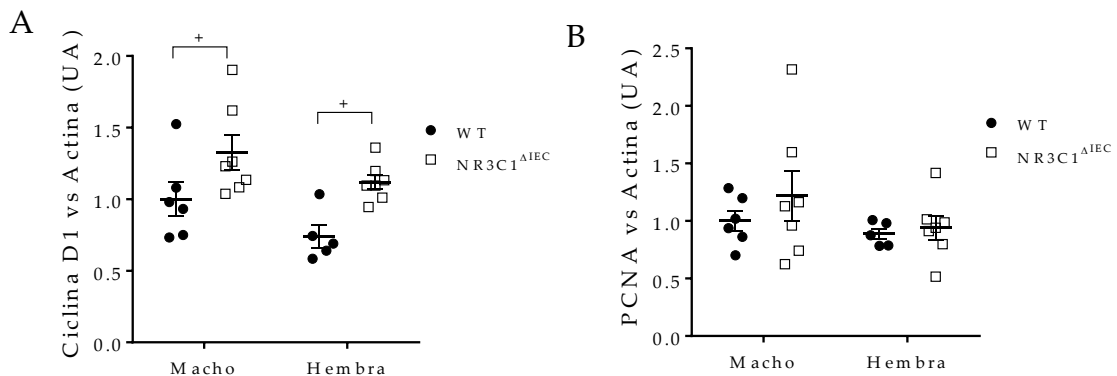


Figura 25. Expresión génica de parámetros relacionados con la proliferación celular. Expresión génica de Ciclina D1 (A) y cMyc (B) por RT-qPCR en tejido colónico completo de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} sometidos a 60 μg/día/ratón de budesonida y DSS al 2,5% en agua de bebida durante 5 días consecutivos. *Hprt* y *18s* fueron usados como genes de referencia. (n=4-10). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Macho vs Hembra.

Aunque no hubo diferencia alguna entre grupos en la expresión génica de cMyc, la ausencia de GR en el epitelio intestinal genera un aumento significativo en la expresión génica de ciclina D1 (Figura 25). Se decidió medir los niveles proteicos de la misma, además de PCNA, también relacionada con la proliferación celular.



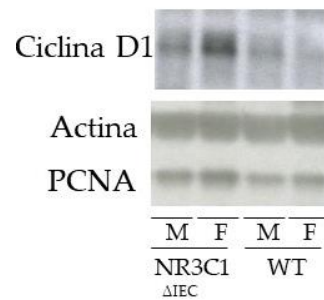


Figura 26. Expresión proteica de parámetros relacionados con la proliferación celular mediante *western blot*. Cuantificación de la expresión ciclina D1 (A) y PCNA (B) en extractos proteicos totales de colon de ratones WT y NR3C1 Δ IEC, Machos (M) y Hembras (H) tras 5 días de tratamiento con budesonida 60 μ g/ratón/día y DSS al 2,5% en agua de bebida. (UA=Unidades arbitrarias) (n=5-7). Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1 Δ IEC.

Como puede verse en la Figura 26A, a nivel proteico también hay un aumento de ciclina D1 debido a la ausencia de GR en el epitelio intestinal. No así en la expresión de PCNA (Figura 26B). En contraposición a la respuesta inflamatoria, en proliferación celular no hay diferencias en función del sexo.

3.2.4 Parámetros relacionados con el receptor de glucocorticoides y el sexo.

Con el objetivo de intentar dilucidar a qué eran debidas las diferencias en la respuesta inflamatoria en machos y hembras anteriormente expuestas, se midió por RT-qPCR en colon la expresión de *Tsc22d3*, gen que codifica la proteína GILZ, la cual media buena parte de las respuestas del GR, y que por tanto puede correlacionarse con la activación de éste. Se midió también la expresión génica del propio GR. (Figura 27A y B).

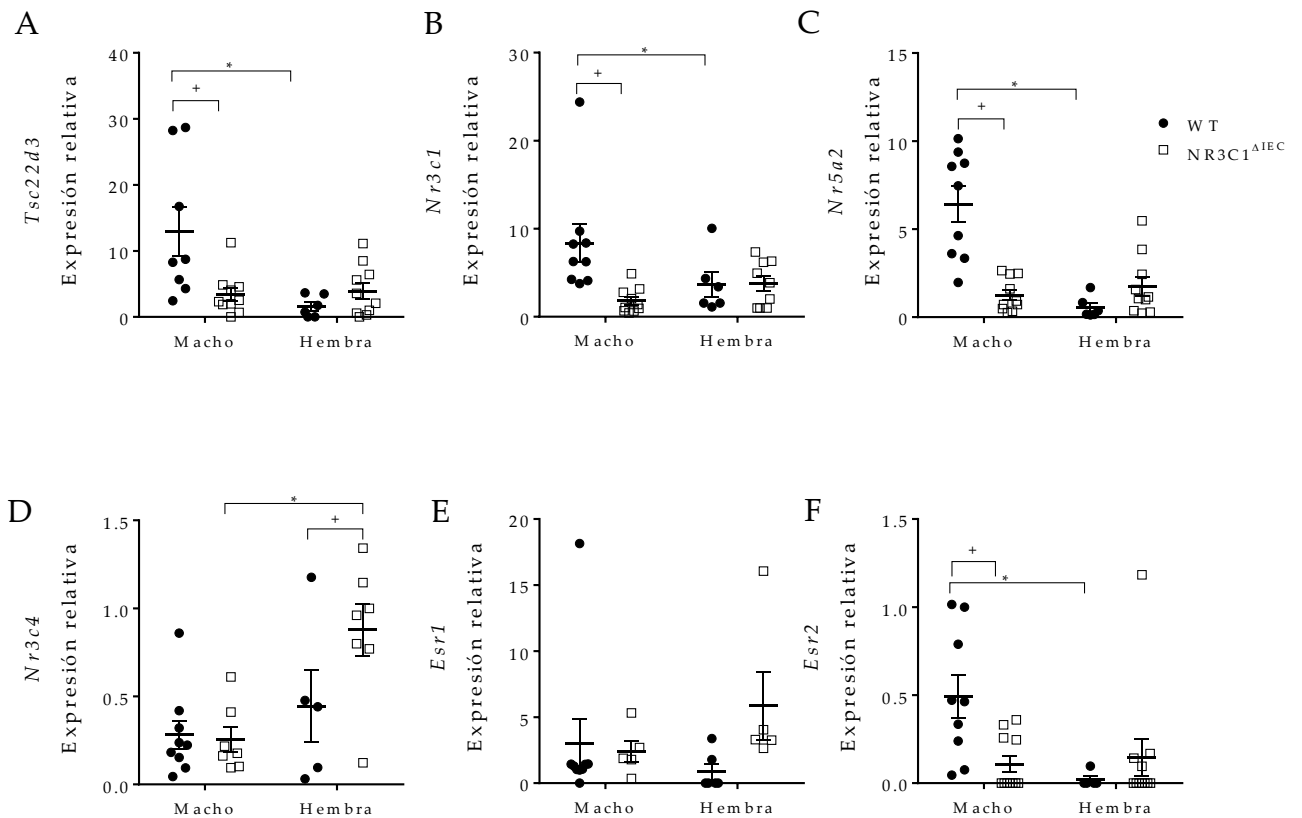


Figura 27. Expresión génica de parámetros relacionados con la activación del receptor de glucocorticoides y el sexo. Expresión génica de GILZ (A), receptor de glucocorticoides (B), LRH-1 (C), receptor de antrógenos (D), receptor de estrógenos α (E) y receptor de estrógenos β (F), por RT-qPCR en tejido colónico completo de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} sometidos a 60 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{ratón}$ de budesonida y DSS al 2,5% en agua de bebida durante 5 días consecutivos. *Hprt* y *18s* fueron usados como genes de referencia. (n=5-10). Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. * $P < 0,05$ WT vs NR3C1^{ΔIEC}; * $P < 0,05$ Macho vs Hembra.

Como puede verse en la Figura 27A, las hembras WT fueron las que tuvieron niveles de expresión de *Tsc22d3* más bajos, significativamente menores que los machos de su mismo genotipo, pero similares a los de las hembras NR3C1^{ΔIEC}. Los machos NR3C1^{ΔIEC} presentaron asimismo una expresión baja, comparable a las de los dos grupos de hembras, y significativamente menor que los machos WT. En cuanto al GR, es importante recordar que los ratones NR3C1^{ΔIEC} carecen de receptor únicamente en el epitelio intestinal. El resto de tipos celulares, incluyendo las células inmunes infiltradas en el colon (en este caso en gran número), sí que lo expresan. El perfil de la gráfica Figura 27B es bastante similar al de *Tsc22d3*. Igualmente, la expresión de LRH-1 (*Nr5a2*), principal factor de transcripción al que se achaca el control de la esteroidogénesis intestinal, siguió el mismo patrón (Figura 27C).

Se midieron también los niveles de *Nr3c4* (gen que codifica el receptor de andrógenos), *Esr1* (receptor de estrógenos α) y *Esr2* (receptor de estrógenos β) mediante RT-qPCR para comprobar si las diferencias entre sexos tenían algo que ver con la diferente expresión de receptores sexuales en el colon, en especial los receptores de estrógenos, debido a su actividad pro- y antiinflamatoria. Los niveles de expresión de los receptores fueron diferentes en machos y hembras, pero paradójicamente mayor en el caso del receptor androgénico en hembras, y viceversa (Figura 27 D-F). Lo más importante a destacar es la expresión del receptor de estrógenos β , la cual disminuye en el colon de pacientes con EII activa, de forma inversamente proporcional a los niveles de IL6 [514]. En nuestro caso, igualmente, el grupo más afectado (hembras WT) tuvo los niveles de expresión colónica más bajos del receptor de estrógenos β y los más altos de IL6, así como valores bajos de GR, de *Tsc22d3*, y de LRH. En todo ello el GR del epitelio intestinal parece tener un papel fundamental, pues estas diferencias entre sexos no ocurrieron en su ausencia.

4 Implicación del receptor de glucocorticoides del epitelio intestinal en la esteroidogénesis local y sistémica.

Como se ha mostrado en el apartado 1.3, el GR del epitelio intestinal parece tener un papel perjudicial durante la colitis experimental. A su vez, la delección del receptor parece tener efectos sobre los niveles plasmáticos de corticosterona. En consecuencia, decidimos estudiar el impacto de la supresión del gen *Nr3c1* en el epitelio intestinal sobre la producción de glucocorticoides en la colitis experimental por DSS, tanto a nivel intestinal como sistémico.

4.1 Estudio de la esteroidogénesis local y sistémica durante la evolución de la colitis.

Debido a que la evolución de los ratones $NR3C1^{\Delta IEC}$ durante la colitis es cambiante, de forma que su estado empeora respecto al grupo WT al comienzo del tratamiento con DSS, pero mejora en las últimas fases de la colitis, optamos por evaluar los ratones en más puntos temporales, midiendo los niveles de corticosterona tanto a nivel sistémico (plasma) como local (explantes de colon). Así pues, se sacrificaron y evaluaron ratones a los días 3, 5 y 7 desde la adición de DSS al 2,5% en el agua de bebida de los ratones.

Los niveles de corticosterona plasmática y la producida por explantes de colon se muestra en la Figura 28.

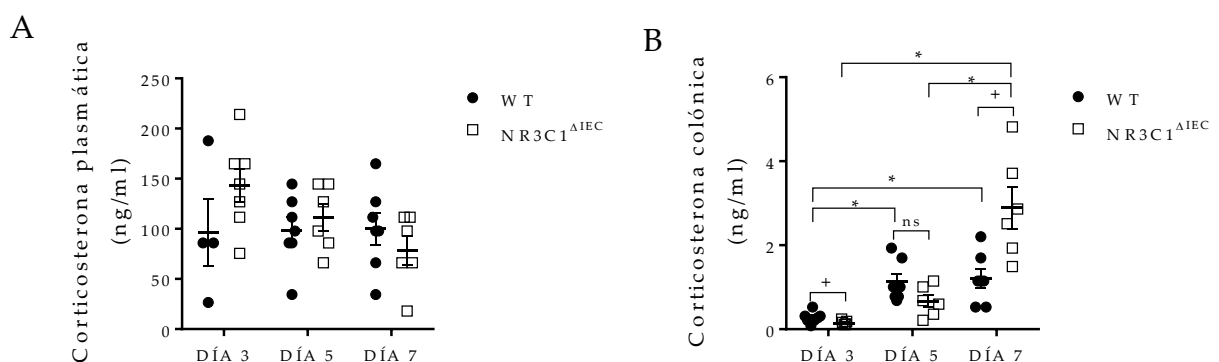


Figura 28. Producción de corticosterona. Niveles de corticosterona plasmática (A) y corticosterona producida por explantes de colon (B) tras 24 h de incubación en un medio caernte de GC. Los explantes proceden de ratones WT y $NR3C1^{\Delta IEC}$ sacrificados a los días 3, 5 y 7 del inicio de colitis inducida por DSS en agua de bebida al 2,5% (n=4-7). Las medidas

se hicieron mediante ELISA. Datos normalizados con valor de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. * $P < 0,05$ NR3C1 ^{Δ IEC} vs. WT; * $P < 0,05$ diferente punto temporal; ns= no significativo.

No se apreció ninguna diferencia entre genotipos en la concentración plasmática de corticosterona a los días 3, 5 o 7 de la administración de DSS, aunque los niveles tendieron a ser algo mayores al tercer día en el caso de los ratones NR3C1 ^{Δ IEC}. Por otro lado, el GR del epitelio intestinal pareció tener un papel clave en la producción de corticosterona local en el colon. Como puede verse en la Figura 28B, en el día 3 de DSS los ratones WT produjeron una mayor cantidad de corticosterona que los NR3C1 ^{Δ IEC}. Sin embargo, a medida que fue avanzando la colitis esta diferencia se invirtió, de forma que hubo igual producción a 5 días de colitis, y claramente mayor en ratones NR3C1 ^{Δ IEC} a los 7 días. Como cabría esperar, se produjo un aumento progresivo en ambos genotipos a medida que avanzó la colitis.

Estos datos se correlacionan a la perfección con la evolución de pesos de ratones WT y NR3C1 ^{Δ IEC} durante la colitis experimental expuesta en los antecedentes (Figura 4), y en parte podría explicar el efecto protector de la ausencia de GR en el epitelio intestinal, ya que un aumento de la producción local de corticosterona puede reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cabe recordar que en el experimento inicial no se apreciaron diferencias entre genotipos en la producción de corticosterona por explantes de colon a día 7 de colitis, por razones desconocidas.

Mediante RT-qPCR se analizaron las principales enzimas implicadas en la esteroidogénesis local en el colon (Figura 29).

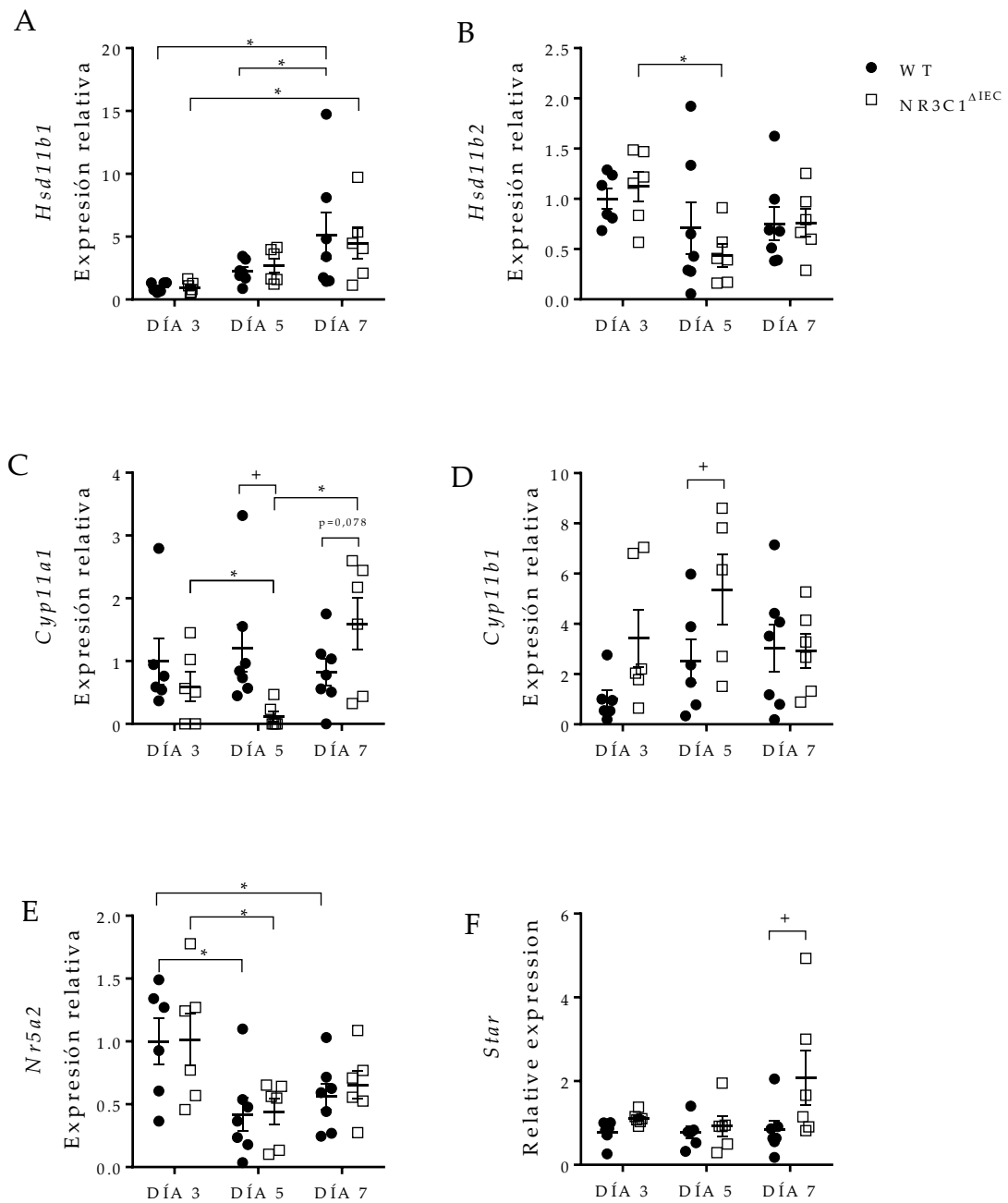


Figura 29. Expresión génica de proteínas relacionadas con la esteroidogénesis local en el colon de ratón. Expresión génica de *11bhsd1* (A), *11bhsd2* (B), *Cyp11a1* (C), *Cyp11b1* (D), *Nr5a2* (E) y *Star* (F) en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los días 3, 5 y 7 del inicio de colitis inducida por DSS en agua de bebida al 2,5% (n=6-7). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías *P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT; *P<0,05 diferente punto temporal.

Las enzimas 11βHSD1 (*Hsd11b1*) y 11βHSD2 (*Hsd11b2*) son las encargadas de la activación y desactivación de corticosterona a 11-deoxicorticosterona, respectivamente. No hubo diferencias entre genotipos en la expresión de ninguna de las dos, pero sí entre los diferentes puntos temporales de la colitis (Figura 29A

y B). Es importante resaltar que se produjo un aumento progresivo en la expresión de 11 β HSD1 a lo largo de la colitis, por lo que esta enzima podría estar implicada en el aumento gradual de la producción de corticosterona, particularmente en ratones WT. En cuanto a la enzima CYP11A1 (*Cyp11a1*) (Figura 29C), enzima que cataliza el primer paso en la generación *de novo* de GC, no se observó en cambio ese aumento progresivo. Sin embargo, en ausencia de GR intestinal sí hubo un incremento significativo a día 7 con respecto al día 5 y, casi significativo en el punto final de la colitis con respecto a ratones WT. Así pues, este dato sugiere que el aumento de producción de corticosterona colónica en el día 7 en animales NR3C1^{ΔIEC} con respecto a WT puede estar asociado a un aumento en la síntesis *de novo*.

CYP11B1 (*Cyp11b1*), enzima que cataliza el último paso en la generación de corticosterona, no sufrió cambios a lo largo del tiempo, ni tampoco entre genotipos, exceptuando una mayor expresión en ausencia de GR en el día 5 de colitis.

LRH-1 (*Nr5a2*) es un factor de transcripción con importantes funciones en la regulación de la esteroidogénesis. Su expresión no explica los cambios en la producción de corticosterona, pues se produjo una disminución en su expresión génica cuando aumentan los niveles de corticosterona colónica (Figura 29E).

Por último, StAR, (*Star*), proteína implicada en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, proceso limitante en la producción de corticosterona, sufrió un gran aumento en su expresión génica en la última fase de la colitis únicamente en animales NR3C1^{ΔIEC}, lo cual se correlaciona con la expresión de *Cyp11a1* y los niveles colónicos de corticosterona, lo que nuevamente sugiere una relación mecánica.

Mediante *western blot* se analizaron varios parámetros que se relacionan con la actividad del GR. Se quiso también medir la expresión proteica de CYP11A1, pero no pudieron detectarse niveles suficientes en colon.

No hubo cambios a lo largo de la colitis, ni entre genotipos, en la fosforilación del GR (Figura 30A). En cuanto a STAT3, uno de los principales factores de transcripción activados por el receptor, sí que se produjo un aumento de su fosforilación al inicio de la colitis (día 3) en el grupo WT, en comparación con los animales NR3C1^{ΔIEC} (Figura 30B).

En cuanto a la expresión génica de *Tsc22d3* (Figura 30C), tampoco se correlacionó con el incremento en los niveles de corticosterona plasmática,

presentando una expresión mayor el día 3 que en etapas posteriores de colitis, y significativamente mayor en WT que en NR3C1^{ΔIEC} en este punto.

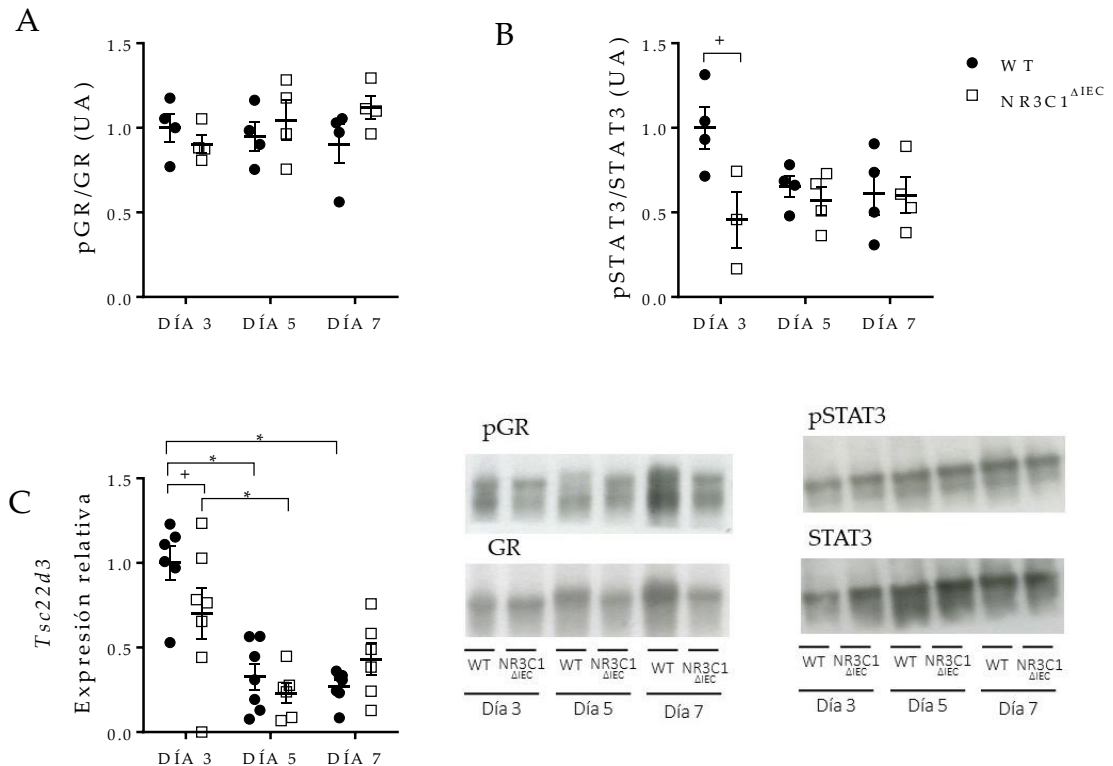


Figura 30. Parámetros relacionados con la activación del GR colónico. Expresión proteica de la ratio p-GR/GR (A) y p-STAT3/STAT3 (B) medida mediante *western blot*. Expresión génica de *Tsc22d3* (C) mediante RT-qPCR en muestras de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los días 3, 5 y 7 del inicio de colitis inducida por DSS en agua de bebida al 2,5% (n=6-7). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. +P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT; *P<0,05 diferente punto temporal.

4.2 Estudio de la esteroidogénesis local en ratones adrenalectomizados.

Debido a que los ratones NR3C1^{ΔIEC} en estado basal presentaron mayores niveles de corticosterona plasmática a los 14 días de la pérdida de GR intestinal en comparación con los WT (Figura 3), y que, en fases avanzadas de colitis, los animales NR3C1^{ΔIEC} produjeron mayor cantidad de corticosterona colónica (Figura 28 y Figura 29), se planteó la hipótesis de que, ante la ausencia de adrenes, el colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} no sólo fuera capaz de producir corticosterona para mantener la homeostasis local, sino que quizá podría suplir en parte la deficiencia de producción sistémica de GC, al igual que sucede en ratones que carecen de GR en la epidermis [127].

Así pues, animales tanto WT como NR3C1^{ΔIEC} fueron adrenalectomizados (ADX). Se incluyeron también controles de ambos genotipos que sufrieron la

misma operación quirúrgica pero que conservaron las glándulas suprarrenales (SHAM). Los animales fueron sacrificados a los 7 días de la operación.

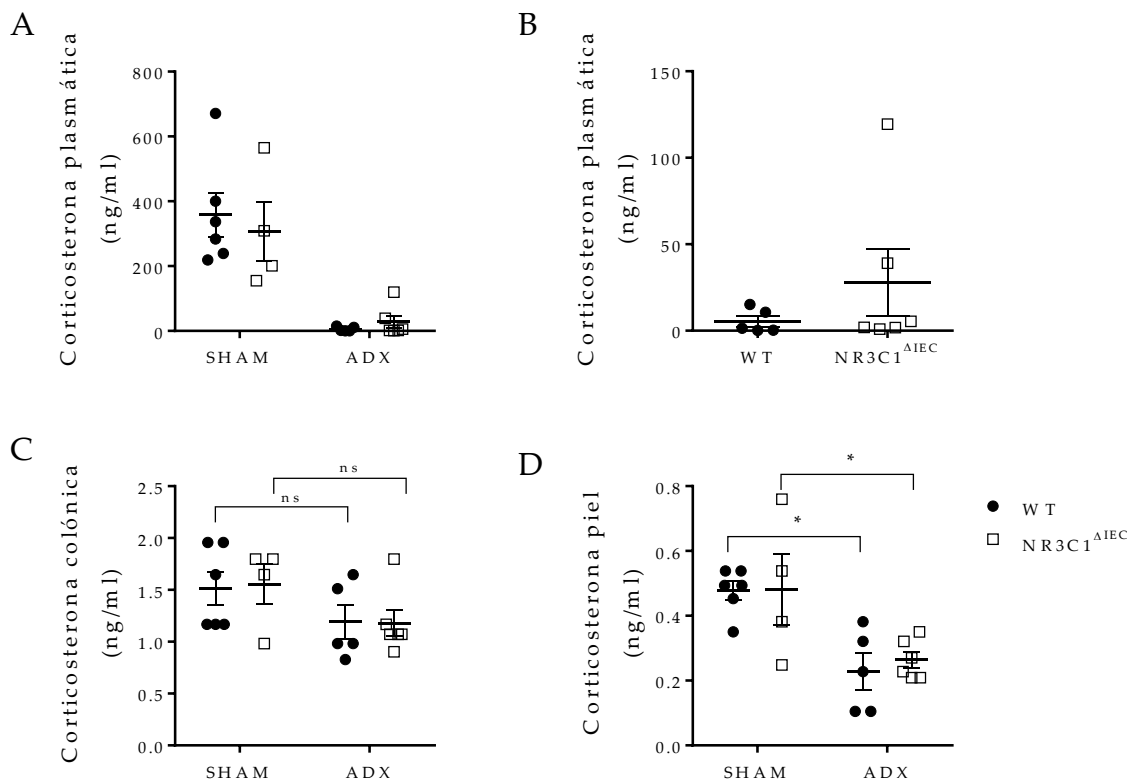


Figura 31. Niveles de corticosterona tras adrenalectomía. A. Corticosterona plasmática B. Ampliación de gráfica A incluyendo sólo animales ADX. C. Corticosterona producida por explantes colónicos tras 24h de incubación en un medio caernte de GC. D. Corticosterona producida por explantes de piel tras 24h de incubación en un medio caernte de GC de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} adrenalectomizados (ADX) o no (SHAM) tras una semana de la operación quirúrgica(n=4-6). Las medidas se hicieron mediante ELISA.Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías *P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT; *P<0,05 ADX vs SHAM.

En la Figura 31A se puede comprobar que la adrenalectomía tuvo los resultados esperados, es decir, los niveles plasmáticos de corticosterona cayeron drásticamente a causa de la extirpación quirúrgica. En la Figura 31B, que sólo incluye los niveles plasmáticos de corticosterona de ratones ADX, puede observarse mejor que dos muestras del grupo NR3C1^{ΔIEC} presentaron niveles mayores que el resto del grupo, encontrándose dentro de los rangos normales (ha de aclararse que los ratones SHAM tuvieron niveles de corticosterona plasmática altos, probablemente debido a la propia intervención quirúrgica). Curiosamente,

esos dos valores correspondieron a las dos únicas hembras del grupo NR3C1^{ΔIEC} ADX.

En cuanto a los niveles de corticosterona colónica, se apreció una cierta tendencia a la baja (~20%) como consecuencia de la ausencia de glándulas suprarrenales, de carácter no significativo, y por igual en ambos grupos (Figura 31C). Por el contrario, en el medio de cultivo de explantes de piel sí que se observó una disminución en los niveles de corticosterona, en torno al 50%, y de nuevo sin diferencias en relación con el genotipo. Estos resultados sugieren que, en el ratón, la piel depende en mayor medida de la producción central de GC que el colon, que es esencialmente independiente.

Se analizó a continuación la activación del GR colónico. Se observó un aumento de la fosforilación del GR del colon en animales NR3C1^{ΔIEC}, significativa sólo en animales sin glándulas suprarrenales. Además, en ratones WT se produjo una disminución de la fosforilación del receptor con la adrenalectomía, lo cual no ocurrió en los ratones NR3C1^{ΔIEC} (al menos, no de forma significativa), sin que se produjeran cambios en la expresión del receptor (Figura 32 A y B). En cuanto a STAT3, no se observó ninguna diferencia en su estado de fosforilación (Figura 32B).

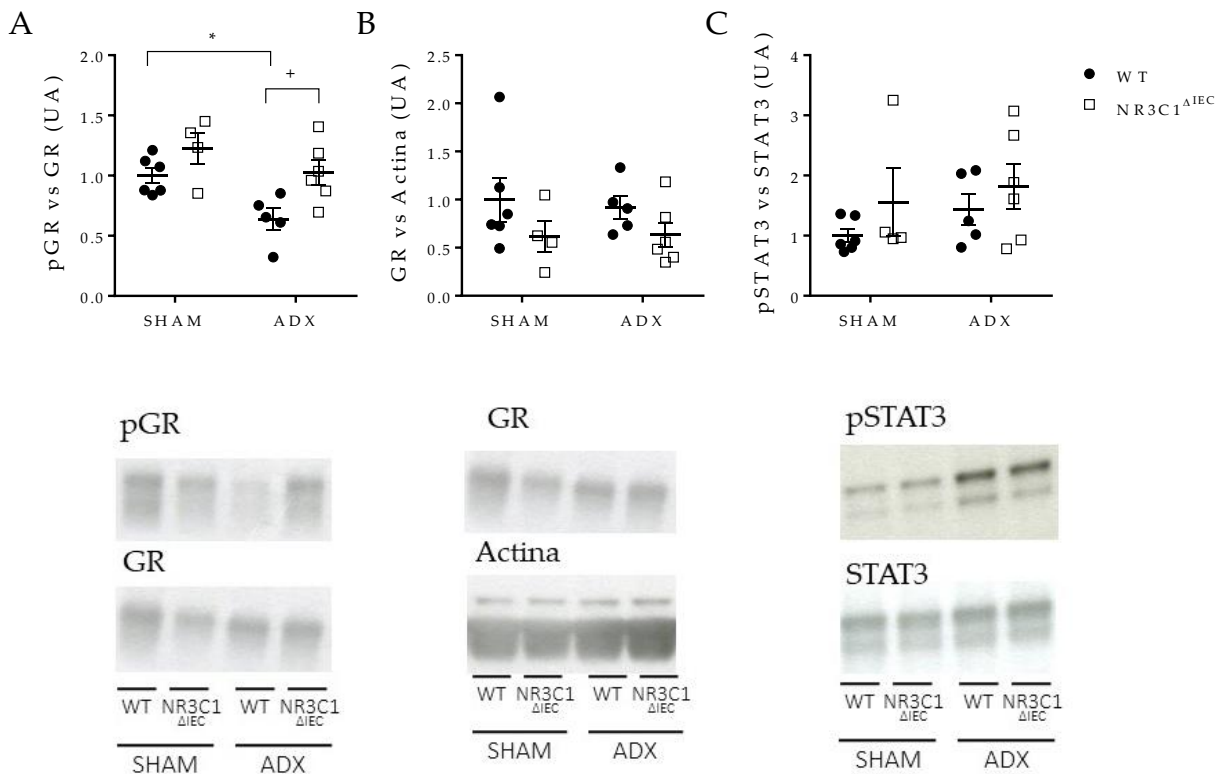
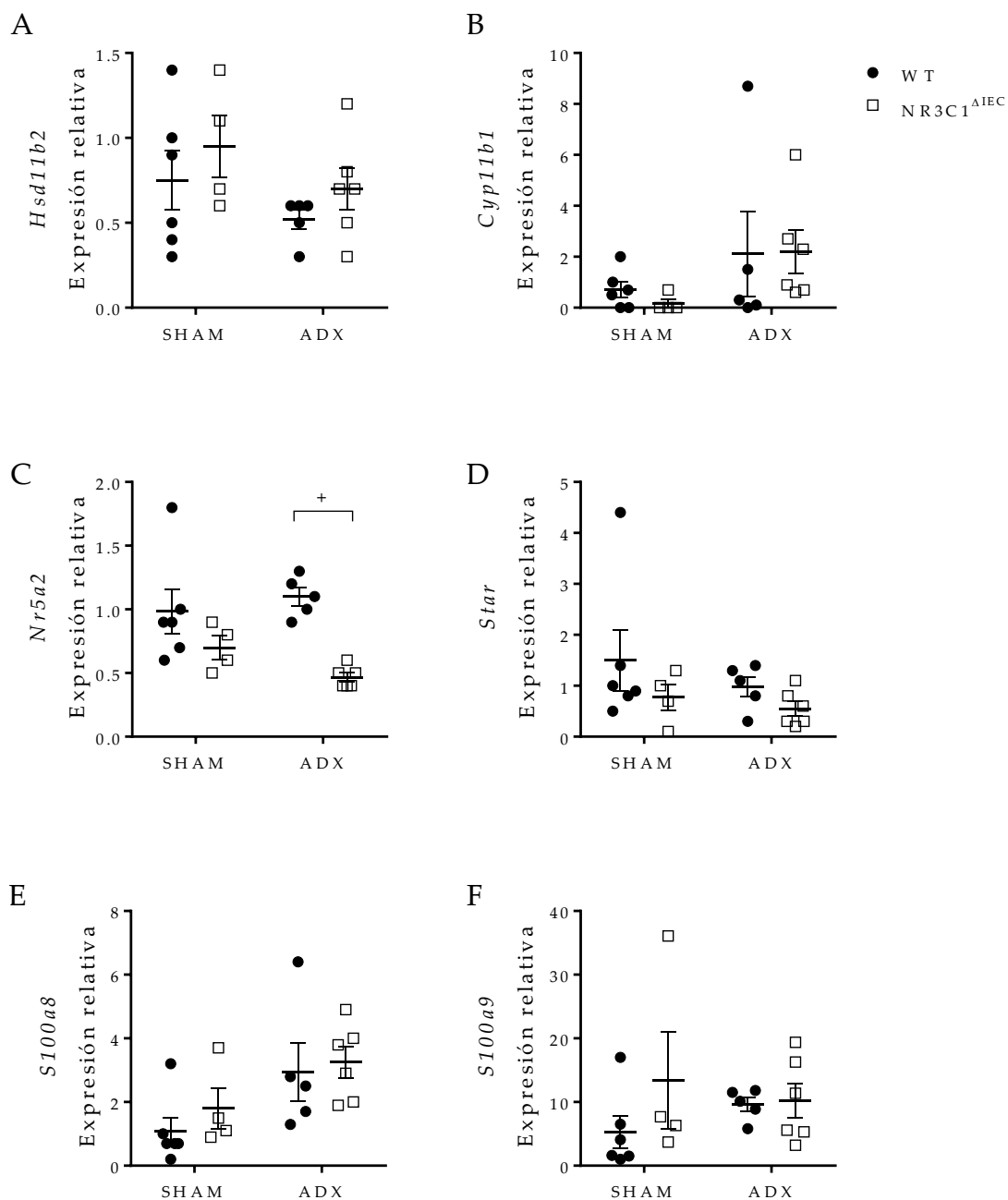


Figura 32. Parámetros relacionados con la activación del GR colónico. Expresión proteica de la ratio p-GR/GR (A), GR/Actina (B) y p-STAT3/STAT3 (C) medida mediante *western blot* en

el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} adrenalectomizados (ADX) o no (SHAM) tras una semana de la operación quirúrgica (n=4-6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT; *P<0,05 ADX vs SHAM.

Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión génica de parámetros relacionados con la esteroidogénesis colónica. En este caso, probablemente debido a que eran ratones sin inflamación colónica, la expresión de los genes *Cyp11a1* y *Hsd11b1* no fue suficiente para poder cuantificarla. No hubo grandes diferencias debido a la adrenalectomía ni a la ausencia de GR. Sí que se observó una tendencia a aumentar en la expresión de *Cyp11b1* en animales adrenalectomizados (Figura 33B), y una



disminución en la expresión del gen que codifica LRH-1 en animales NR3C1^{ΔIEC} ADX con respecto a los WT (Figura 33C).

Figura 33. Expresión génica de parámetros relacionados con la esteroidogénesis local y la inflamación en el colon de ratones adrenalectomizados. Expresión génica de *11bhsd2* (A), *Cyp11b1* (B), *Nr5a2* (C), *Star* (D), *S100a8* (E) y *S100a9* (F) en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} adrenalectomizados (ADX) o no (SHAM) tras una semana de la operación quirúrgica (n=4-6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT; *P<0,05 ADX vs SHAM.

Tampoco hubo diferencias significativas en cuanto a los marcadores de inflamación (Figura 33E y F). No obstante, los valores fueron generalmente más altos en ambos casos en los animales adrenalectomizados, lo que sugiere una cierta tendencia a la colitis. Esto es coherente con datos anteriores, ya que el sacrificio de los animales se produjo tras dos semanas de la delección, momento en el cual, en ausencia de adrenalectomía, tampoco se observan cambios significativos con respecto al WT en la expresión de *S100a8* y *S100a9* (Figura 2C).

En resumen, la ausencia de GR en el epitelio intestinal en ratones adrenalectomizados no se traduce en diferencias ni en la producción local de GC ni en los niveles plasmáticos, lo que no apoya en principio la hipótesis de que el incremento del primero compense la deficiencia de los segundos, al menos en condiciones basales. Cabe la posibilidad de que, ante un estímulo inflamatorio como la colitis experimental, teniendo en cuenta la mayor producción de corticosterona en las fases tardías de la misma en ratones NR3C1^{ΔIEC} (Figura 28), sí que pueda producirse una compensación de este tipo.

5 NR3C1^{ΔIEC} *in vitro*: Organoides

Con el objetivo de estudiar el fenotipo del epitelio intestinal aislado en ausencia del receptor de GC, independientemente del sistema inmune, se obtuvieron organoides de yeyuno de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

5.1 Respuesta inflamatoria en organoides NR3C1^{ΔIEC}

En primer lugar, se produjo la delección del receptor adicionando tamoxifeno *in vitro*. Como puede comprobarse en la Figura 34A, el tamoxifeno generó la inhibición casi total de la expresión del GR. Mediante RT-qPCR se analizaron diversos genes relacionados con la proliferación y la respuesta inflamatoria. Se hizo tanto en condiciones basales, como tras la estimulación con TNF 10 ng/ml y FBS al 5%, o bien, adicionando además LPS 1 μg/ml. La adición de FBS se debe a que en su ausencia la estimulación por TNF, aunque existente, era muy débil (datos no mostrados).

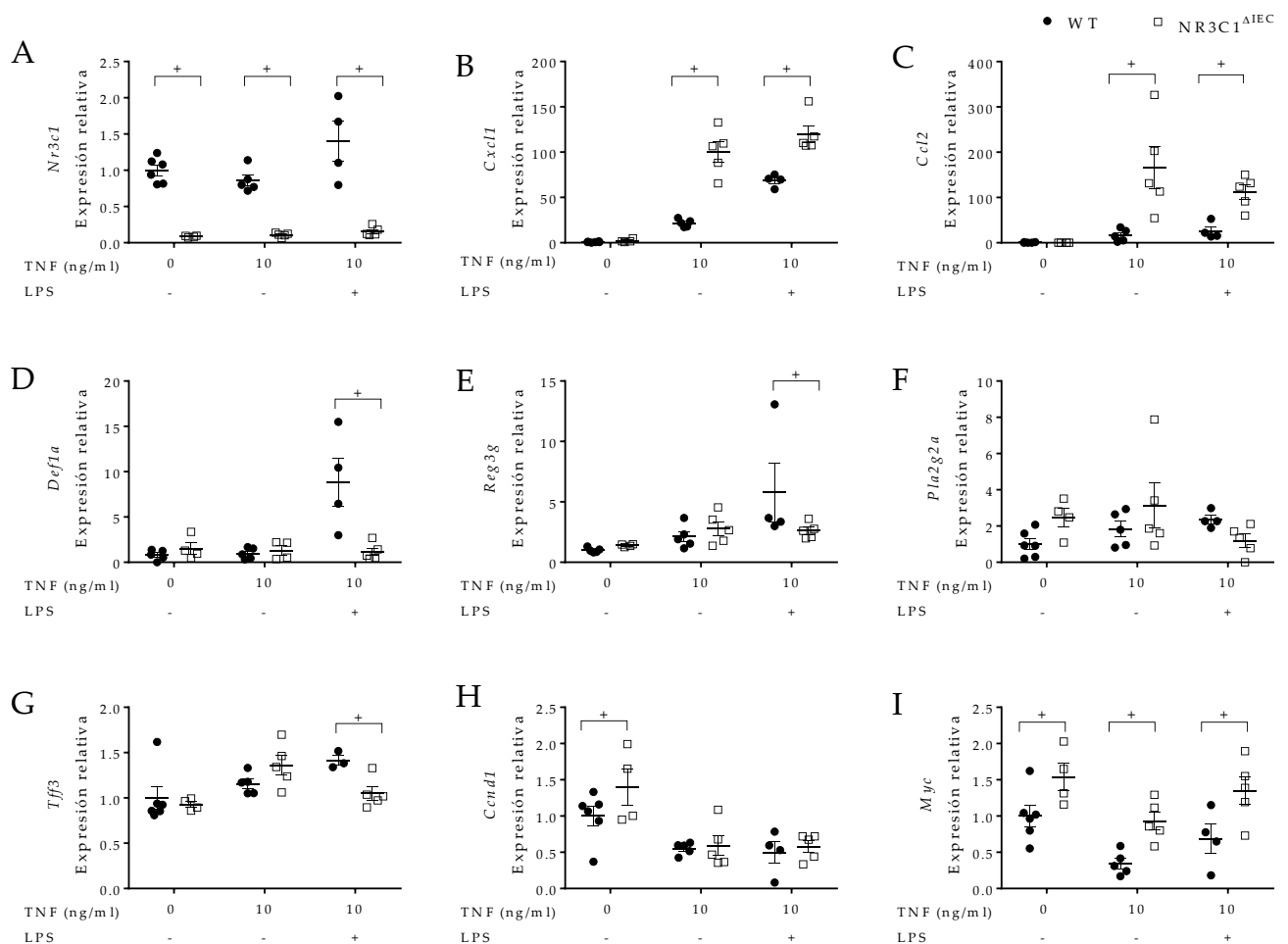


Figura 34. Expresión génica de organoides WT y NR3C1^{ΔIEC}. Expresión génica de *Nr3c1* (A), *Cxcl1* (B), *Ccl2* (C), *Delfa1* (D), *Reg3g* (E), *Pla2g2a* (F), *Tff3* (G), *Ccnd1* (H), *Myc* (I) en organoides de yeyuno de WT y NR3C1^{ΔIEC} medida mediante RT-qPCR. Todos los organoides recibieron tamoxifeno (1 μM, 24 h). La estimulación se indujo con TNF (10 ng/ml) y FBS (5%) durante 4 h y, en los casos indicados, adicionalmente con LPS (1 μg/ml). Los genes de referencia utilizados fueron *18s* y *Ppib* (n=4-6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

Como es de esperar, la adición de TNF+FBS (y LPS) dio lugar a un incremento en la expresión de las quimioquinas *Cxcl1* y *Ccl2*. Este incremento fue mayor en la ausencia del efecto antiinflamatorio orquestado por el GR (Figura 34B).

En el caso de los genes que codifican los péptidos antimicrobianos *Reg3g* (*Regenerating islet-derived protein 3 gamma*) y *Defa1* (Defensina 1α), su expresión sólo se vio aumentada en los organoides WT tras la adición de LPS junto con TNF y FBS. No ocurrió así en el caso de los organoides NR3C1^{ΔIEC}, que mantuvieron la expresión de ambos genes en niveles similares a los basales a pesar de la estimulación (Figura 34D-E).

En el caso de la expresión de la fosfolipasa A2 (*Pla2g2a*), la cual hidroliza fosfolípidos para generar mediadores que intervienen en la respuesta inflamatoria y es a su vez un péptido antimicrobiano, ésta no se vio afectada ni por la estimulación con TNF+FBS y LPS ni por la ausencia de GR (Figura 34F).

La expresión de *Tff3* (*Trefoil factor 3*) presentó un perfil similar al de los péptidos antimicrobianos (Figura 34G). TFF3 es una molécula producida por las células caliciformes implicada en fenómenos de reepitelización tras cualquier daño, contribuyendo así al mantenimiento de la FBI.

Por último, se analizaron genes relacionados con la proliferación celular. En el caso de *Myc*, su expresión en organoides NR3C1^{ΔIEC} es en todos los casos, basal y estimulados, mayor que en los organoides WT. En el caso del gen que codifica la ciclina D1 (*Ccnd1*), esto sólo se cumple en condiciones basales, ya que la estimulación reduce sustancialmente su expresión (Figura 34H-I). Dada la conocida acción antiproliferativa de los GC, el aumento de la expresión de estos genes en organoides NR3C1^{ΔIEC} es totalmente lógico.

Así pues, la ausencia de GR en el epitelio intestinal provoca una mayor producción de quimioquinas, lo que en un organismo completo podría dar lugar a una mayor infiltración leucocitaria y a una respuesta inflamatoria exacerbada. Por otro lado, la deficiencia en el GR parece disminuir la capacidad de las células epiteliales para producir péptidos antimicrobianos como la DEF1α o REG3γ tras

el contacto con LPS, así como de TFF3. Por último, el GR parece ser un claro inhibidor de la proliferación de las células intestinales epiteliales.

5.2 Esteroidogénesis en organoides NR3C1^{ΔIEC}

El análisis de la producción local de corticosterona en organoides resulta de gran interés, pues aquí no hay interferencia alguna de otras posibles fuentes de GC. Estos experimentos se llevaron a cabo bajo estimulación, puesto que la producción basal se considera muy baja. El Dr. Brunner, entre otros, sostiene que el TNF es un inductor central de la esteroidogénesis intestinal, de forma que ésta se reduce notablemente en ratones TNF^{-/-} [12, 74, 80]. Noti *et al.* mostraron que la adición de TNF 10 ng/ml a células intestinales epiteliales de colon de ratón (YAMCs, *young adult mouse colonocytes*) generó un incremento en la expresión de CYP11B1 [73], lo que constituye un correlato de la inducción de esteroidogénesis.

Así pues, añadimos TNF 10 ng/ml, junto con FBS al 5%, a los organoides de ambos genotipos. Además, se adicionó metirapona, un inhibidor de la enzima CYP11B1, con el objetivo de inhibir la biosíntesis *de novo* de GC, o bien su vehículo DMSO (dimetilsulfóxido). Tras 4 h de incubación, se midió la corticosterona en el medio de cultivo y, mediante RT-qPCR, se analizaron varios genes implicados en la esteroidogénesis intestinal.

Lo primero que se hizo fue comprobar que se había producido la delección del GR y que hubiera una correcta estimulación por parte del TNF y FBS.

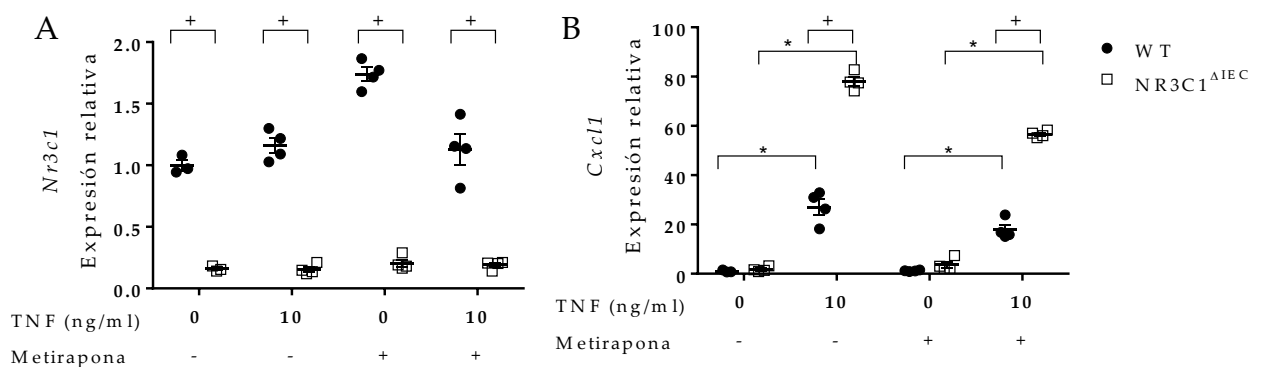


Figura 35. Expresión génica de Nr3c1 (A) y Cxcl1 (B) en organoides de yeyuno de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. Las medidas se hicieron mediante RT-qPCR. Los genes de referencia fueron 18s y Ppib. Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Control vs 10 ng/ml TNF.

Como puede verse en la Figura 35, la delección de *Nr3c1* fue de nuevo casi completa. Además, la adición de TNF+FBS generó un claro aumento en la expresión de *Cxcl1*, mayor en la ausencia de GR, achacable a la ausencia de su acción antiinflamatoria.

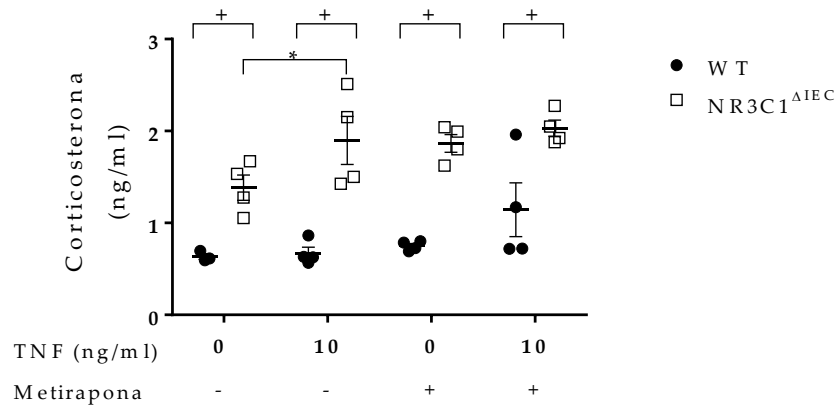


Figura 36. Producción de corticosterona por organoides de yeyuno de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. La corticosterona se midió mediante ELISA (n=4). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Control vs 10ng/ml TNF.

En cuanto a la producción de corticosterona, la adición de TNF no produjo efecto alguno en los organoides WT. Sí se observó un cambio en ausencia de GR. En segundo lugar, la metirapona no redujo en absoluto la producción de corticosterona. De hecho, la tendencia fue más bien la contraria. Es posible que este hecho esté relacionado de alguna manera con las limitaciones impuestas por el medio de cultivo de los organoides. Dicho medio de cultivo (Intesticult) contiene GC, al igual que el FBS añadido en nuestro experimento. Con la adición de metirapona se pretendía poder diferenciar la corticosterona sintetizada *de novo* de la presente en el medio de cultivo. La ausencia de efecto inhibitorio de la metirapona podría reflejar la supresión de la esteroidogénesis como consecuencia del aporte en el medio. Para poder confirmar este extremo será necesario cultivar los organoides en ausencia de GC en el medio, contanto lógicamente con que esto sea posible.

Por último, un resultado especialmente reseñable fue el aumento de la producción de GC en organoides NR3C1^{ΔIEC} (Figura 36), lo que sugiere poderosamente una regulación por retroalimentación negativa de la esteroidogénesis.

A continuación se midió mediante RT-qPCR la expresión de diversos genes relacionados con la esteroidogénesis. Concretamente, se analizó la expresión de StAR, CYP11B1 y LRH-1. En ningún caso la expresión fue mayor en organoides NR3C1^{ΔIEC} que en WT. De hecho, hubo una mayor expresión en organoides WT de *Cyp11b1* y *Star* en condiciones basales, así como también de *Star* ante la estimulación con TNF (Figura 37).

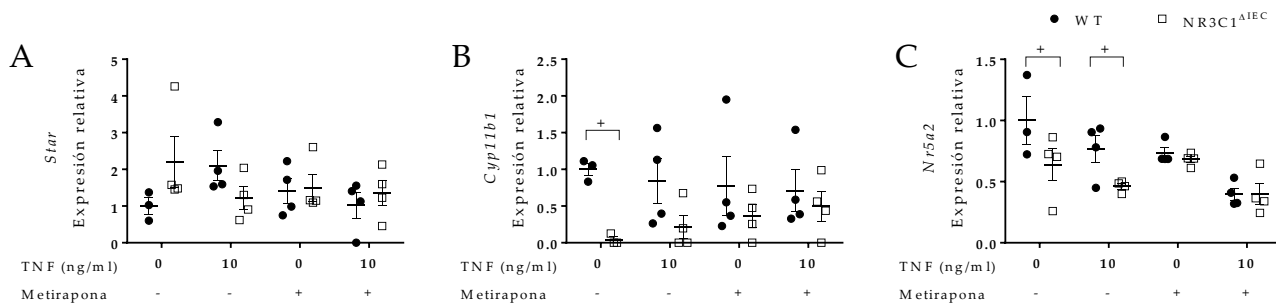


Figura 37. Expresión génica de *Star* (A), *Cyp11b1* (B) y *Nr5a2* (C) en organoides de yeyuno de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. Las medidas se hicieron mediante RT-qPCR. Los genes de referencia fueron *18s* y *Ppib*. Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

6 Implicación del receptor de glucocorticoides del epitelio intestinal en el cáncer colorrectal asociado a colitis.

Dado que en ratones NR3C1^{ΔIEC} hay un aumento de proliferación epitelial, se decidió investigar cómo afectaría la ausencia de GR intestinal al desarrollo de cáncer colorrectal. Se utilizó con este fin un modelo de cáncer colónico asociado a colitis. Así pues, se indujo cáncer colorrectal a ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} utilizando AOM y 3 ciclos de DSS (AOM/DSS). Este modelo reproduce de forma adecuada la secuencia patológica de las lesiones cancerosas en un contexto inflamatorio crónico, que consideramos especialmente relevante en nuestro caso, y es además un modelo efectivo, reproducible y relativamente corto.

6.1 Evolución del estado general de ratones NR3C1^{ΔIEC} en el cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS.

A lo largo de las 10 semanas de experimento, los ratones mantuvieron su peso relativamente constante, dándose una clara bajada de peso únicamente en cada uno de los tres ciclos de DSS, especialmente el primero. La Figura 38 muestra la evolución de pesos de animales WT y NR3C1^{ΔIEC}, sin observarse diferencias claras entre genotipos, aunque la pérdida de peso fue más acusada inicialmente en los ratones delecionados. Como consecuencia del proceso de colitis crónica y la tumorigénesis, los animales apenas presentan ganancia de peso en este período.

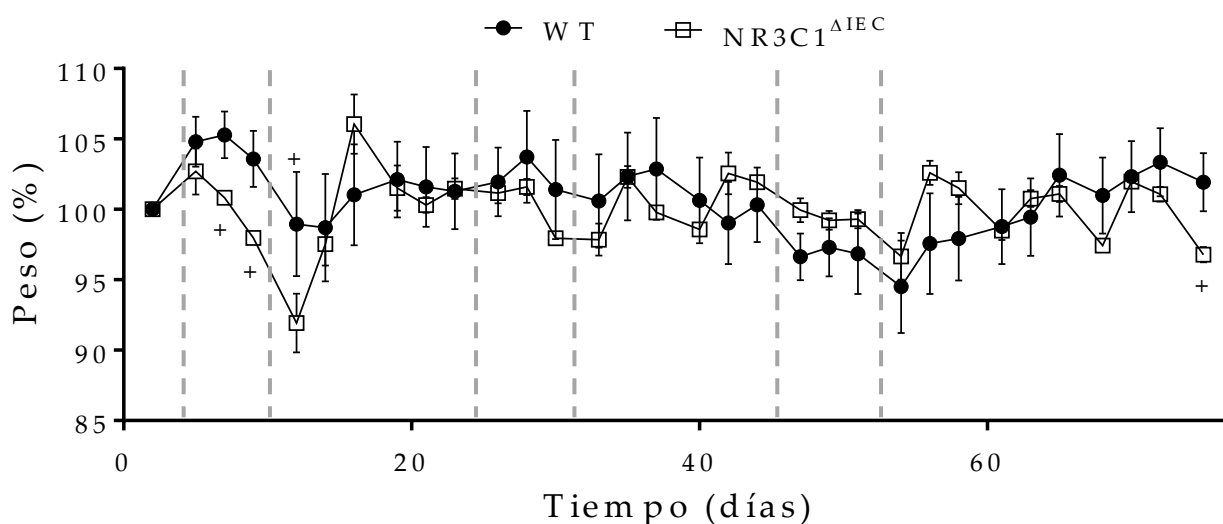


Figura 38. Evolución de pesos en el cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. Evolución del peso de los animales durante el transcurso del cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. Los resultados son expresados como porcentaje de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento (n=10-11). Las líneas

discontínuas marcan los tres ciclos de DSS. La significación estadística se estudió usando múltiples t test. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

Curiosamente, si dividimos por sexos, vuelve a crearse una diferenciación en ratones WT en función del sexo, que no aparece en los animales NR3C1^{ΔIEC}. Sin embargo, en este caso, y a diferencia de lo que se observaba en el experimento de colitis con alta dosis de budesonida, las hembras WT fueron las que menor pérdida de peso presentaron.

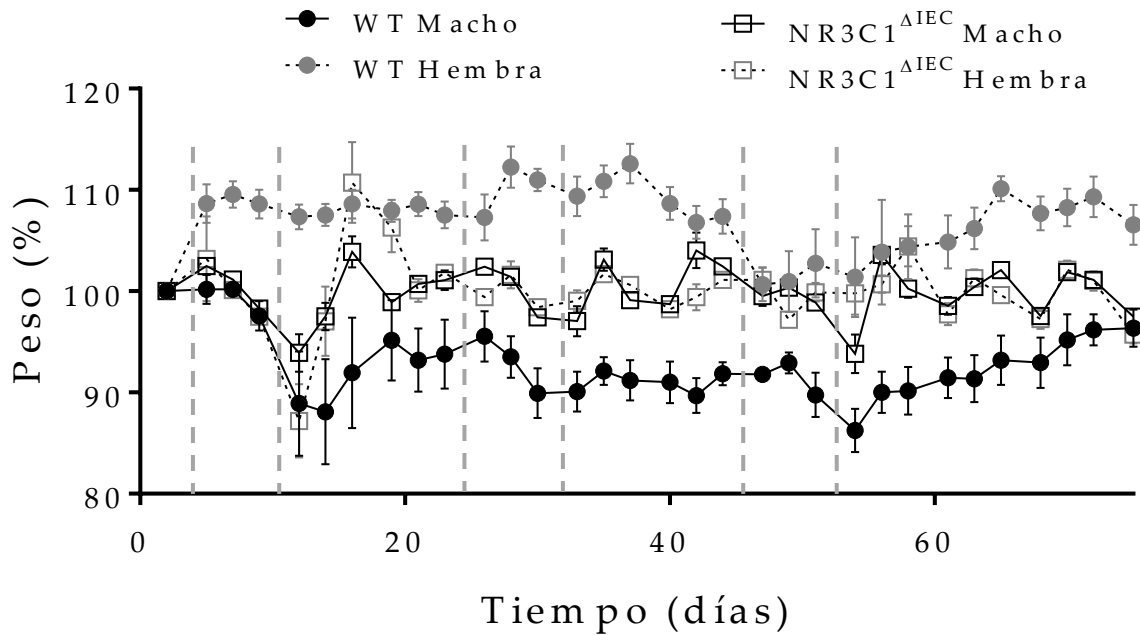


Figura 39. Evolución de pesos en el cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. Evolución del peso de los animales durante el transcurso del cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} de ambos sexos. Las líneas discontinúas marcan los tres ciclos de DSS. Los resultados son expresados como porcentaje de peso, tomando como referencia el día de comienzo del experimento (n=4-6).

En cuanto a la supervivencia, aproximadamente, un 20-30% de los ratones no llegaron al final del experimento. La ausencia de GR no afectó significativamente a la mortalidad (Figura 40), que fue similar en WT y NR3C1^{ΔIEC}.

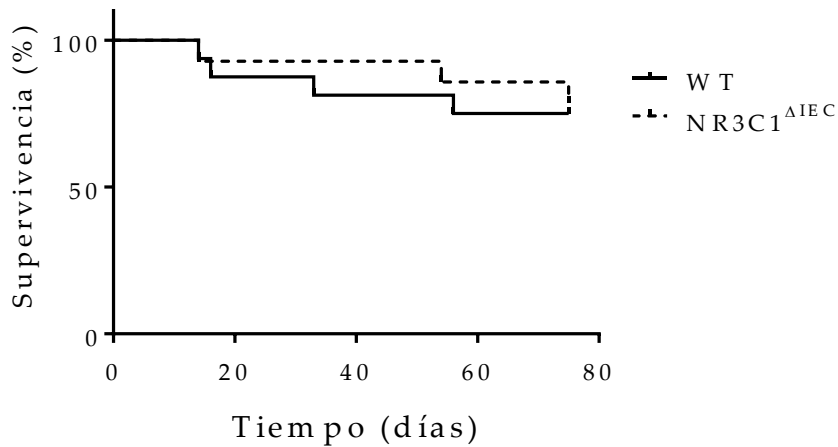


Figura 40. Curva de supervivencia de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} sometidos a cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. La significación estadística se hizo usando el test de Mantel-Cox (n=10-11).

6.2 Aspecto macroscópico y microscópico.

Tras 75 días desde la administración de azoximetano, los ratones fueron sacrificados. La inmensa mayoría presentó tumores visibles en el colon, con un tamaño que oscilaba entre los 1 y 4 mm de diámetro. La incidencia fue del 100%. Contrariamente a lo descrito por diversos autores en este modelo, la localización de los tumores correspondió al colon proximal en algunos casos (Figura 41).

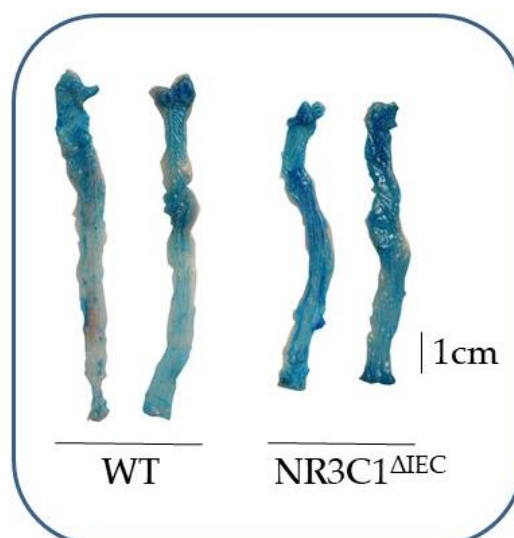


Figura 41. Aspecto macroscópico de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} sometidos a cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. Fotografías representativas.

El colon de los ratones WT presentó una mayor relación peso/longitud (Figura 42A), indicativo en principio de mayor inflamación. Por otro lado, los ratones NR3C1^{ΔIEC} presentaron un mayor número de tumores que sus controles (Figura 42B).

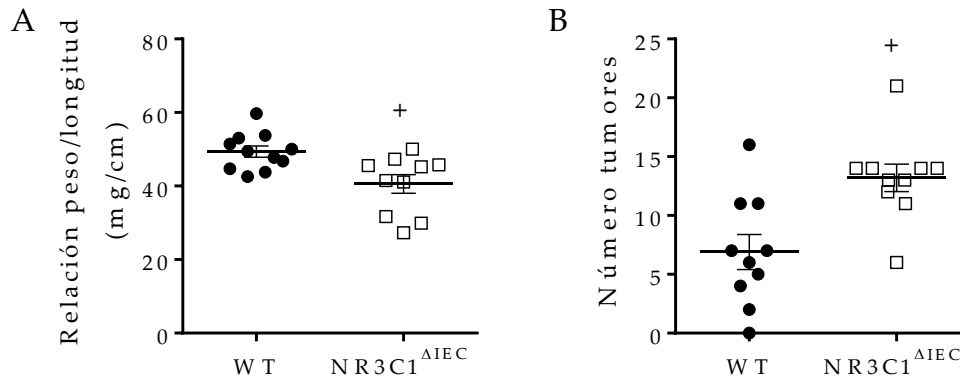


Figura 42. Relación peso/longitud (A) y recuento de tumores (B) en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} en cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando un análisis t-Student. *P<0,05 NR3C1^{ΔIEC} vs. WT.

A nivel microscópico, la tinción con hematoxilina y eosina nos permite estudiar la morfología del tumor y del tejido adyacente, la infiltración y la erosión epitelial, entre otros.

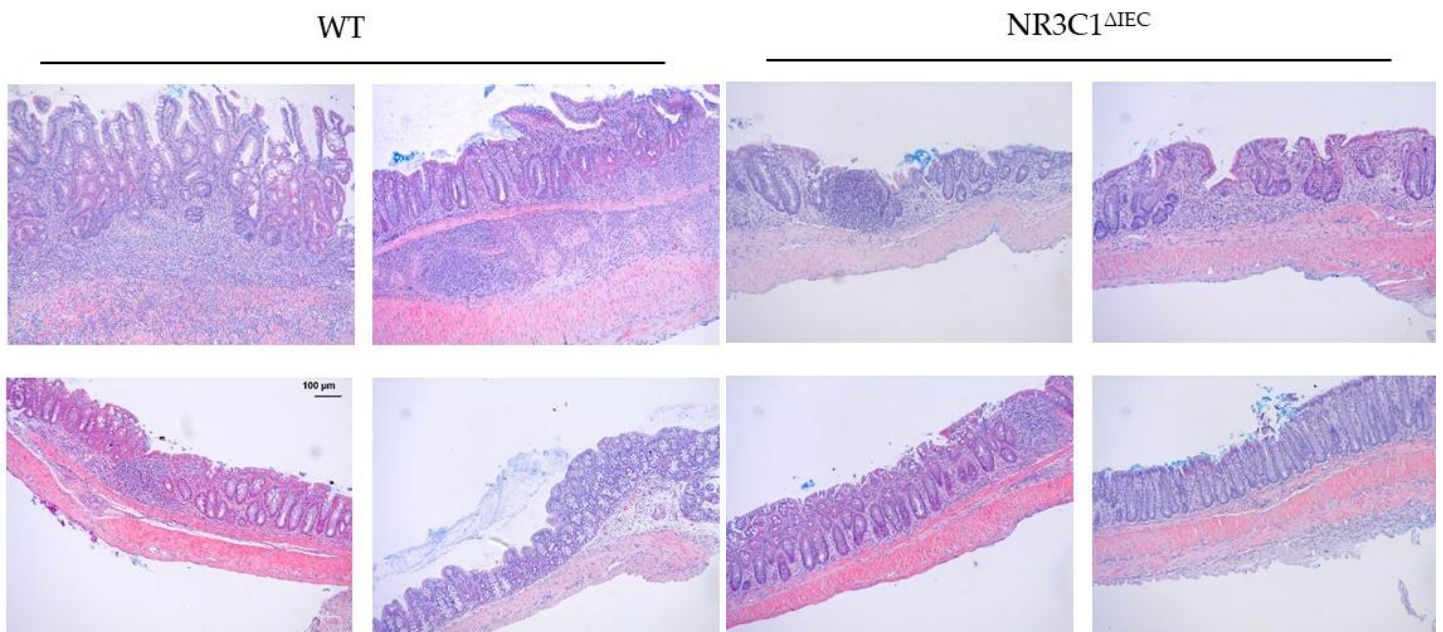


Figura 43. Histología de colon. Fotografías representativas de cortes histológicos con tinción hematoxilina/eosina de colon de de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} en cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS.

La 0 muestra varios cortes representativos de ambos grupos. Como puede verse, hay muestras con claras lesiones neoplásicas (fotos de la parte superior), mientras que otras presentaron una morfología muy similar a la de un colon sano, o con indicios residuales de inflamación (fotos de la parte inferior). Los cortes histológicos fueron evaluados a simple ciego en cuanto a la identidad de la muestra según el criterio descrito en el apartado 3.2.1 de material y métodos. Pudo constatar que los tumores de ratones WT fueron más invasivos que los NR3C1^{ΔIEC} (Figura 43 y Figura 44). En cuanto a pérdida de la estructura y morfología epitelial, así como al tamaño de los tumores, los valores fueron, por el contrario, similares. También fue similar el grado de erosión, de infiltración de linfocitos y displasia (datos no mostrados).

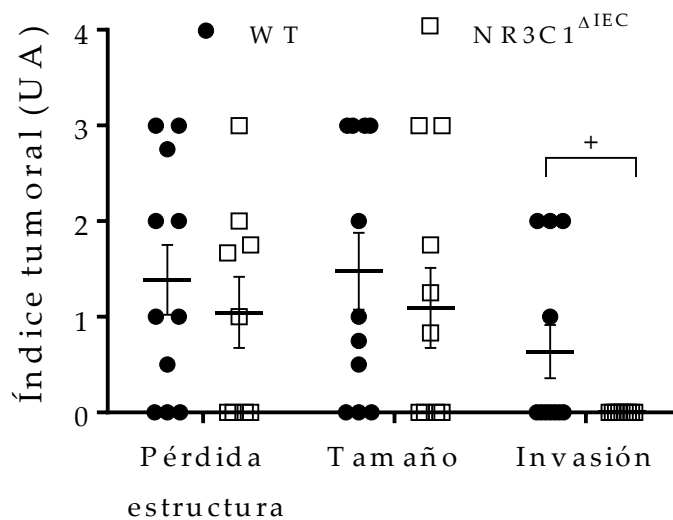


Figura 44. Índice tumoral de cortes histológicos de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} en cáncer colorrectal inducido por AOM/DSS. La evaluación de los diferentes parámetros se hizo a simple ciego. Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando un análisis t-Student.

6.3 Parámetros relacionados con la EMT.

A continuación, se midió por RT-qPCR una serie de genes implicados en EMT, para evaluar si la ausencia de GR en el epitelio intestinal tenía efectos en la transición del epitelio a una forma menos diferenciada y, por tanto, en el desarrollo de cáncer colorrectal. Las muestras usadas para RT-qPCR, así como para *western blot*, correspondieron a un fragmento tumoral y otro fragmento de una zona adyacente con morfología normal. En primer lugar se midieron dos de los principales promotores responsables de la EMT: SNAIL1, también llamado SNAIL (*Snai1*), y SNAIL2 o SLUG (*Snai2*). Se produjo un aumento de la expresión génica de ambos promotores en la zona tumoral de animales NR3C1^{ΔIEC} (Figura 45A y B). De hecho, se apreció la misma tendencia en la muestra de tejido adyacente.

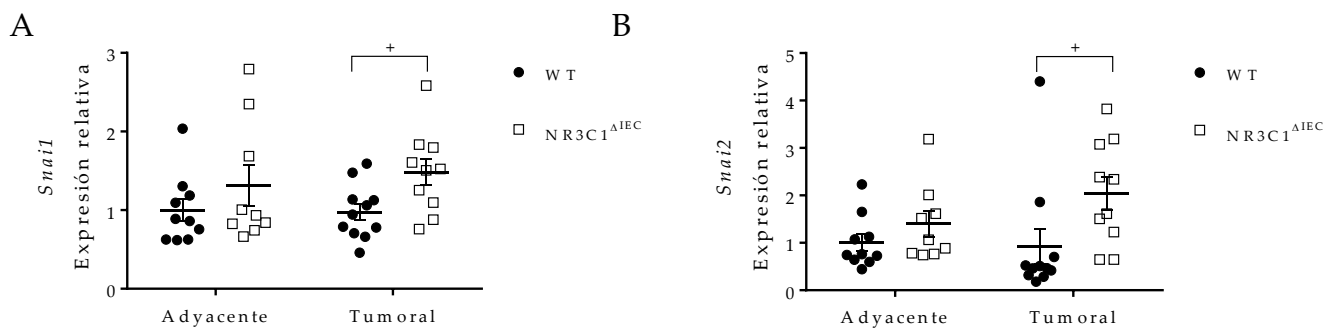


Figura 45. Expresión génica de promotores durante la EMT. Expresión de *Snai1* (A), *Snai2* (B) en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=9-11). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

Sorprendentemente, estos ratones también presentaron una mayor expresión génica de ZO-1 (*Tjp1*) y E-cadherina (*Cdh1*), esta vez tanto en la zona adyacente como la tumoral, a pesar de que SNAIL1 y 2 causan una inhibición de la expresión de proteínas de uniones estrechas (entre ellas ZO-1) y uniones adherentes (como la E-cadherina), y de que ambas proteínas son marcadores de células epiteliales (Figura 46). Mediante *western blot* se midió también la fosforilación de la cadena ligera de miosina 2 (MLC2); la fosforilación de MLC2 causa la relajación del anillo de actina-miosina, aumentando así la permeabilidad intercelular [515]. No hubo diferencias significativas entre genotipos, pero la tendencia a una mayor fosforilación de MLC2 en animales WT se correlaciona con una menor expresión de proteínas de unión estrecha en esos ratones.

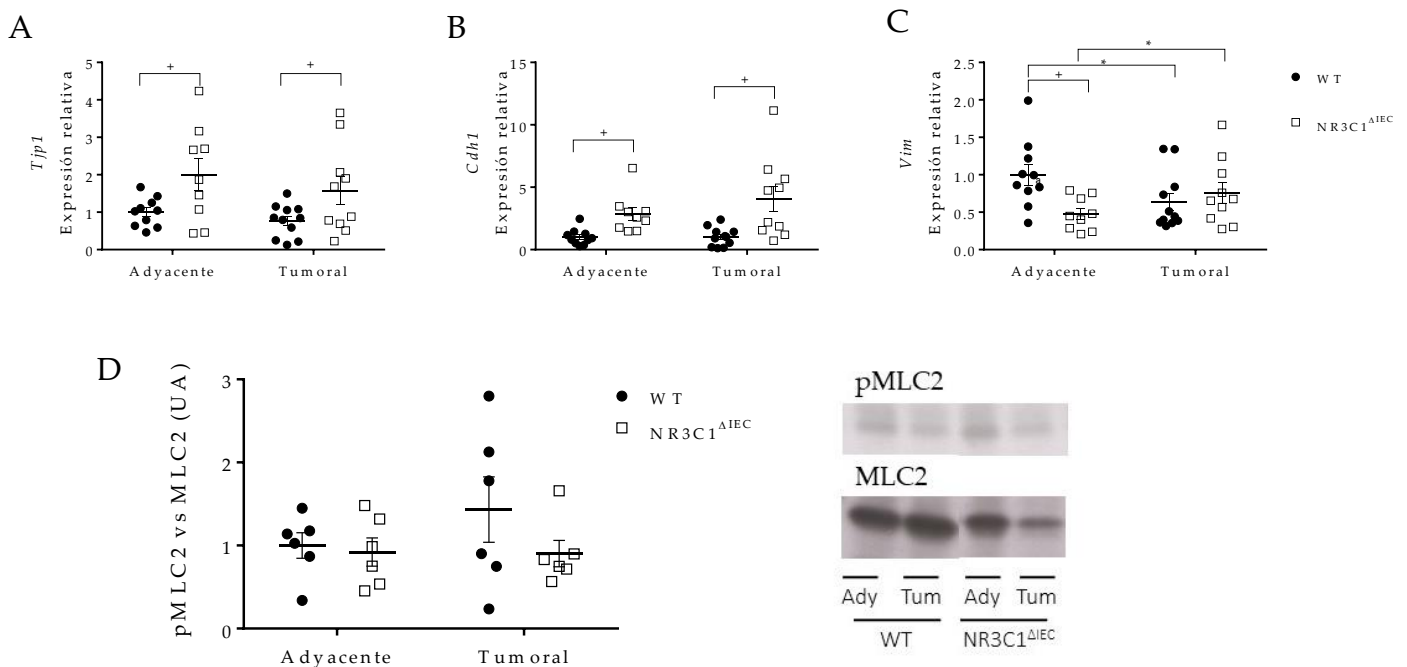


Figura 46. Parámetros relacionados con las uniones intercelulares y el citoesqueleto. Expresión de *Tjp1* (A), *Cdh1* (B) y *Vim* (C) en colon medida por RT-qPCR. D. Expresión proteica de pMLC2 y MLC2 en extractos proteicos de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=6-11). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

En cuanto a la expresión de Vimentina (*Vim*), ésta se vio reducida en la parte adyacente al tumor en ratones sin GR en el epitelio intestinal. La vimentina es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, y que favorece la pérdida de interacción con las células epiteliales circundantes y la movilidad celular al interaccionar preferentemente con proteínas motoras y no con

la E-cadherina. La expresión de esta proteína se ve aumentada durante el proceso de EMT. Sin embargo, su expresión estuvo disminuida en los tumores en los ratones WT. Por el contrario, esta tendencia se invirtió en los ratones NR3C1^{ΔIEC}, debido a que la expresión de vimentina se vio reducida en éstos últimos en la zona adyacente al tumor (Figura 46C).

6.4 Vías de señalización implicadas en la tumorigénesis.

Como se ha explicado en la introducción, TNF es una de las citoquinas claves en el desarrollo y progresión del CAC. Se midió la producción de ésta en explantes de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. Como puede verse en la Figura 47, la ausencia de GR intestinal no provocó diferencias en la producción de TNF colónica.

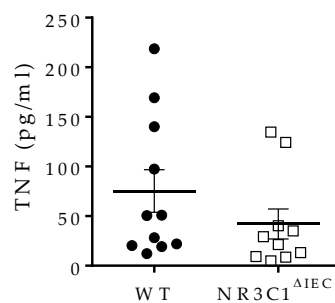


Figura 47. Producción de TNF por explantes colónicos. Mediante análisis multiplex se midió la producción de TNF en explantes colónicos de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} en los que se indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS tras 24h de incubación en un medio carente de GC. (n=10-11). Los datos se expresan como media ± error estándar.

Una de las principales rutas de señalización sobreexpresadas en el CAC es la que implica a IL6 y STAT3. Se midió por tanto la producción de IL6 en explantes colónicos de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}, así como la fosforilación de STAT3 en tejido colónico mediante *western blot*. De nuevo, no se observaron diferencias estadísticas, aunque se apreció una tendencia a una menor fosforilación de STAT3 en el fragmento tumoral de colon de ratones NR3C1^{ΔIEC} respecto a WT (Figura 48).

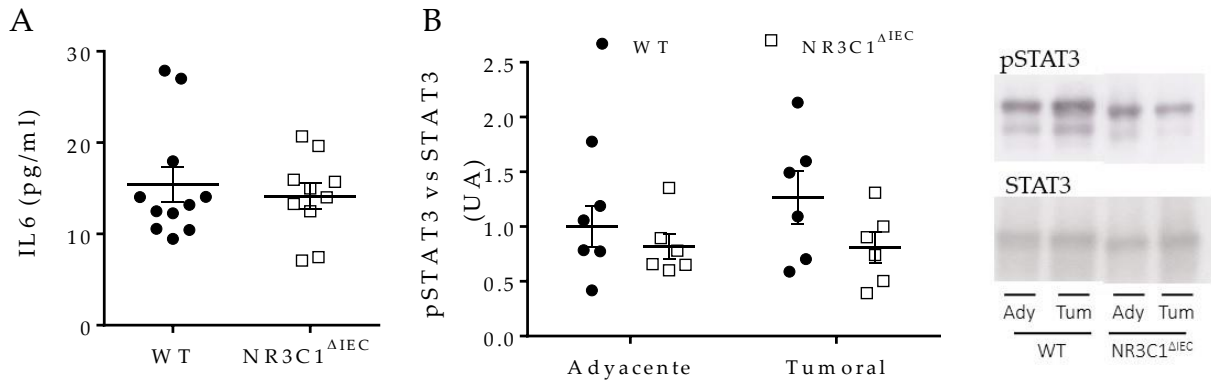


Figura 48. Vía de señalización de IL6/STAT3 en ratones con cáncer colorrectal. A. Producción de IL6 por explantes de colon medida por multiplex tras 24 h de incubación en un medio carente de GC. B. Expresión proteica de pSTAT3 y STAT3 en extractos proteicos de colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=9-11). Los datos se expresan como media ± error estándar (UA= Unidades Arbitrarias).

La vía TGFβ/SMAD3 también se encuentra estimulada en CAC, activando promotores como SNAIL1, 2 y TWIST, y favoreciendo la EMT. La expresión de *Tgfb1*, gen que codifica TGFβ, al igual que SMAD7, un inhibidor de SMAD3, se encontró incrementada en ausencia de GR intestinal, tanto en la zona adyacente como en la tumoral en el primer caso (Figura 49A) y sólo en la zona tumoral en el segundo (Figura 49B).

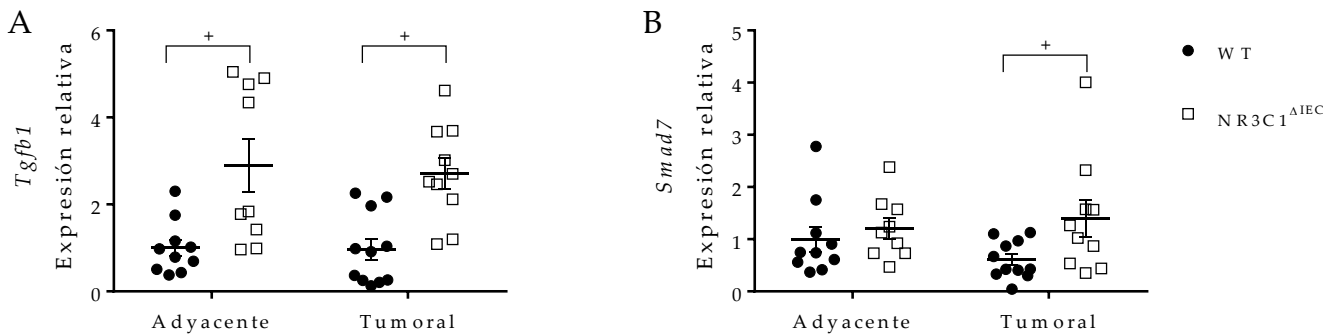


Figura 49. Expresión genes implicados en la vía TGFβ/SMAD3. Expresión de *Tgfb1* (A) y *Smad7* (B) en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=9-11). Los datos se expresan como media ± error estándar. La

significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. * $P < 0,05$ WT vs NR3C1^{ΔIEC}; * $P < 0,05$ Adyacente vs Tumoral.

Mediante *western blot* se midió la fosforilación de SMAD2/3 (Figura 50). No hubo diferencias significativas asociadas a la ausencia del GR intestinal, aunque sí pudo apreciarse una tendencia a aumentar en ratones NR3C1^{ΔIEC} en la zona adyacente.

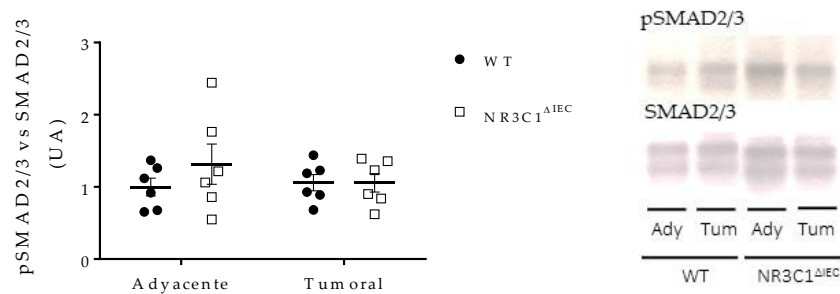


Figura 50. Fosforilación de SMAD2/3 en colon. Expresión proteica de la ratio pSMAD2/3-SMAD2/3 en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías (UA= Unidades Arbitrarias).

En cuanto a AKT y ERK, su estado de fosforilación tampoco se vio afectado por la ausencia de GR intestinal (Figura 51)

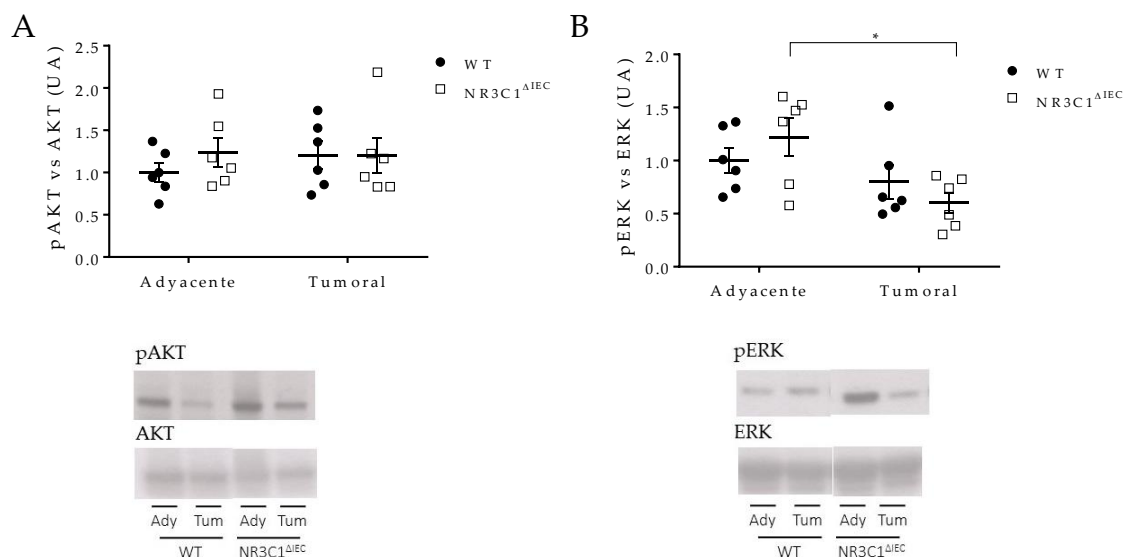


Figura 51. Fosforilación de AKT y ERK en colon. Expresión proteica de la ratio pAKT-AKT (A) y pERK-ERK (B) en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer

colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=6). Los datos se expresan como media \pm error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías (UA= Unidades Arbitrarias).

6.5 Parámetros relacionados con el ciclo celular y la proliferación

Se estudiaron diversos parámetros relacionados con la proliferación celular. En primer lugar, mediante RT-qPCR se midió la expresión génica de LGR-5, marcador de células madre epiteliales. Como puede verse en la Figura 52A, hubo un gran aumento de su expresión en tejido tumoral de colon de animales NR3C1 ^{Δ IEC}, con respecto a la zona adyacente y con respecto a animales WT. El aumento en la zona tumoral es lógico, pues en la zona tumoral hay un mayor número de células madre, aunque esto no ocurrió en animales WT por razones desconocidas. La misma tendencia siguieron *Egfr* y *cMyc*, ambos implicados en la proliferación celular. Sin embargo, a nivel proteico no se apreciaron diferencias entre genotipos ni en la fosforilación de β -catenina, a pesar de que LGR-5 promueve la señalización de β -catenina [516], ni en la expresión de ciclina D1 (Figura 52 B), cuya expresión se ve regulada por el factor de transcripción STAT3. Mediante inmunohistoquímica se evaluó la presencia de Ki67, marcador de proliferación. No hubo diferencias entre los dos genotipos (Figura 52C).

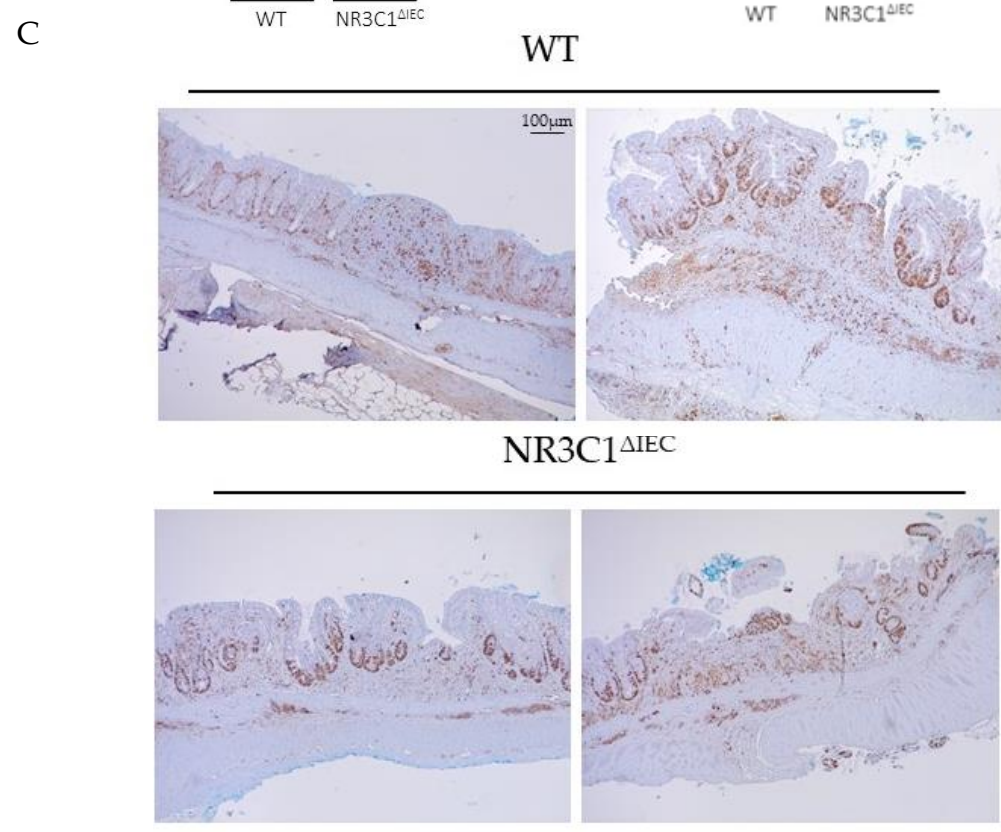
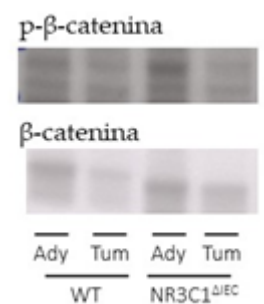
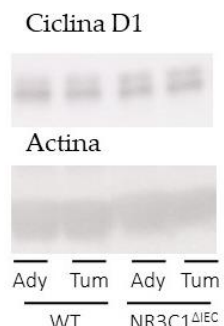
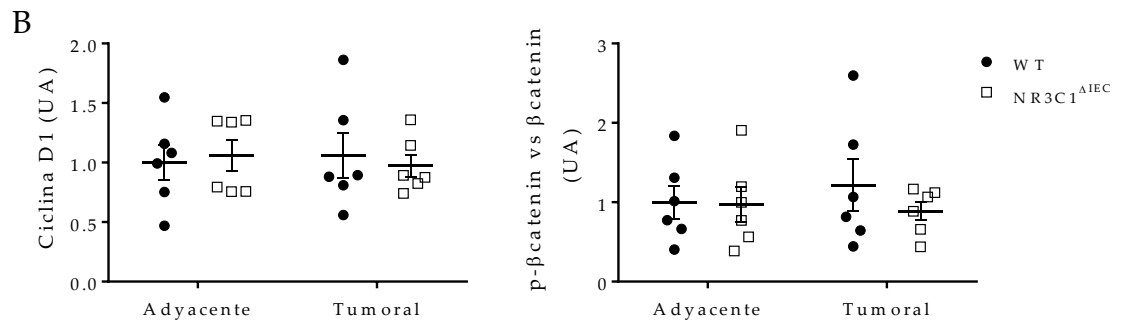
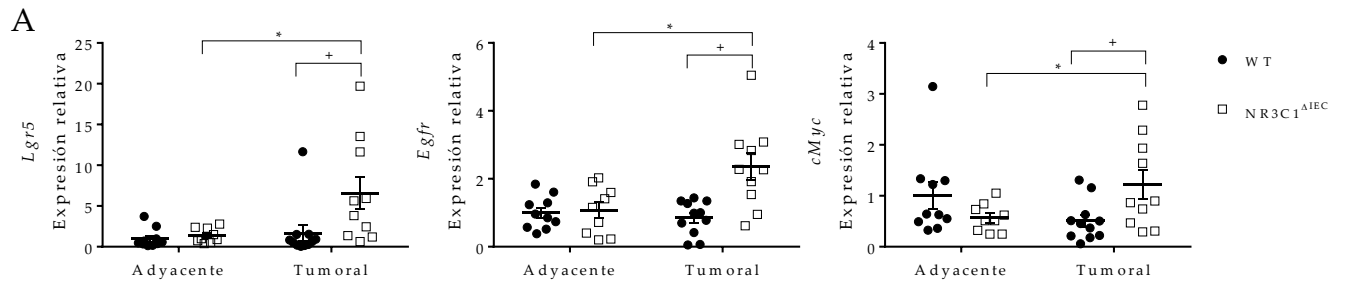


Figura 52. Parámetros relacionados con la proliferación celular en colon. Ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes A. Expresión génica de *Lgr5* (izquierda), *Egfr* (centro) y *Myc* (derecha) medida por RT-qPCR (n=9-11). B. Expresión proteica de ciclina D1 (izquierda) y la ratio p-β-catenina/ β-catenina medida mediante *western blot* en extractos proteicos de colon (n=6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. C. Fotografías representativas de cortes de colon sometidos a inmunohistoquímica de Ki67. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

Se midió también la expresión de *Birc5*, gen que codifica la survivina, en el colon de estos ratones, sin que se obtuvieran diferencias claras. También se midió la expresión proteica de la caspasa 3, para verificar si había apoptosis acentuada en alguno de los grupos (Figura 53B). Se observó un aumento en ratones NR3C1^{ΔIEC} en la zona tumoral con respecto a la zona adyacente, pero ningún efecto debido a la ausencia de GR en el epitelio intestinal.

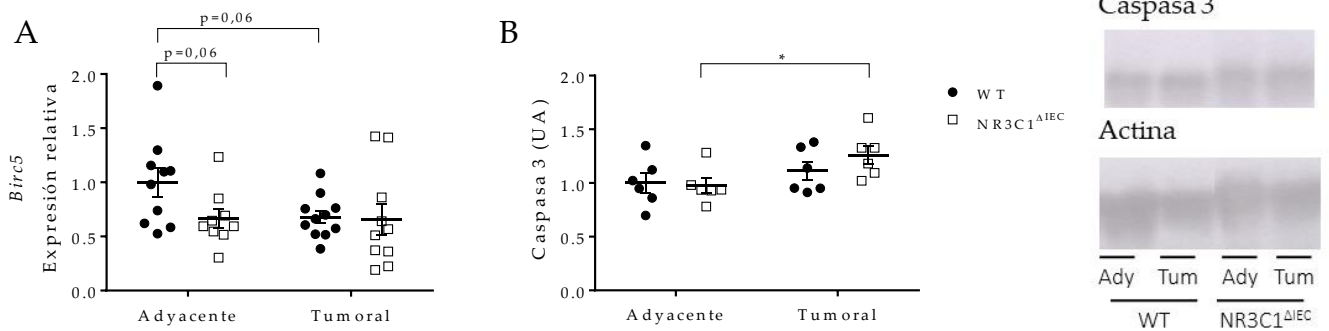


Figura 53. Parámetros relacionados con la supervivencia y la apoptosis. A. Expresión génica de *Birc5* mediante RT-qPCR en colon (n=9-11). B. Expresión proteica de Caspasa 3 medida por *western blot* (n=6) en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. (UA= Unidades Arbitrarias) *P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

6.6 Parámetros relacionados con la inflamación.

Mediante RT-qPCR se midió la expresión génica en colon de Haptoglobina (*Hp*), COX2 (*Ptgs2*), S100A9 (*S100a9*) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *Nos2*) (Figura 54). Los tres primeros genes reflejaron un mayor estado inflamatorio en la zona tumoral con respecto a la adyacente, independientemente del genotipo. Además, en el tumor hubo una mayor expresión de *S100a9*, haptoglobina e iNOS (*Nos2*) como consecuencia de la pérdida de GR intestinal. Pacientes con CRC tienen

elevados niveles séricos de haptoglobina. Aunque la mayor fuente de producción de ésta son las células hepáticas, las células tumorales de CRC son también capaces de producirla (no así las IECs normales) [517]. Así pues, la expresión colónica de haptoglobina puede ser un reflejo de la carga tumoral. En cuanto a S100A9, la ausencia de GR intestinal generó un aumento de su expresión génica, como se ha demostrado en apartados anteriores.

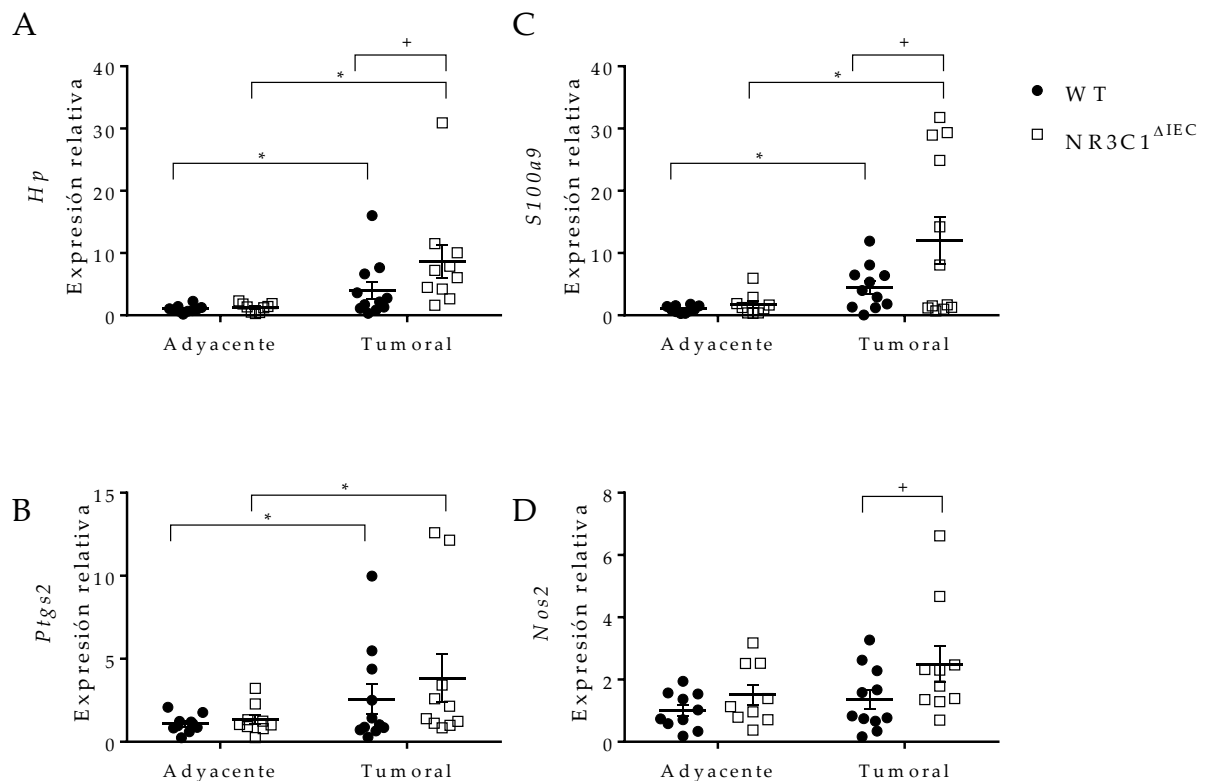


Figura 54. Parámetros relacionados con la inflamación. Expresión génica de *Hp* (A), *Ptgs2* (B), *S100a9* (C) y *Nos2* (D) mediante RT-qPCR en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes (n=9-11). La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC} +P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

6.7 Parámetros relacionados con la angiogénesis y la destrucción de la matriz extracelular.

Se midió la expresión génica de *Vegfa* y *Mmp9* en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}. En ambos casos, estos últimos presentaron una sobreexpresión en la zona tumoral (Figura 55). No obstante, no hubo diferencias en la producción por explantes colónicos de ninguna de estas citoquinas, como tampoco de TIMP1,

inhibidor de metaloproteasas, ni de MMP2 u 8. Sí que se apreció una disminución en la producción de MMP3 en ausencia de GR intestinal.

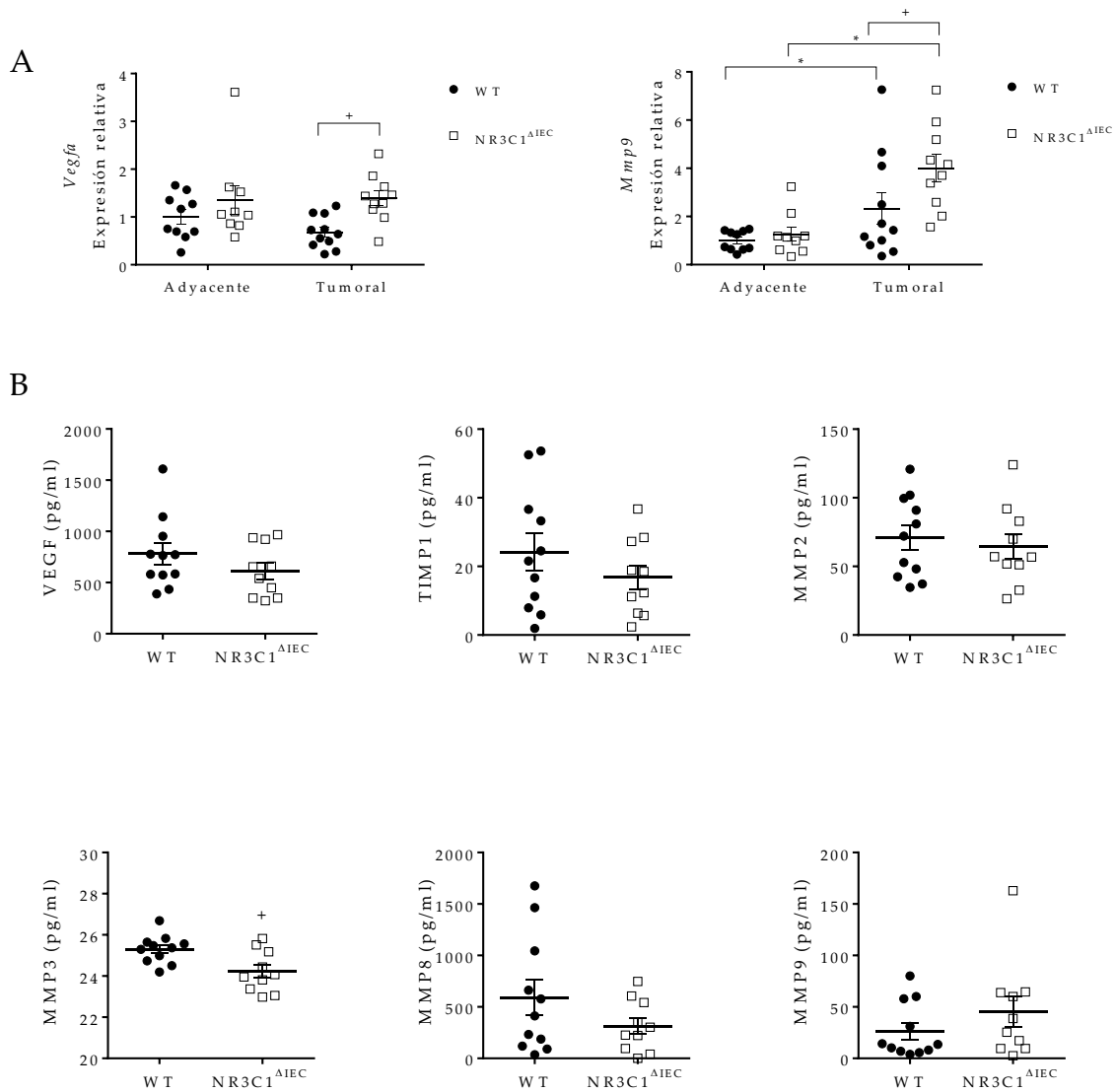


Figura 55. Parámetros relacionados con la angiogénesis y la destrucción de la matriz extracelular. A. Expresión génica de *Vegfa* y *Mmp9* en colon por RT-qPCR. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como muestras independientes B. Producción de VEGF, TIMP1, MMP2, MMP3, MMP8 y MMP9 por explantes colónicos de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS tras 24h de incubación en un medio caernte de GC. Se midió mediante multiplex. (n=10-11). La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. +P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC} *P<0,05 Adyacente vs Tumoral.

6.8 Inmunidad.

Mediante citometría se analizaron algunas de las poblaciones de células inmunes de los ganglios mesentéricos. Lo más destacable fue un aumento en la población de células NK en ratones NR3C1^{ΔIEC}, sin haber ninguna diferencia en linfocitos CD4+, CD8+ o Treguladores (Figura 56 A-D).

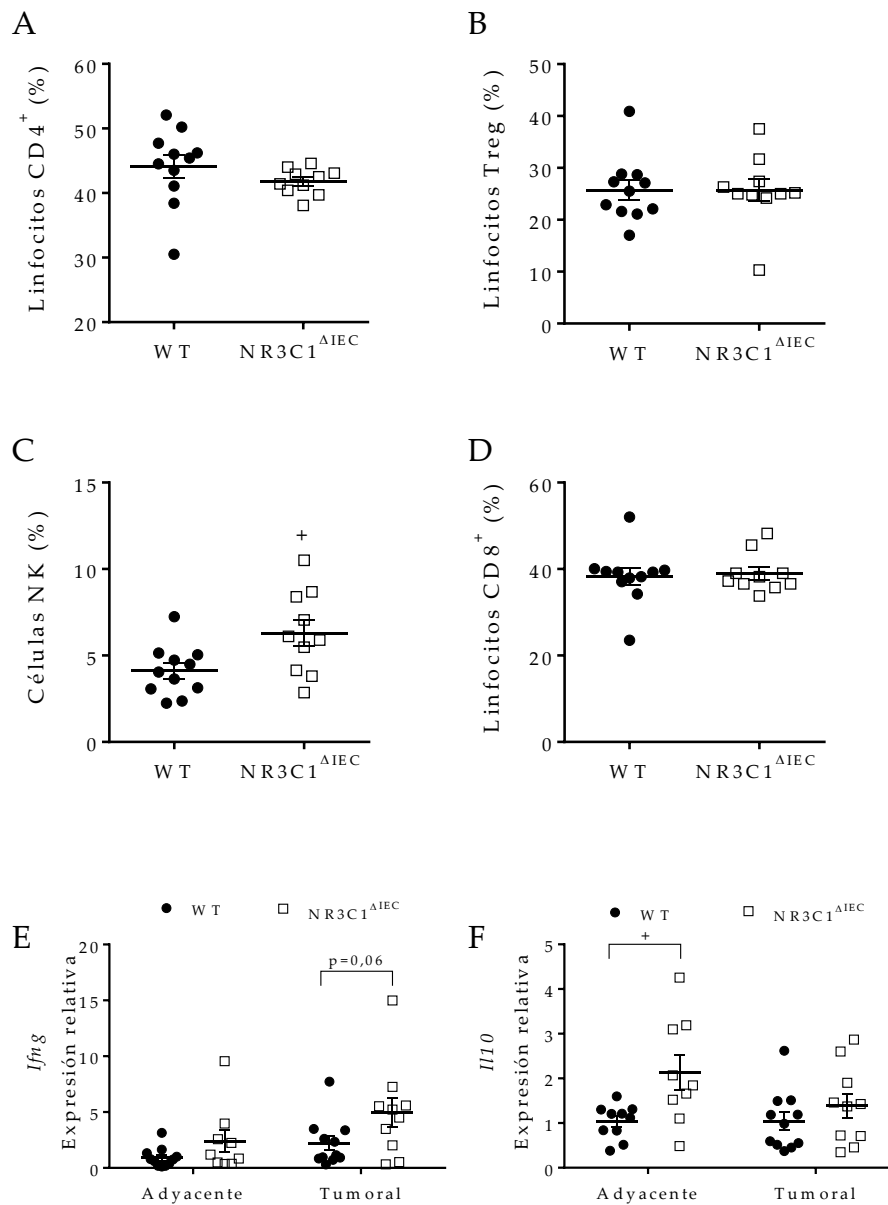


Figura 56. Poblaciones inmunes en ganglios mesentéricos y expresión colónica de citoquinas. Análisis por citometría de flujo de linfocitos CD4+ (*gate* células CD3+) (A), linfocitos T reguladores (FoxP3+) (*gate* células CD3+ y CD4+) (B), células NK (*gate* CD45+) (C) y linfocitos CD8+ (*gate* células CD3+) (D). Esta citometría se hizo utilizando el citómetro BD FACScalibur. Expresión génica de *Ifng* (E) y *Il10* (F) por RT-qPCR en colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Se midió mediante multiplex. Tras la eutanasia, se obtuvo un fragmento de colon con tumor (Tumoral) y otro con morfología normal contiguo a este (Adyacente) que se trataron como

muestras independientes (n=10-11). La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}.

Se midió también en la expresión de los genes que codifican IFN γ e IL10 mediante RT-qPCR. Se observó una mayor expresión de *Il10* en la zona adyacente al tumor de ratones NR3C1^{ΔIEC} en comparación con los WT (Figura 56F), sin que esto se correlacionara con un aumento de linfocitos T reguladores en los ganglios mesentéricos.

6.9 Parámetros relacionados con la esteroidogénesis en el CAC.

Debido a que la producción de corticosterona por células tumorales es un conocido mecanismo de evasión inmune, se midió la corticosterona producida por explantes colónicos, tanto de la zona tumoral como adyacente, así como la corticosterona plasmática. No hubo ninguna diferencia entre genotipos (Figura 57).

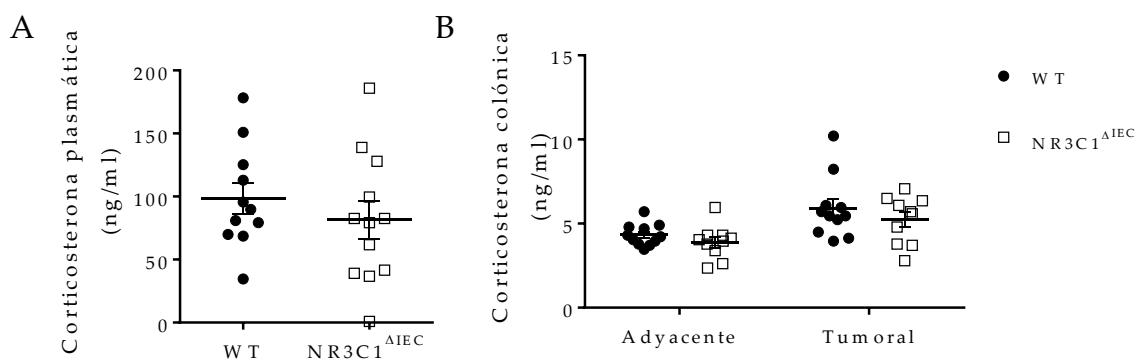


Figura 57. Medida de corticosterona plasma (A) y en explantes de colon (B) de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se les indujo cáncer colorrectal mediante AOM/DSS tras 24 h de incubación en un medio caernte de GC. Los datos se expresan como media \pm error estándar. La medida se hizo mediante ELISA.

DISCUSIÓN

En anteriores estudios de nuestro grupo de investigación se puso de manifiesto la existencia de acciones perjudiciales de los GC en el intestino inflamado, utilizando distintos modelos de colitis [430]. Estas observaciones tuvieron lugar originalmente en experimentos realizados hace más de una década, en los cuales se utilizaron GC como tratamiento control positivo, y por lo tanto fueron en principio de carácter incidental. Otros investigadores han publicado resultados similares en los últimos años [518-520]. Teniendo en cuenta el uso frecuente de estos fármacos en el control de brotes de EII, así como en otras enfermedades que cursan con inflamación intestinal o con alteraciones en la FBI, y las limitaciones existentes actualmente en el ámbito clínico, nos planteamos la hipótesis de que las acciones nocivas de los GC a este nivel pudieran estar implicadas en situaciones clínicas como la resistencia a GC, la pérdida de eficacia con el tiempo o la necesidad de intervención quirúrgica. La línea de investigación a la que corresponde la presente tesis doctoral surge a partir de la formulación de dicha hipótesis, con el fin último de mejorar el tratamiento de la EII y, potencialmente, otras enfermedades, con GC.

Utilizando fundamentalmente el GC de acción predominantemente local budesonida nuestro grupo pudo determinar que, pese a obtener un control sustancial de la respuesta inflamatoria intestinal, los ratones tratados con el GC experimentan un deterioro de la FBI, con incremento de translocación bacteriana. A dosis equivalentes a las humanas (es decir, aproximadamente 6 µg/día) se produce pérdida de peso, empeoramiento del estado de los animales, y en algunos casos incluso la muerte. Con dosis mayores se observa franca sepsis. Tanto la budesonida como otros GC, como hidrocortisona o prednisolona, inhiben la capacidad de proliferación en células epiteliales intestinales y la respuesta de reepitelización *in vitro* [430]. Con el fin de confirmar si las acciones epiteliales desempeñan un papel importante en los efectos observados nuestro grupo desarrolló el modelo de ratón transgénico NR3C1^{ΔIEC}, que ha constituido el modelo experimental principal en esta tesis, tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de la generación de organoides intestinales.

En experimentos recogidos en una tesis doctoral previa se obtuvo un perfil básico de los ratones NR3C1^{ΔIEC}, tanto en condiciones basales como en cuanto a la respuesta a la colitis experimental inducida por DSS. La delección se produce de forma específica y duradera en las células epiteliales, tanto del intestino delgado como grueso.

En la presente tesis doctoral se ha procedido a profundizar en la caracterización del fenotipo y, especialmente, en lo que respecta a los aspectos mecanísticos. Por otra parte, se ha estudiado la influencia del GR del epitelio en la esteroidogénesis intestinal, así como la respuesta a la inducción de cáncer asociado a colitis crónica experimental, utilizando el modelo AOM/DSS.

La delección inducida del receptor de GC en el epitelio intestinal da lugar a un fenotipo de colitis leve, sin afectación del intestino delgado, pero sí a nivel sistémico. Esta reacción inflamatoria es transitoria, de forma que ya a las 2 semanas del comienzo de la inducción (primera dosis de tamoxifeno) la mayor parte de los parámetros inflamatorios están normalizados, y a las 8 semanas apenas queda un incremento de la expresión génica de *S100a8* y *S100a9*. El carácter temporal de la colitis indica que las alteraciones producidas por la delección del gen son susceptibles de adaptación, al menos en ausencia de circunstancias sobrevenidas. Este hecho explica probablemente por qué no se han descrito efectos inflamatorios en los ratones con delección constitutiva del receptor epitelial intestinal (desarrollados por Reichardt et al.[128, 129]). Presumiblemente la adaptación, efectiva desde las primeras etapas del desarrollo, se traduce en este caso en un fenotipo indistinguible en principio de la normalidad.

La inflamación colónica en los ratones transgénicos NR3C1^{AIEC} se pone de manifiesto tanto a nivel macroscópico como bioquímico. Nuestro grupo de investigación había establecido previamente la elevación de varios marcadores, incluyendo *S100a8/9* (calprotectina), múltiples citocinas/quimioquinas, el aumento de la expresión de S100A9 y de la fosforilación de STAT3 en células epiteliales, o el incremento de la sensibilidad de la enzima fosfatasa alcalina colónica a la inhibición por levamisol, así como de citocinas plasmáticas (TNF, IL-6).

Con objeto de caracterizar la respuesta inflamatoria en detalle, se realizaron experimentos adicionales para perfilar la naturaleza del infiltrado leucocitario mediante citometría de flujo, la expresión génica de las células del epitelio colónico y se evaluó la FBI.

Las respuestas inflamatorias agudas suelen estar caracterizadas por la infiltración inicial de neutrófilos, seguidos por otros leucocitos, como monocitos y linfocitos. Esta secuencia se ha documentado en la colitis experimental, y de hecho la determinación de la actividad mieloperoxidasa (expresada mayoritaria, pero no exclusivamente, por neutrófilos) constituye una práctica consolidada en los estudios experimentales preclínicos en este campo [521]. En consecuencia, la

presencia de neutrófilos, bien por medida directa, bien por medio de la medida de marcadores como la mieloperoxidasa u otros, se considera generalmente como indicador de inflamación activa o aguda [522]. Por todo ello, cabría esperar un incremento de la infiltración de neutrófilos en los ratones NR3C1^{ΔIEC}. Sin embargo, los niveles de actividad en éstos permanecen muy bajos y comparables al grupo WT, y el mRNA correspondiente llega a ser indetectable en el análisis por RNAseq de las muestras epiteliales. Del mismo modo, no se aprecian cambios en esta población celular por citometría de flujo en la *lamina propria*. De hecho, no se registran diferencias de ningún tipo en ninguna de las poblaciones analizadas, que incluyen linfocitos T colaboradores (CD4+), citotóxicos (CD8+) o reguladores (CD4+Foxp3+). Por tanto, cabe deducir que el infiltrado celular es mixto, sin estar protagonizado por ningún tipo concreto. Es conveniente recordar que la respuesta inflamatoria es leve, lo que puede estar relacionado con este patrón un tanto atípico.

El mecanismo responsable de esta respuesta inflamatoria se origina lógicamente en los cambios producidos en las células epiteliales, lo que implica que el receptor de GC está activado de forma basal en las mismas. Las consecuencias pueden ir desde cambios en la reparación epitelial, proliferación, apoptosis, señalización proinflamatoria, permeabilidad, etc. Con objeto de caracterizar con mayor profundidad el fenotipo epitelial intestinal (colónico, dado que el intestino delgado no se encontraba inflamado) en los ratones NR3C1^{ΔIEC}, se realizó un análisis mediante RNAseq. A la hora de interpretar los resultados es importante tener en cuenta que las muestras presentan una pureza en torno al 90%, dado que no es posible con el método utilizado excluir totalmente las células de la *lamina propria*. No obstante, es un método relativamente rápido, lo que se ha considerado prioritario teniendo en cuenta la escasa viabilidad de las células epiteliales intestinales *ex vivo*. Los resultados obtenidos corroboran el fenotipo inflamatorio. El análisis ontológico, realizado con la plataforma PANTHER GO Analysis, indica la modulación de varios procesos biológicos, de los cuales los más significativos son los relacionados con la respuesta inmune, inflamación y defensa. Otra categoría afectada de forma sustancial es la relacionada con el transportoma, lo que resulta coherente con el importante papel regulador de los GC a este nivel. Sin embargo, no se observaron cambios en los transportadores implicados directamente en la absorción de NaCl, *Slc9a3* (NHE3) y *Slc26a3* (DRA), así como en las subunidades α_1 y β_1 de la ATPasa Na/K (*Atp1a1* y *Atp1b1*), que proporciona el gradiente electroquímico para el transporte activo de solutos [523]. Por otra parte, los datos reflejan una bajada de la expresión de NKCC1 (*Slc12a2*) y *Cftr*,

implicados en la secreción de cloruro y bicarbonato. No se apreciaron cambios en los niveles de mRNA de SGLT1 (*Slc5a1*), que codifica el cotransportador Na/glucosa. En suma, nuestros datos no apuntan a un papel importante del receptor de GC en la regulación del transporte hidroelectrolítico colónico en condiciones basales, a pesar de las propiedades harto conocidas de los GC a este nivel. Por el contrario, cabe esperar que el fenotipo cambie en condiciones de estrés fisiológico, como diarrea o deshidratación. En este sentido, en un estudio reciente Reichardt et al. caracterizaron el impacto de la delección génica del NR3C1, en este caso constitutiva, en el epitelio intestinal, sobre la regulación del SGLT1 [128]. En dicho estudio se puso de manifiesto igualmente que no se producen cambios en condiciones basales, pero sí en respuesta a GC exógenos. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral al examinar el transporte hidroelectrolítico colónico *in vitro* en cámaras de Ussing indican que el transporte basal (I_0) es comparable al del grupo WT. Sin embargo, se produjo una disminución casi significativa de la respuesta secretora al agonista colinérgico carbacol (ΔI_{sc}). Estos datos son similares a los obtenidos previamente por nuestro grupo, aunque en ese caso la respuesta fue inhibida un poco más tarde (a las 2 semanas). Este dato es achacable a la respuesta inflamatoria, que cuando se hace crónica tiende a atenuar la secreción frente a diversos agentes secretagogos [523]. Este fenómeno ha sido estudiado por nuestro grupo y otros, y se ha relacionado con varios mecanismos, incluyendo la represión de la expresión de adenilato ciclasa 6 y la disminución del AMPc intracelular en células epiteliales, la modulación por el óxido nítrico, y otros. Es interesante constatar que se trata de un parámetro más sensible que la secreción basal, lo que justifica la ausencia de cambios en nuestro modelo experimental a este nivel. En contraste con la ausencia de un impacto importante a nivel de los transportadores hidroelectrolíticos, nuestros datos sugieren que el receptor de GC es más relevante para la regulación de la absorción de aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, y otros nutrientes.

En los estudios llevados a cabo en cámara de Ussing se realizó también una medida del flujo transmural de FITC-dextrano 4 kD (de hecho, éste fue el objetivo principal del experimento). El flujo fue mayor en el colon distal de ratones NR3C1^{ΔIEC}, lo que indica un incremento de la permeabilidad paracelular, teniendo en cuenta la ausencia de erosiones y ulceraciones en el tejido. Por el contrario, no se apreció un incremento similar en la conductancia, que en buena medida se ve condicionada por las vías de transporte transcelulares. De hecho, la tendencia fue justamente la contraria, lo que resulta coherente con la menor expresión de CFTR a nivel de mRNA. No se observaron cambios en los niveles de ovoalbúmina

plasmática, lo que indica que la permeabilidad a grandes moléculas (43 kDa frente a 4 kDa) no se ve alterada.

El perfil transcriptómico de las muestras enriquecidas en IECs no sugiere una alteración sustancial de las uniones intercelulares. No obstante, la regulación de las proteínas que participan en las mismas es en gran medida postranscripcional, incluyendo no sólo modulación a nivel de la traducción, sino también en el ensamblaje y la disposición espacial de las mismas en la membrana. Con el fin de valorar posibles cambios en este sentido se realizó un estudio inmunohistoquímico con microscopía confocal, que reveló una menor presencia de ZO-1 en la superficie del epitelio intestinal, coherente con el aumento de permeabilidad paracelular.

De todo lo anterior se deduce que la delección epitelial del receptor de GC se traduce en una alteración significativa de la permeabilidad a macromoléculas, lo que puede constituir un mecanismo implicado en la respuesta inflamatoria. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que los GC pueden aumentar la resistencia epitelial [524]. Efectivamente, la disfunción de la barrera intestinal constituye un factor importante en la etiopatogenia de la EII, y se ha documentado que la permeabilidad intestinal está aumentada tempranamente en familiares de pacientes de EII, los cuales frecuentemente desarrollan posteriormente la enfermedad. En nuestro modelo no se produjo inflamación en el intestino delgado, pese a que la delección génica tuvo lugar con la misma eficiencia que en el colon, o incluso mayor. Una explicación plausible es precisamente la importancia de la microbiota en la respuesta, dado que, como es sabido, es mucho más abundante en el colon que en el intestino delgado [523]. En todo caso, la ausencia de cambios en los niveles de nitritos/nitratos en plasma, así como el estado general de los animales, que no presentaban signos de afectación grave, tales como postración, pelo erizado, etc., no apuntan a un estado de sepsis generalizado.

Por otra parte, las células epiteliales colónicas presentan un incremento de la expresión de Ki67 según el análisis inmunohistoquímico. Esta observación denota un ritmo aumentado de proliferación, y se correlaciona con una mayor expresión de ciclina D1 y PCNA, ya puesta de manifiesto anteriormente por nuestro grupo. Los GC tienen acciones antiproliferativas a nivel epitelial, estudiadas sobre todo en la piel, y que constituyen la base de su efecto perjudicial sobre la curación de heridas. Nuestro grupo de investigación ha confirmado esta acción en líneas celulares epiteliales intestinales, tanto en condiciones basales como en presencia de inductores proliferativos como la IL-22 o la IL-27 [430]. De hecho, los GC retrasan la reepitelización en este modelo, operando no sólo sobre la respuesta

proliferativa sino también sobre el componente de migración celular proliferativo (de hecho, el efecto de los GC se observa también en presencia del agente antimitogénico mitomicina C). En consecuencia, el fenotipo es coherente, y en buena lógica debe empeorar la respuesta al daño epitelial. Así, en la inflamación se produce un incremento del ritmo de proliferación epitelial, que se considera importante desde el punto de vista adaptativo. Sin embargo, no está claro si es suficiente por sí mismo para producir colitis. Aunque no se ha realizado una caracterización en profundidad, la medida de marcadores por RT-qPCR no muestra diferencias, lo que sugiere en principio que no predomina ninguno en concreto.

Otra alteración epitelial constatada en los ratones NR3C1^{ΔIEC} es el aumento de la producción de mucus, achacable en principio a la inducción de *Muc1/Muc13*. Ésta no ha podido ser confirmada a nivel proteico por la falta de anticuerpos apropiados. En un estudio reciente se observó que la administración crónica de GC (dexametasona) daba lugar a una reducción de la producción de mucus en ratas, si bien en este caso sí se estableció una correlación con la expresión de *Muc2/Muc3*, tal vez en función del protocolo prolongado de tratamiento [525]. Se ha observado asimismo que en la colitis inducida por DSS en ratas el tratamiento tópico con prednisolona no aumenta la producción de mucus, a pesar de ejercer efectos antiinflamatorios positivos, lo que es coherente con una acción inhibidora del NR3C1 a este nivel [526]. Sin embargo, en el colon humano se ha observado el efecto contrario, siendo la hidrocortisona más potente que la prednisolona [443]. En general la inflamación intestinal se asocia a una depleción de las mucinas y de las células caliciformes, por lo que el incremento de mucus en ratones NR3C1^{ΔIEC} es achacable en principio a la modulación asociada al receptor más que a la propia reacción inflamatoria.

El segundo mecanismo que puede explicar el fenotipo colítico es un aumento de la señalización proinflamatoria en el propio epitelio, secundario al atenuamiento de la inhibición del NR3C1 sobre STAT3, NFκB y otras vías de señalización. Ya anteriormente nuestro grupo de investigación había constatado la inducción de S100A9 en preparaciones de IECs similares a la utilizada en la presente tesis doctoral para el análisis RNAseq. A pesar de las limitaciones ya expuestas de pureza, cabe resaltar que en este caso no se observó la expresión de S100A8, que sin embargo sí se manifiesta en el tejido colónico completo, integrando el dímero calprotectina, proteína secretada por células inmunes activadas, principalmente neutrófilos, aunque también macrófagos y monocitos. Actúa como alarmina. Es ampliamente utilizada como marcador inflamatorio,

especialmente en el seguimiento de pacientes con EII [527]. La expresión aislada (esto es, sin S100A8) de S100A9 ha sido observada previamente por otros autores en células epiteliales intestinales en cultivo bajo estimulación con IL-6 [528]. Aunque se desconoce la función exacta de S100A9, sus efectos son probablemente inflamatorios, bien emparejándose con S100A8 de origen extraepitelial, bien actuando por separado sobre receptores específicos [529]. Como se ha indicado, el perfil transcriptómico muestra un amplio abanico de mediadores inflamatorios inducidos en IECs colónicas de los ratones NR3C1^{ΔIEC} a la semana de la inducción de la deleción.

Un tercer mecanismo potencialmente relevante tiene que ver con los IELs, los cuales se encuentran también implicados en la respuesta de las células epiteliales a la microbiota luminal. Los linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺ se hallan incrementados tanto en el intestino delgado como en el colon de los ratones NR3C1^{ΔIEC}. En su condición de IELs naturales, las células TCR $\gamma\delta$ ⁺ migran al intestino inmediatamente después de su desarrollo, donde permanecen sin migrar a otros órganos. Aunque el papel de los linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺ no ha sido establecido plenamente, se considera que están relacionados con la inflamación y la defensa antimicrobiana [530]. Por tanto, el aumento de esta población debe achacarse a su proliferación local como consecuencia de la deleción del receptor de GC en el epitelio. Nuevamente, el hecho de que este hecho se asocie con inflamación únicamente en el colon puede estar relacionado con la densidad de la microbiota.

En suma, el fenotipo de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en condiciones basales se caracteriza por una colitis leve a moderada, sin implicación del intestino delgado pero sí a nivel sistémico, que puede estar originada por alteraciones en la función barrera, aumento de señalización proinflamatoria por parte del epitelio, y de las células TCR $\gamma\delta$ ⁺. Este fenotipo es transitorio y se encuentra ya muy atenuado a las dos semanas de la inducción de la deleción. A las 8 semanas el fenotipo es prácticamente indistinguible del de ratones WT, aunque persisten algunos cambios bioquímicos. En concreto, la expresión de *S100a8* y *S100a9* se encuentra aumentada en el colon de los ratones delecionados, aunque este incremento se produce exclusivamente en las hembras. Este hecho puede ser debido a que las hembras generan una respuesta inflamatoria típicamente exacerbada [499], lo cual puede ser acrecentado por la pérdida de la activación basal del GR [501], en este caso intestinal. Anteriores resultados de nuestro grupo muestran que la inflamación transitoria en el colon debida a la ausencia de GR en el epitelio intestinal tiene consecuencias macroscópicamente visibles sólo en algunos cólonos (2 de 8 estudiados inicialmente presentaban claros signos de inflamación, 3 de 8 un menor

grado inflamatorio y los tres restantes eran indistinguibles de colones WT, Figura 2A). Curiosamente, los colones visiblemente inflamados pertenecen siempre a hembras.

En condiciones patológicas, como la inflamación, la diarrea, la sepsis o el cáncer, el receptor epitelial de GC puede tener una implicación aún mayor en el mantenimiento de la homeostasis. En particular, se ha constatado que la producción local de GC se potencia especialmente en la inflamación intestinal, a través de un mecanismo probablemente multifactorial pero que parece depender fuertemente de la señalización por TNF, en la medida en que está profundamente atenuada en ratones $TNF^{-/-}$, $TNFR1^{-/-}$ y $TNFR2^{-/-}$ [73, 74]. Algunos autores consideran que este mecanismo adaptativo, que presumiblemente se opone a la respuesta inflamatoria, está inhibido en la inflamación crónica, contribuyendo de esta forma a la perpetuación de la colitis [353]. En este sentido, nuestro grupo de investigación ya había iniciado la caracterización del fenotipo de los ratones $NR3C1^{AIEC}$ en la colitis experimental inducida por DSS. En la presente tesis doctoral hemos profundizado en dicha caracterización, y hemos estudiado la sensibilidad de estos ratones a la inducción de cáncer colorrectal asociada a la colitis, utilizando el modelo AOM/DSS.

La respuesta de los ratones $NR3C1^{AIEC}$ a la colitis experimental inducida por DSS es compleja, ya que inicialmente se produce una potenciación de la respuesta inflamatoria (que normalmente tarda varios días en producirse a partir de la administración de DSS), mientras que posteriormente la colitis es menor. Este perfil indica que el receptor de GC tiene un papel perjudicial en colitis, al menos en el modelo experimental utilizado. Existen diversas variantes del modelo de colitis por DSS, pero la más utilizada con mucho es el utilizado en este experimento, es decir, inducción por exposición continua de una semana de duración. Este protocolo corresponde a una colitis entre aguda y crónica. Existen protocolos de colitis considerada crónica, bien mediante la alternancia de períodos de 5 días de exposición y otros de descanso, bien mediante el uso de concentraciones bajas, éste último muy poco utilizado. En general no se utilizan sin embargo dosis estándar (de 2-3%) de forma continuada, porque la colitis se agrava rápidamente en lugar de estabilizarse. Este protocolo es en cambio idóneo para verificar un posible efecto protector, y por este motivo se aplicó a ratones $NR3C1^{AIEC}$ y WT. Al cabo de 21 días sometidos a DSS 2,5% (p/v) la mortalidad fue efectivamente elevada en el grupo control, mientras que los ratones con delección del receptor de GC presentaron niveles muy inferiores, niveles de hecho más típicos del protocolo estándar. Puede observarse que este efecto protector no llega

a observarse hasta pasada una semana, y no es significativo hasta los 14 días. Estos resultados confirman el efecto protector de la delección, y en consecuencia el papel perjudicial del mismo en la colitis experimental por DSS.

Uno de los resultados más destacables obtenidos en estudios anteriores del grupo fue la desaparición casi total del efecto de pérdida de peso producido por la administración de BD en los ratones NR3C1^{ΔIEC}, la cual sugería que los efectos perjudiciales de los GC en la colitis obedecen a las acciones epiteliales, en tanto que las protectoras se ejercerían a nivel extraepitelial. Este hallazgo plantea la posibilidad teórica de potenciar la respuesta terapéutica de los GC en la colitis, en la medida en que sea posible limitar las primeras y aumentar las segundas. Esta aproximación es posible utilizando dosis elevadas de GC en ratones NR3C1^{ΔIEC}. Como se ha indicado, la dosis de 6 μg/día de BD en el ratón corresponde a la dosis utilizada en humanos, con base en el cálculo por superficie corporal y tamaño del colon, la respuesta observada sobre la inflamación, y la ausencia de efectos a nivel hepático. Dosis superiores superan el efecto puramente local/intestinal de la budesonida, especialmente la de 60 μg/día, utilizada en estudios anteriores como referencia máxima o “techo” de este fármaco en ratones. Por tanto, al tratar ratones con colitis por DSS con esta dosis, el objetivo es dilucidar si la ausencia del receptor epitelial de GC permite desenmascarar una eficacia terapéutica hasta ahora desconocida de los GC. A raíz de los resultados obtenidos en el experimento anterior, se utilizaron tanto ratones hembra como macho. En este experimento se registró una pérdida de peso significativa en todos los grupos, así como un aumento del DAI (recuérdese que no hay animales no tratados en este experimento). El experimento se interrumpió a los 5 días por razones éticas, ya que la pérdida de peso era ya superior al 20% en algunos casos. Se observó que la pérdida de peso era menor en los animales WT macho que en en las hembras, y que éstas presentaron una mortalidad elevada, mientras que ninguno de los ratones macho murió en el transcurso del período de tratamiento (asimismo, aunque sin llegar a ser significativa la diferencia, el DAI fue mayor en las hembras). Esta mortalidad es achacable al GC, ya que en este modelo la mortalidad a 5 días es prácticamente cero, y de hecho es reducida incluso a los 7 días. En consecuencia, los ratones control hembra fueron más susceptibles a los efectos perjudiciales de la BD a dosis elevadas. Por el contrario, los ratones NR3C1^{ΔIEC} hembra presentaron una mortalidad cero, lo que indica que el receptor epitelial de GC está implicado en la muerte de los ratones hembra WT. El efecto protector de la delección no se extendió sin embargo a la pérdida de peso, que fue comparable a la del grupo control, tanto en ratones machos como en hembras. A nivel

bioquímico se pudo confirmar que las hembras WT presentaban una expresión exacerbada de *S100a8/9*, *Tnf* o *Il6*, de S100A9 a nivel proteico, y de la fosforilación de STAT3, que se hallan inhibidas significativamente en las hembras NR3C1^{ΔIEC}. Por el contrario, no hubo diferencias en general en los machos. Con independencia del sexo, los niveles de ciclina D1 (pero no de c-Myc o PCNA) se encuentran aumentados en el colon de los ratones NR3C1^{ΔIEC}, en consonancia con datos anteriores y con el papel antiproliferativo de los GC a nivel epitelial.

Con objeto de tratar de dilucidar el por qué de esta respuesta dimórfica, se midió por RT-qPCR la expresión de una serie de genes relevantes. Así, se puso de manifiesto que los ratones WT macho presentan niveles mayores de expresión de *Tsc22d3* (GILZ) y del propio *Nr3c1* que las hembras, lo que indica una mayor señalización dependiente de GC en aquéllos. De hecho, otros autores han constatado una mayor eficacia terapéutica de los GC en machos, pues en modelos de sepsis en ratas, los machos sobreviven con menores dosis de dexametasona que las hembras [501]. Al mismo tiempo, la expresión de LRH1 se encontró aumentada, lo que sugiere una mayor producción endógena de GC. Por otra parte, los niveles de mRNA del receptor estrogénico β están disminuidos en las hembras WT. En todos los casos los niveles tienden a equipararse en los ratones NR3C1^{ΔIEC}. Por tanto, existen diferencias en la respuesta de los ratones WT con colitis por DSS bajo tratamiento con dosis elevadas de BD, las cuales parecen correlacionarse con la propia señalización por GC en el colon. La delección epitelial del gen NR3C1 no parece influir en la respuesta inflamatoria en machos, ni protege frente a los efectos nocivos de la BD, antes al contrario, incluso potencia la pérdida de peso. En cambio, la ausencia del receptor en hembras reduce sustancialmente la intensidad de la colitis y la mortalidad asociada, pero no la pérdida de peso. El hecho de que todos los grupos experimenten pérdida de peso desde el principio, y en proporciones comparables, indica que las acciones epiteliales no están implicadas en dicho efecto con esta dosis supraterapéutica de BD; el único efecto favorable se observó en ratones WT macho, lo que podría estar relacionado con la mayor expresión de LRH-1, en la medida en que ésta puede reflejar un aumento de la producción endógena de GC. Es tentador en este sentido especular con la posible relación causa-efecto entre la menor señalización por GC en hembras WT y su estado inflamatorio agravado. Llama la atención que los niveles de *Nr3c1* en el colon de este grupo sean no sólo claramente inferiores a los de los machos WT, sino comparables a los de los ratones NR3C1^{ΔIEC}, y esta relación se observa igualmente para la expresión de *Tsc22d3* (GILZ) y LRH-1. Es decir, paradójicamente el efecto de la delección génica parece ser mayor en los ratones

con menor señalización de los GC y/o biosíntesis de los mismos. Sin embargo, estos datos corresponden a colon total y no a células epiteliales aisladas, por lo que la interpretación más sencilla es que los animales machos simplemente presentan un mejor control de la inflamación en estas condiciones experimentales. Es posible que las acciones perjudiciales de la BD se manifiesten únicamente en el contexto de una inflamación significativa, que en este experimento corresponde a los ratones hembra fundamentalmente, y que por tanto la protección se observe exclusivamente en este grupo. Por otra parte, los ratones NR3C1^{ΔIEC} hembra presentaron un incremento de los niveles del receptor androgénico *Nr3c4*, el cual no se produjo en los ratones macho; esto podría interpretarse como un posible mecanismo antiinflamatorio

En consecuencia, este experimento confirma de forma parcial nuestra hipótesis, ya que la ausencia del receptor protege frente a la mortalidad asociada al tratamiento con dosis elevadas de BD, aunque no frente a la pérdida de peso y deterioro de los animales, que por tanto son achacables en estas condiciones a las acciones extraepiteliales del GC. Éstas son también responsables del incremento temprano del DAI en los ratones delecionados (secundario en gran medida a la presencia de sangre en heces).

En la caracterización inicial de la respuesta de los ratones NR3C1^{ΔIEC} a la colitis experimental inducida con DSS se observaron ciertas alteraciones en el eje HPA en fases tempranas de la colitis, con una disminución de los niveles de corticosterona y ACTH en plasma debido a la ausencia del GR del epitelio intestinal. En la presente tesis doctoral se realizó un estudio en profundidad, mediante el seguimiento de los animales a los 3, 5 y 7 días de la inducción de colitis. Aunque en estos experimentos se aprecia una cierta tendencia al aumento de los niveles de corticosterona en plasma a los 3 días, no hay cambios significativos en ningún momento. Por el contrario, la producción de corticosterona en el colon aumentó significativamente con el desarrollo de la colitis. Este incremento fue más pronunciado a los 7 días en los animales delecionados, aunque a los 3 días la producción estaba, por el contrario, reducida. Estos datos concuerdan con el estado inflamatorio de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en las fases temprana y tardía de la colitis. Existe una correlación entre la expresión de *Star*, *Cyp11a1* y *Hsd11b1*, relacionadas con la biosíntesis *de novo* o parcial de corticosterona, y la producción de la misma. En ratones WT el aumento de la esteroidogénesis se relaciona con la inducción de *Hsd11b1*, lo que sugiere un incremento de la activación de corticoide circulante, en tanto que en ratones NR3C1^{ΔIEC} se registra además un incremento de *Star* y *Cyp11a1*, lo que sugiere una mayor inducción de síntesis *de novo* en el colon.

El hecho de que LRH-1, que ha sido considerado como el factor regulador principal de la síntesis de GC en el intestino, esté no sólo no aumentado, sino de hecho disminuido con el desarrollo de la colitis, resulta en principio sorprendente. Sin embargo, estudios recientes indican que el LRH-1 parece tener un papel más bien permisivo en este proceso. Así, se ha descrito que la expresión de CYP11A1 y CYP11B1 aumenta en la colitis aguda para luego volver a disminuir a medida que la inflamación se cronifica, mientras que la expresión de LRH-1 se mantiene constante en todo momento [353].

En este experimento se midió la expresión de GILZ (*Tsc22d3*) como marcador de la activación del receptor de GC, así como la fosforilación de éste. En la fase temprana GILZ presenta niveles superiores a los que se registran posteriormente, y más elevados en los ratones WT que en los delecionados. En la fase tardía no hay diferencias significativas, pero los niveles tienden a invertirse, es decir, a estar más elevados en los ratones NR3C1^{ΔIEC}.

En cuanto a las consecuencias de la deleción del NR3C1 en el epitelio intestinal a nivel del eje HPA en condiciones basales (es decir, sin colitis inducida), los ratones adrenalectomizados mostraron niveles esencialmente idénticos de producción de corticosterona en el colon, a diferencia de lo que ocurre en la piel. Se aprecia una cierta tendencia a la baja en aquél, que en ningún caso sería superior al ~10%. Por tanto, los niveles de corticosterona en la piel dependen en buena medida (50% aproximadamente) de la aportación central, en tanto que el colon es prácticamente independiente. No se detectaron apenas diferencias de ningún tipo entre los ratones NR3C1^{ΔIEC} y WT. Aun así, merece la pena destacar que los dos únicos valores de corticosterona plasmática que aparecen aumentados en la Figura 31B corresponden a las únicas dos hembras supervivientes. Por tanto, no se puede descartar que en este subgrupo pueda existir un flujo de corticosterona del intestino al plasma en alguna medida, tal vez de forma secundaria a la presencia de inflamación residual en hembras. Asimismo, el LRH-1 presenta expresión reducida en los ratones adrenalectomizados y con deleción; el significado biológico de esta observación es incierto. Como se ha indicado anteriormente, el papel del LRH-1 en la esteroidogénesis intestinal parece ser más permisivo que estrictamente regulador. Por último, la fosforilación del GR se vio atenuada en general en los ratones adrenalectomizados (significativamente sólo en los ratones WT), lo que indica un menor estado de activación; sin embargo, la expresión como tal no se ve afectada. El nivel de fosforilación está aumentado en los ratones delecionados; la expresión del receptor está sólo parcialmente disminuida porque

se trata de muestras de colon total. Por tanto, los datos corresponden al receptor subepitelial.

Con anterioridad se había manifestado un descenso de la corticosterona plasmática a la semana y a las dos semanas de la delección del gen *Nr3c1* en condiciones basales, la cual estaba asociada a un incremento de la corticosterona liberada por explantes colónicos. Una posible explicación de estos datos es una mayor captación intestinal de corticosterona plasmática. Nuestros datos en ratones adrenalectomizados indican que el colon (y presumiblemente también el intestino delgado) mantiene los niveles locales de corticosterona, lo que sugiere que éstos no dependen significativamente de la corticosterona central. Sin embargo, eso no descarta que la captación pueda producirse en otras circunstancias (es decir, cuando efectivamente haya hormona en el plasma).

El modelo más utilizado de cáncer colorrectal es el inducido por AOM. Este modelo reproduce de forma muy similar a la humana la secuencia mutación – displasia - adenoma – adenocarcinoma. Una variante especialmente relevante en este sentido del modelo es el cáncer colorrectal asociado a colitis, asociando una dosis única de AOM con un protocolo de colitis crónica inducida por DSS. Existe una conexión estrecha entre la inflamación intestinal crónica y el riesgo de cáncer, puesta de manifiesto especialmente en la colitis ulcerosa. Se estima que a partir de 10 años de la enfermedad el riesgo aumenta un 2%, y más aún con períodos de seguimiento más largos, y por este motivo se recomienda universalmente el seguimiento de los pacientes con carácter preventivo o de diagnóstico precoz de las lesiones neoplásicas [531]. Cuando se detectan estas lesiones, si el tumor está en fases muy iniciales se puede hacer una excisión local; en caso contrario, se procede a realizar una colectomía parcial o total. En nuestro caso, se realizó un estudio en el que se examinó el estado de los animales a las 2 semanas del fin del último ciclo de DSS, momento en el cual cabe esperar una inflamación mínima, así como una elevada incidencia de tumores colónicos (de hecho, la incidencia con este protocolo suele ser del 100%, o próxima a este valor).

Nuestros resultados confirman la gran eficiencia carcinogénica del modelo. De acuerdo con lo esperado, los animales generalmente perdieron peso en cada uno de los 3 ciclos de DSS y lo recuperaron paulatinamente en los períodos de descanso (las hembras WT presentaron una respuesta mucho menor, por razones poco claras, ver más adelante). La relación peso:longitud del colon fue significativamente menor en los ratones delecionados, lo que es coherente con el efecto protector de la delección en la colitis (excepto, como se ha indicado, en la fase

inicial). El número de tumores fue significativamente mayor en los ratones NR3C1^{ΔIEC} que en los WT, mientras que el tamaño de los mismos fue comparable. A nivel histológico, el aspecto de las lesiones tumorales/displásicas fue similar, excepto por la invasión de la submucosa por el tumor, que se detectó en un 36% de las muestras de animales WT, y en ninguna de los animales NR3C1^{ΔIEC}. Con respecto a la zona adyacente al tumor, éste expresa mayores niveles de *Mmp9*, *Hp*, *S100a9*, *Ptgs2* y *Nos2* [532-534]. Este hecho refleja un estado acusado de inflamación, pero la mayor expresión de COX2 (*Ptgs2*) apunta también al avance de la neoplasia, como corresponde a esta etapa del modelo, y como se ha documentado asimismo en humanos. En este sentido, es conocido el efecto quimiopreventivo de los AINE sobre el cáncer colorrectal [406]. En cuanto a la iNOS (*Nos2*), tiene efecto pro- o antitumoral en función de la línea celular que la exprese, el entorno en el cual se encuentre y la concentración de NO. La expresión por parte de las IECs promueve el tumor, ya que participa en la generación de radicales libres de nitrógeno y su consecuente daño al DNA. Por el contrario, la expresión de iNOS por parte de células inmunes como macrófagos M1 o neutrófilos, que generan cantidades mayores de NO, es un indicador de mejor prognosis, pues tiene efectos pro-apoptóticos y citostáticos [533]. Dos marcadores inflamatorios, concretamente *Hp* y *S100a9*, están incrementados adicionalmente en los ratones NR3C1^{ΔIEC}, y el *Ifng* presenta un perfil similar (p=0,06) pese a que el estado inflamatorio global está, como se ha indicado, atenuado en los mismos. En otras palabras, se trata de un fenómeno asociado al tumor. Por otra parte, únicamente los tumores de los ratones delecionados presentan una expresión aumentada de E-cadherina (*Cdh1*), *Tgfb1*, *Lgr5*, *Egfr*, *Vegfa*, *Myc*, *Snai1/2*. De ellos, *Cdh1* y *Tgfb1* se encuentran aumentados igualmente en la zona adyacente de los ratones NR3C1^{ΔIEC}. *Lgr5* es expresado por las células pluripotenciales de las criptas, y también por los tumores intestinales. TGFβ (*Tgfb1*) y VEGF (*Vegfa*) son factores de crecimiento, mientras que *Egfr* codifica el receptor de otro factor de crecimiento, el EGF. *Myc* es un importante gen implicado en la proliferación celular. *Snai1* y 2 codifican las proteínas SNAIL1 y 2 respectivamente, que son factores de transcripción que normalmente reprimen la expresión de genes como *Cdh1*, claudinas, ocludina, etc., y han sido implicadas en la EMT [535]. Su expresión es inducida por TGFβ [536]. Por el contrario, no se observaron diferencias en cuanto a ciclina D1. La imagen resultante por tanto es de una potenciación de la promoción del tumor en los ratones delecionados, que es más llamativa si se considera que la inflamación subyacente está atenuada en estos animales.

Es preciso indicar que los cambios mencionados se registraron mediante análisis por RT-qPCR. La determinación de metaloproteasas por multiplex en el sobrenadante de explantes tumorales en cultivo confirmó parcialmente el incremento de MMP9 (aunque sin registrarse diferencias significativas), pero no se observaron otras diferencias, excepto una menor cantidad de MMP3 en los ratones delecionados. Del mismo modo, la expresión de S100A9 fue similar según el análisis por *Western blot*, y no hubo cambios en los niveles de fosforilación de SMAD2/3, que está ligado a la transducción de señal de TGF β [536]. No obstante, este hecho puede explicarse en gran medida por la forma en que se obtuvieron las muestras en nuestro estudio. En efecto, las muestras principales de la zona tumoral y adyacente fueron destinadas al análisis por RT-qPCR e histológico; las restantes muestras fueron las utilizadas para el cultivo de explantes y *Western blot*. Dado que la tumorigénesis es un fenómeno intrínsecamente irregular, estas últimas muestras corresponden generalmente a tumores más pequeños o de alguna forma menos apreciables visualmente.

La vimentina (*Vim*) está disminuida en la zona adyacente al tumor de los ratones NR3C1 ^{Δ IEC}. Este gen codifica una proteína que promueve la interacción de los filamentos intermedios del citoesqueleto con la maquinaria motora frente a la E-cadherina. Se considera un marcador de células mesenquimales o en transición mesenquimal [400]. Por este motivo es posible relacionar la menor expresión con la tendencia reducida a la invasión de los tumores NR3C1 ^{Δ IEC}. Otro factor potencialmente relacionado es la mayor vigilancia inmunitaria por parte de las células NK, que se encuentran aumentadas en los ganglios mesentéricos de los ratones delecionados. No disponemos de datos directos de las poblaciones leucocitarias en la *lamina propria*, pero normalmente existe una correlación entre éstas y las presentes en los ganglios. No obstante, esta circunstancia no explica obviamente el mayor número de tumores en estos ratones. La razón podría ser de carácter temporal, asumiendo que las células NK proliferen en la fase de promoción del tumor. Es posible asimismo que la menor expresión de MMP3 esté relacionada con la menor invasividad [537].

Es interesante considerar el impacto del sexo de los animales en el fenotipo observado en el cáncer asociado a colitis, siempre teniendo en cuenta que, al no ser el objetivo del estudio, el tamaño de cada grupo es reducido y sólo pueden aventurarse hipótesis con los datos disponibles. Como puede observarse en la Figura 39, la curva de pesos corporales fue muy diferente en ratones WT machos y hembras. En concreto, los machos presentaron una pérdida acusada ya desde el primer ciclo, no llegando a recuperar el valor inicial en ningún momento. Por el

contrario, las hembras únicamente perdieron peso a partir del tercer ciclo. Como consecuencia, en el transcurso del experimento se registró una diferencia notable de peso corporal entre ambos grupos, del orden a veces del 20% del peso inicial, y que al final fue del 10% aproximadamente. El comportamiento de los animales NR3C1^{ΔIEC} fue muy diferente, ya que se produjo la pérdida esperable de peso sobre todo en el primer ciclo, así como con los posteriores, con un peso final muy similar al inicial, es decir, sin ganancia neta de peso, reflejando la patología subyacente. No hubo diferencias apreciables en este caso entre machos y hembras. En suma, los ratones NR3C1^{ΔIEC} presentaron una curva de peso exactamente intermedia entre los machos y hembras WT. Cuando se analizaron datos bioquímicos pormenorizadamente se constataron otras diferencias adicionales. Por ejemplo, la expresión de *Lgr5* fue máxima en la zona tumoral de ratones hembra NR3C1^{ΔIEC} (en este caso, no hay de hecho aumento en los machos, Figura 58A). Se da un perfil similar, aunque no tan marcado, con otros parámetros, como *Ptgs2*, *Cdh1* o *Nos2* (Figura 58B-D). Existen excepciones asimismo, como *S100a9*, que alcanza valores mayores en los machos (Figura 58E), o el número de tumores, que es mayor en ratones machos (Figura 58F). Por tanto, no existe correlación aparente entre la evolución del peso corporal y los parámetros bioquímicos. Desconocemos la razón de estas diferencias, pero en todo caso es muy destacable cómo la delección génica tiene un impacto a este nivel.

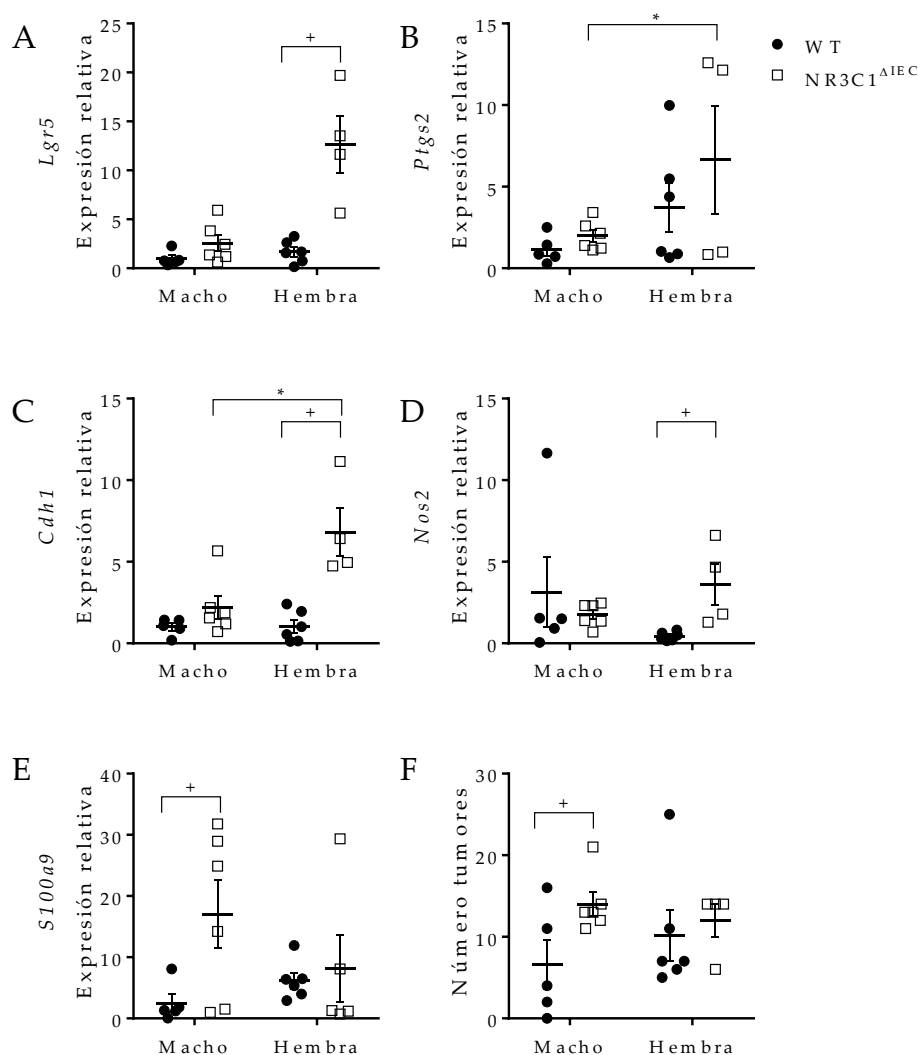


Figura 58. Diferencias en función del sexo en la expresión génica y en el número de tumores en el colon de ratones WT y NR3C1^{ΔIEC} a los que se le induce cáncer colorrectal mediante AOM/DSS. Expresión en la zona tumoral de *Lgr5* (A), *Ptgs2* (B), *Cdh1* (C), *Nos2* (D) y *S100a9* (E); Número de tumores (F) (n=4-6). Los datos se expresan como media ± error estándar. La significación estadística se estudió usando ANOVA de dos vías. *P<0,05 WT vs NR3C1^{ΔIEC}; *P<0,05 Adyacente vs Tumoral

Se ha defendido que los tumores intestinales tienden a producir un mayor nivel de GC con objeto de evadir la respuesta inmune y de esta forma alcanzar un mayor grado de crecimiento [418]. Nuestros datos no concuerdan con esta hipótesis, dado que los explantes tumorales producen cantidades similares de corticosterona a los de los explantes de la zona adyacente. Una limitación de nuestro estudio es que nuestra referencia fue la zona no tumoral inmediatamente adyacente, por lo que no puede excluirse totalmente la posibilidad de que la respuesta esteroidogénica esté efectivamente implicada en el seno del propio tumor. Los niveles plasmáticos fueron similares en ratones WT y NR3C1^{ΔIEC}.

La relación entre la inflamación crónica y el cáncer intestinal se ha achacado tanto al riesgo de genotoxicidad asociado al estrés oxidativo y celular que se produce en el foco inflamatorio como al uso de fármacos inmunosupresores. En un estudio observacional reciente llevado a cabo en una cohorte de pacientes daneses no se ha constatado el incremento del riesgo de CRC, lo que se ha atribuido a un mejor control de la inflamación [385].

La delección génica del receptor NR3C1 da lugar a diversas alteraciones fenotípicas anteriormente descritas, que obedecen en mayor o menor medida a cambios en la biología del epitelio intestinal, dada la especificidad de esta maniobra experimental. En la presente tesis doctoral se han utilizado cultivos primarios de epitelio intestinal para explorar la naturaleza de dichos cambios en ausencia del contexto fisiológico de este tipo celular, principalmente células inmunes y posibles fenómenos compensatorios.. Concretamente se han utilizado organoides de yeyuno. Como se ha explicado anteriormente, los organoides son cultivos tridimensionales *in vitro* de tejidos, generados a partir de células madre del epitelio. Dan lugar a estructuras formadas por todas las líneas celulares epiteliales en proporciones similares a las observadas *in vivo*, y polarizadas de tal forma que integran una minivesícula que contiene un pequeño lumen. Se obtuvieron organoides de yeyuno tanto de ratones WT como de NR3C1^{ΔIEC}. En el momento de llevar a cabo el estudio no estaba disponible la técnica para epitelio colónico, aunque se trata de un objetivo claro para un futuro cercano.

Los organoides procedentes de ratones NR3C1^{ΔIEC} presentan una mayor expresión de quimioquinas (*Cxcl1* y *Ccl2*) que los organoides WT ante la estimulación con TNF+FBS (y LPS). Así pues, la ausencia de GR en el epitelio intestinal provoca *per se* una mayor producción de quimioquinas en condiciones de estimulación. Esta respuesta incrementada constituía uno de los mecanismos formulados como hipótesis para explicar la respuesta inflamatoria transitoria secundaria a la delección del gen, y concuerda con los resultados obtenidos en el RNAseq de IECs, así como con el conjunto de parámetros que ponen de manifiesto el desarrollo de colitis. Por otro lado, la deficiencia en el GR parece disminuir la capacidad de las células epiteliales para producir péptidos antimicrobianos como la DEF1 α o REG3 γ tras el contacto con LPS, así como de TFF3. Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo adicional de alteración de la función barrera, el cual podría conducir a un incremento de la translocación bacteriana.

Como era de esperar, la ausencia de GR provoca un aumento en la proliferación epitelial *in vitro*, reflejado en la mayor expresión de *Myc* en condiciones basales y ante la estimulación con TNF+FBS y LPS, así como de ciclina D1 en condiciones basales. Los procesos de reepitelización que intervienen en la reparación epitelial que tiene lugar ante cualquier lesión mucosal dependen en parte de la activación de la proliferación celular. En el caso de la colitis, este proceso es fundamental para restaurar el epitelio dañado. El mejor estado y menor pérdida de peso de los ratones NR3C1^{ΔIEC} en la fase tardía de colitis experimental por DSS (7 días) podría deberse en parte a este fenómeno.

Por otra parte, la proliferación celular es también fundamental en el desarrollo de neoplasias, especialmente en el CAC, donde el origen de la división descontrolada reside en los sucesivos periodos de inflamación y regeneración epitelial que producen una sobreactivación de la vía Wnt, sin que sea necesaria ninguna mutación. *Ccnd1* y *Myc* son dos genes regulados por esta vía. El hecho de que la pérdida de GR por sí sola genere un aumento en la expresión de ambos explicaría que los ratones NR3C1^{ΔIEC} sometidos a AOM/DSS presenten un mayor número de tumores.

En cuanto al estudio de la esteroidogénesis local en organoides, a diferencia de los resultados del Dr. Brunner [12, 73, 74, 80], en nuestro caso no hemos comprobado que el TNF genere un aumento de la producción de corticosterona por IECs, a pesar de presentar un efecto netamente proinflamatorio. Es conveniente destacar que la mayor parte de la evidencia disponible en este sentido ha sido obtenida en experimentos *in vivo*. Hasta donde sabemos, no existe ningún estudio al respecto utilizando organoides. Un aspecto reseñable adicional es que en nuestros experimentos no se observaron diferencias en la concentración de corticosterona en el medio de cultivo tras la adición de metirapona, un inhibidor de CYP11B1 utilizado comúnmente para bloquear la esteroidogénesis. Este resultado sugeriría en principio que no ha habido síntesis *de novo*, es decir, que la corticosterona presente en el medio de cultivo de los organoides no procede de las células epiteliales. Dado que este medio es definido, es decir, carente de suero animal, es posible que los GC formen parte del mismo *ex profeso*. En esas circunstancias cabría esperar que la esteroidogénesis epitelial estuviera inhibida, y que por tanto no se observase efecto alguno de la metirapona. Sin embargo, tampoco se observó una disminución de los niveles de corticosterona en el medio de cultivo de los explantes de colon en presencia de este inhibidor. En este caso el medio utilizado incorpora suero bovino fetal previamente tratado con carbón activo, que adsorbe los GC presentes en el mismo, de forma que el medio no

contiene GC. Este hecho es especialmente sorprendente en los explantes de colon inflamado, en la medida en que la esteroidogénesis es especialmente activa en estas condiciones. Sin embargo, nuestros resultados confirman la presencia de niveles cambiantes de corticosterona en los explantes, lo que concuerda que la esteroidogénesis. Por el momento carecemos de explicación para la ausencia de efecto inhibitor de la metirapona.

Una de las observaciones más destacables de la presente tesis doctoral es el aumento de la concentración de corticosterona en el medio de organoides NR3C1^{ΔIEC} en comparación con los WT, tanto en condiciones basales como bajo estimulación con TNF. Ello induce a pensar que el GR participa de alguna forma en la regulación de la esteroidogénesis local, presumiblemente por retroalimentación negativa. Mecánicamente, sin embargo, este fenómeno precisa un enfoque experimental más amplio, ya que la expresión de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis no permite explicar el fenotipo. Así, se observa una menor expresión de CYP11B1 y LRH-1 en condiciones basales en ratones NR3C1^{ΔIEC}, así como tras la estimulación con TNF+FBS (LRH-1 únicamente).

CONCLUSIONES

1. El receptor epitelial de glucocorticoides se encuentra activado de forma basal en las células epiteliales intestinales en el ratón. Su pérdida genera una inflamación colónica transitoria debida a alteraciones en la permeabilidad intestinal y/o a una mayor señalización proinflamatoria por parte del epitelio y de linfocitos infiltrados, donde la microbiota parece tener un papel fundamental, en la medida en que dicha respuesta no se manifiesta en el intestino delgado.
2. El receptor epitelial intestinal de glucocorticoides tiene un papel dual en la respuesta a la colitis experimental inducida por DSS. Inicialmente ejerce un efecto perjudicial, ya que su delección potencia el daño en la fase temprana de la exposición a DSS. Sin embargo, a medida que se desarrolla la respuesta inflamatoria la delección del receptor es netamente protectora, hasta el punto de evitar la muerte del 48% de los animales en un protocolo crónico de colitis.
3. El tratamiento de la colitis experimental inducida por DSS con dosis supraterapéuticas de budesonida se ve potenciado por la ausencia del receptor epitelial intestinal de glucocorticoides. Este efecto se observa únicamente en hembras, lo que puede deberse a una interacción receptoral específica o bien simplemente a la mayor gravedad de la inflamación en las mismas. Estos resultados sugieren que la respuesta clínica de la inflamación intestinal a glucocorticoides podría ser mejorada en ausencia de acciones a nivel epitelial.
4. El GR del epitelio intestinal participa en la regulación de la síntesis de corticosterona *de novo*, posiblemente a través de una retroalimentación negativa. La potenciación de la síntesis intestinal de corticosterona se correlaciona con la protección frente a la colitis, y por tanto puede estar implicada desde el punto de vista mecánico.
5. En el ratón la esteroidogénesis intestinal es suficiente para el mantenimiento de los niveles locales de corticosterona, mientras que en la piel existe una dependencia parcial.
6. La delección del GR del epitelio intestinal incrementa la proliferación celular y provoca una mayor carga tumoral en el cáncer colorrectal asociado a colitis experimental inducido por AOM/DSS, aunque estos tumores son menos invasivos.

CONCLUSIONS

1. The intestinal epithelial glucocorticoid receptor is basally activated in the mouse colon *in vivo*. Its loss provokes transitory colonic inflammation, presumably due to alterations in the intestinal permeability and/or a higher proinflammatory signaling by the epithelium and infiltrated TCR $\gamma\delta$ + lymphocytes, where the intestinal microbiote seems to play an essential role, as this response is not present in the small intestine.
2. The intestinal epithelial glucocorticoid receptor has a dual role in DSS-induced experimental colitis. Initially, it exerts a deleterious effect, as its absence worsens animal status in the early phase of exposure to DSS. However, as the inflammatory response is established, the deletion of the receptor is clearly protective, to the point of preventing 48% of animal deaths in a chronic colitis protocol.
3. Budesonide treatment of experimental colitis induced by DSS at supratherapeutic doses is strengthened by the absence of the intestinal epithelial glucocorticoid receptor. This effect is observed only in female mice. The mechanism may be related to a specific interaction of the receptor, or simply to the fact that inflammation is more pronounced in females. These results suggest that the clinical response of intestinal inflammation to glucocorticoids could be improved in the absence of epithelial actions.
4. The intestinal epithelial NR3C1 collaborates in the regulation of *the novo* corticosterone synthesis, possibly through a negative feedback. The resulting increased intestinal corticosterone synthesis is correlated to the protection against colitis, and therefore could be mechanistically involved.
5. In mice, intestinal steroidogenesis is sufficient to the maintenance of the local levels of corticosterone, while in the skin a partial dependence is observed.
6. The deletion of intestinal epithelial NR3C1 increases cellular proliferation and causes a higher tumor load in the AOM/DSS induced experimental colitis-associated colorectal cancer model, although these tumors are less invasive.

ANEXOS

11 β -HSD	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACTH	Adrenocorticotropina
AOM	Azoximetano
AP	<i>Activator protein 1</i>
APC	Células presentadoras de antígenos
AR	Receptor de andrógenos
AVP	Arginina vasopresina
BCL	<i>B cell Lymphoma</i>
BD	Budesonida
CAC	Cáncer colorrectal asociado a colitis
CBG	Globulina de unión a corticoides
CD	Clúster de diferenciación
COX	Ciclooxigenasa
CRC	Cáncer colorrectal
CRH	Hormona liberadora de corticotropina (<i>corticotropin releasing hormone</i>)
CRHR	Receptor de hormona liberadora de corticotropina
CU	Colitis Ulcerosa
CXCR1	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 1</i>
DBD	Dominio de unión a DNA
DMEM	<i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DSS	Dextrano de sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMT	Transición epithelial a mesenquimal
ER	Receptor de estrógenos

FBI	Función de barrera intestinal
FBS	Suero bovino fetal
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino (<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
GC	Glucocorticoide(s)
G-CSF	Factor estimulante de las colonias de granulocitos
GF	Esterilidad total (<i>Germ-free</i>)
GILZ	<i>Glucocorticoid induced leucine zipper</i>
GM-CSF	Factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos
GR	Receptor de Glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
H&E	Hematoxilina y eosina
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HPA	Hipotálamo-hipofisario-adrenal (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>)
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IEC	Células intestinales epiteliales
IEL	Linfocito intraepitelial
IFN γ	Interferón γ
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
KO	<i>Knock-out</i>
LBD	Dominio de unión a ligando
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen 1</i>
LH	Hormona luteinizante
LPMC	Células mononucleares de la <i>lamina propria</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRH-1	Receptor homólogo hepático 1 (<i>Liver receptor hepatic 1</i>)
MAM	Metilazoximetanol

MC	Mineralocorticoides
MC2R	Receptor de melanocortina tipo 2
MHC-II	Moléculas del complejo de principal de histocompatibilidad de clase II
MLC	<i>Myosin like chain</i>
MLCK	<i>Myosin like chain kinase</i>
MLN	Nódulos linfoides mesentéricos
MMP	Metaloproteasa
MR	Receptor de mineralocorticoides
NHE3	Intercambiador sodio-hidrógeno 3
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptores de tipo NOD
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
NOTCH	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
NR3C1	Receptor nuclear 3C1
NTD	Dominio N-terminal
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPIB	<i>Peptidylprolyl Isomerase B</i>
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed Sequence</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SF-1	Factor esteroideogénico 1 (<i>steroidogenic factor 1</i>)
SGK1	<i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1</i>
SGLT1	Proteína cotransportadores sodio-glucosa 1

StAR	Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	Receptor de linfocitos
TGF	Factor de crecimiento transformador
Th	<i>T helper</i>
TLR	Receptor tipo Toll
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF	Factor de necrosis nuclear
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>very late activation antigen 4</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>

BIBLIOGRAFÍA

1. Addison, T., *On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsule*, in *A collection of the published writings of the late Thomas Addison MD*. 1868: London : the New Sydenham Society.
2. Hillier, S.G., *Diamonds are forever: the cortisone legacy*. *J Endocrinol*, 2007. **195**(1): p. 1-6.
3. Sarett, L.H., *Partial synthesis of pregnene-4-triol-17(beta), 20(beta), 21-dione-3,11 and pregnene-4-diol-17(beta), 21-trione-3,11,20 monoacetate*. *J Biol Chem*, 1946. **162**: p. 601-31.
4. Kendall, E.C., *The development of cortisone as a therapeutic agent*. *Antibiot Chemother (Northfield)*, 1951. **1**(1): p. 7-15.
5. Zelena, D. and B.G. Makara, *[Steroids: The physiologic and pharmacologic effects of glucocorticoids]*. *Orv Hetil*, 2015. **156**(35): p. 1415-25.
6. Benedek, T.G., *History of the development of corticosteroid therapy*. *Clin Exp Rheumatol*, 2011. **29**(5 Suppl 68): p. S-5-12.
7. Cain, D.W. and J.A. Cidlowski, *Immune regulation by glucocorticoids*. *Nat Rev Immunol*, 2017. **17**(4): p. 233-247.
8. Flynn, B.P., B.L. Conway-Campbell, and S.L. Lightman, *The emerging importance of ultradian glucocorticoid rhythms within metabolic pathology*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2018. **79**(3): p. 112-114.
9. Ohbuchi, T., J. Haam, and J.G. Tasker, *Regulation of Neuronal Activity in Hypothalamic Vasopressin Neurons*. *Interdiscip Inf Sci*, 2015. **21**(3): p. 225-234.
10. Spiga, F., et al., *HPA axis-rhythms*. *Compr Physiol*, 2014. **4**(3): p. 1273-98.
11. Miller, W.L., *Steroidogenesis: Unanswered Questions*. *Trends Endocrinol Metab*, 2017. **28**(11): p. 771-793.
12. Phan, T.S., V.M. Merk, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis at epithelial barriers*. *Genes Immun*, 2019.
13. Parker, K.L., *The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function*. *Mol Cell Endocrinol*, 1998. **140**(1-2): p. 59-63.
14. Kalsbeek, A., et al., *Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **349**(1): p. 20-9.
15. Laryea, G., et al., *Dissection of glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by gene targeting in mice*. *Front Neuroendocrinol*, 2015. **36C**: p. 150-164.
16. Turnbull, A.V. and C.L. Rivier, *Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 1-71.
17. Bornstein, S.R., et al., *Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human adrenals*. *Horm Metab Res*, 2004. **36**(7): p. 470-3.
18. Bornstein, S.R., et al., *The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1088**: p. 307-18.
19. Wieck, A., et al., *Differential neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress in women with type 1 bipolar disorder*. *Brain Behav Immun*, 2013. **34**: p. 47-55.

20. Steigbigel, N.H., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. *Curr Infect Dis Rep*, 2003. **5**(5): p. 363-364.
21. Chatterjee, S., et al., *Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock*. *J Surg Res*, 2007. **140**(1): p. 99-108.
22. Krakauer, T. and M. Buckley, *Dexamethasone attenuates staphylococcal enterotoxin B-induced hypothermic response and protects mice from superantigen-induced toxic shock*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(1): p. 391-5.
23. Medzhitov, R., *Septic shock: on the importance of being tolerant*. *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 799-800.
24. Bornstein, S.R. and J. Briegel, *A new role for glucocorticoids in septic shock: balancing the immune response*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(4): p. 485-6.
25. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system*. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(7): p. 374-81.
26. Mayer, E.A., et al., *V. Stress and irritable bowel syndrome*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(4): p. G519-24.
27. Anagnostis, P., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?* *Metabolism*, 2013. **62**(1): p. 21-33.
28. Bujalska, I.J., S. Kumar, and P.M. Stewart, *Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"?* *Lancet*, 1997. **349**(9060): p. 1210-3.
29. Tomlinson, J.W., et al., *Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 857-64.
30. Tomlinson, J.W., et al., *Weight loss increases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2711-6.
31. Feig, P.U., et al., *Effects of an 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, MK-0916, in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome*. *Diabetes Obes Metab*, 2011. **13**(6): p. 498-504.
32. Tomlinson, J.W., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(5): p. 831-66.
33. Chapman, K., M. Holmes, and J. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(3): p. 1139-206.
34. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. *Lancet*, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
35. Hammond, G.L., et al., *Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(15): p. 5153-7.

36. Mendel, C.M., *The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model*. *Endocr Rev*, 1989. **10**(3): p. 232-74.
37. Pemberton, P.A., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation*. *Nature*, 1988. **336**(6196): p. 257-8.
38. Singer, C.J., M.S. Khan, and W. Rosner, *Characteristics of the binding of corticosteroid-binding globulin to rat cell membranes*. *Endocrinology*, 1988. **122**(1): p. 89-96.
39. Strel'chyonok, O.A. and G.V. Avvakumov, *Interaction of human CBG with cell membranes*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991. **40**(4-6): p. 795-803.
40. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(1): p. 33-45.
41. Hwang, J.L. and R.E. Weiss, *Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2014. **30**(2): p. 96-102.
42. Lee, M.J., et al., *Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(3): p. 473-81.
43. Geer, E.B., J. Islam, and C. Buettner, *Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014. **43**(1): p. 75-102.
44. Pimenta, E., M. Wolley, and M. Stowasser, *Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess*. *Endocrinology*, 2012. **153**(11): p. 5137-42.
45. Fardet, L., I. Petersen, and I. Nazareth, *Risk of cardiovascular events in people prescribed glucocorticoids with iatrogenic Cushing's syndrome: cohort study*. *BMJ*, 2012. **345**: p. e4928.
46. Johannsson, G. and O. Ragnarsson, *Cardiovascular and metabolic impact of glucocorticoid replacement therapy*. *Front Horm Res*, 2014. **43**: p. 33-44.
47. Nussinovitch, U., et al., *Glucocorticoids and the cardiovascular system: state of the art*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(32): p. 3574-85.
48. Hanaoka, B.Y., et al., *Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(8): p. 448-57.
49. Kuo, T., et al., *Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(28): p. 11160-5.
50. Larsson, L., et al., *Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(1): p. 34-45.
51. Hanaoka, B.Y., C.A. Peterson, and L.J. Crofford, *Glucocorticoid effects on skeletal muscle: benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012. **8**(8): p. 695-7.

52. Goldstein, M.F., J.J. Fallon, Jr., and R. Harning, *Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease*. *Chest*, 1999. **116**(6): p. 1733-49.
53. Pearce, G., et al., *The deleterious effects of low-dose corticosteroids on bone density in patients with polymyalgia rheumatica*. *Br J Rheumatol*, 1998. **37**(3): p. 292-9.
54. Silva, E.J., et al., *Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology*. *J Androl*, 2011. **32**(6): p. 614-24.
55. Moisiadis, V.G. and S.G. Matthews, *Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(7): p. 403-11.
56. Harris, A. and J. Seckl, *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. *Horm Behav*, 2011. **59**(3): p. 279-89.
57. Manwani, N., et al., *Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010. **43**(5): p. 599-606.
58. Sevilla, L.M., et al., *Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(2): p. 361-70.
59. Pazirandeh, A., et al., *Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells*. *FASEB J*, 1999. **13**(8): p. 893-901.
60. Talaber, G., M. Jondal, and S. Okret, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: immune regulation and aspects on local organ homeostasis*. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **380**(1-2): p. 89-98.
61. Hostettler, N., et al., *Local glucocorticoid production in the mouse lung is induced by immune cell stimulation*. *Allergy*, 2012. **67**(2): p. 227-34.
62. Taves, M.D., C.E. Gomez-Sanchez, and K.K. Soma, *Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **301**(1): p. E11-24.
63. Young, M.J., et al., *Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(11): p. 5121-6.
64. Slominski, A., et al., *A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450_{scc} system in mammalian skin*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(21): p. 4178-88.
65. Cirillo, N. and S.S. Prime, *Keratinocytes synthesize and activate cortisol*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1499-505.
66. Hannen, R.F., et al., *Steroid synthesis by primary human keratinocytes; implications for skin disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **404**(1): p. 62-7.
67. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. *Dermatoendocrinol*, 2011. **3**(1): p. 3-10.
68. Vukelic, S., et al., *Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 10265-75.
69. Keeney, D.S., C.M. Jenkins, and M.R. Waterman, *Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo*. *Endocrinology*, 1995. **136**(11): p. 4872-9.

70. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1635-46.
71. Atanasov, A.G., et al., *Cell cycle-dependent regulation of extra-adrenal glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial cells*. FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4117-25.
72. Mueller, M., et al., *The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2057-62.
73. Noti, M., et al., *Lipopolysaccharide induces intestinal glucocorticoid synthesis in a TNFalpha-dependent manner*. FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1340-6.
74. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): p. 1057-66.
75. Mueller, M., et al., *Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1445-53.
76. Val, P., et al., *SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues*. Nucl Recept, 2003. **1**(1): p. 8.
77. Fayard, E., J. Auwerx, and K. Schoonjans, *LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 250-60.
78. Brunner, T., et al., *Regulation of cell death and survival in intestinal intraepithelial lymphocytes*. Cell Death Differ, 2001. **8**(7): p. 706-14.
79. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.
80. Bouguen, G., et al., *Intestinal steroidogenesis*. Steroids, 2015.
81. Wada-Hiraike, O., et al., *Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2959-64.
82. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
83. Quinkler, M., et al., *Expression of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is decreased in patients with impaired renal function*. Eur J Endocrinol, 2005. **153**(2): p. 291-9.
84. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
85. Lewis-Tuffin, L.J., et al., *Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2266-82.
86. Kino, T., Y.A. Su, and G.P. Chrousos, *Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(21): p. 3435-48.
87. Heck, S., et al., *A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1*. EMBO J, 1994. **13**(17): p. 4087-95.

88. Hakim, A., et al., *Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity*. *FASEB J*, 2013. **27**(11): p. 4510-9.
89. Fant, M.E., J. Yeakley, and R.W. Harrison, *Evidence for carrier-mediated transport of glucocorticoids by human placental membrane vesicles*. *Biochim Biophys Acta*, 1983. **731**(3): p. 415-20.
90. Pratt, W.B., et al., *Chaperoning of glucocorticoid receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(172): p. 111-38.
91. Vandevyver, S., L. Dejager, and C. Libert, *On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back*. *Traffic*, 2012. **13**(3): p. 364-74.
92. Wagstaff, K.M. and D.A. Jans, *Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms*. *Traffic*, 2009. **10**(9): p. 1188-98.
93. Tsai, S.Y., et al., *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation*. *Cell*, 1988. **55**(2): p. 361-9.
94. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(9): p. 518-30.
95. Nixon, M., R. Andrew, and K.E. Chapman, *It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions*. *Steroids*, 2013. **78**(1): p. 59-68.
96. Malkoski, S.P. and R.I. Dorin, *Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(10): p. 1629-44.
97. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(2): p. 752-6.
98. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13504-9.
99. Langlais, D., et al., *The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome*. *Mol Cell*, 2012. **47**(1): p. 38-49.
100. Jonat, C., et al., *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. *Cell*, 1990. **62**(6): p. 1189-204.
101. Schule, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. *Cell*, 1990. **62**(6): p. 1217-26.
102. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5549-5556.
103. Wang, C., Y. Liu, and J.-M. Cao, *G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. **15**(9): p. 15412-15425.

104. Ayroldi, E., et al., *Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways*. *FASEB J*, 2012. **26**(12): p. 4805-20.
105. Busillo, J.M. and J.A. Cidlowski, *The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore*. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. **24**(3): p. 109-19.
106. Savory, J.G., et al., *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 781-93.
107. Trapp, T., et al., *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS*. *Neuron*, 1994. **13**(6): p. 1457-62.
108. Liu, W., et al., *Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(26): p. 12480-4.
109. Pepin, M.C., F. Pothier, and N. Barden, *Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 725-8.
110. Cole, T.J., et al., *Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1608-21.
111. Reichardt, H.M., et al., *DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival*. *Cell*, 1998. **93**(4): p. 531-41.
112. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1064**: p. 315-36.
113. Li, A., et al., *Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63578.
114. Habermehl, D., et al., *Glucocorticoid activity during lung maturation is essential in mesenchymal and less in alveolar epithelial cells*. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(8): p. 1280-8.
115. Goodwin, J.E., et al., *The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(2): p. 266-71.
116. Goodwin, J.E., et al., *Knockout of the vascular endothelial glucocorticoid receptor abrogates dexamethasone-induced hypertension*. *J Hypertens*, 2011. **29**(7): p. 1347-56.
117. Sainte-Marie, Y., et al., *Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block*. *FASEB J*, 2007. **21**(12): p. 3133-41.
118. Watson, M.L., et al., *A cell-autonomous role for the glucocorticoid receptor in skeletal muscle atrophy induced by systemic glucocorticoid exposure*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(10): p. E1210-20.
119. Rauch, A., et al., *Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2010. **11**(6): p. 517-31.

120. Preusch, M.R., et al., *Critical role of macrophages in glucocorticoid driven vascular calcification in a mouse-model of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2158-64.
121. Baschant, U., et al., *Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(48): p. 19317-22.
122. Rose, A.J., et al., *Molecular control of systemic bile acid homeostasis by the liver glucocorticoid receptor*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 123-30.
123. Gesina, E., et al., *Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development*. *Diabetes*, 2004. **53**(9): p. 2322-9.
124. Mueller, K.M., et al., *Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Attenuates Aging- and Hfd-Induced Obesity, and Impairs the Feeding-Fasting Transition*. *Diabetes*, 2016.
125. Sevilla, L.M., et al., *Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015.
126. Sanchis, A., et al., *Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29701.
127. Hannen, R., et al., *Dysfunctional Skin-Derived Glucocorticoid Synthesis Is a Pathogenic Mechanism of Psoriasis*. *J Invest Dermatol*, 2017. **137**(8): p. 1630-1637.
128. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in enterocytes*. *Endocrinology*, 2012. **153**(4): p. 1783-94.
129. Reichardt, S.D., et al., *Glucocorticoids induce gastroparesis in mice through depletion of l-arginine*. *Endocrinology*, 2014. **155**(10): p. 3899-908.
130. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
131. Kelly, J.K. and T.O. Siu, *The strictures, sinuses, and fissures of Crohn's disease*. *J Clin Gastroenterol*, 1986. **8**(5): p. 594-8.
132. Lohsiriwat, V. and S.K. Clark, *Persistent perineal sinus after ileoanal pouch excision in inflammatory bowel diseases: incidence, risk factors, and clinical course*. *Dis Colon Rectum*, 2008. **51**(12): p. 1795-9.
133. Cheung, O. and M.D. Regueiro, *Inflammatory bowel disease emergencies*. *Gastroenterol Clin North Am*, 2003. **32**(4): p. 1269-88.
134. Brahme, F. and C. Lindstrom, *A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis*. *Gut*, 1970. **11**(11): p. 928-40.
135. Bolondi, L., et al., *Changes in splanchnic hemodynamics in inflammatory bowel disease. Non-invasive assessment by Doppler ultrasound flowmetry*. *Scand J Gastroenterol*, 1992. **27**(6): p. 501-7.
136. Lott, M.F. and J.D. Davies, *Lymph node hypervascularity: haemangiomatoid lesions and pan-nodal vasodilatation*. *J Pathol*, 1983. **140**(3): p. 209-19.

137. Mortensen, N., *Fulminant acute and diffuse chronic ulcerative colitis--the argument for surgery*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(3): p. 289.
138. Wong, C.K. and B.R. Yacyszyn, *Fulminant Ulcerative Colitis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. **3**(3): p. 217-226.
139. Geboes, K., et al., *Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(6): p. 850-7.
140. Rose, J.D., et al., *Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years*. Gut, 1988. **29**(3): p. 346-51.
141. Garland, C.F., et al., *Incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease in fifteen areas of the United States*. Gastroenterology, 1981. **81**(6): p. 1115-24.
142. Bonnevie, O., *A socio-economic study of patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1967. **2**(2): p. 129-36.
143. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
144. Kull, K., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Estonian patients with inflammatory bowel disease. Prevalence and diagnostic role*. Hepatogastroenterology, 1998. **45**(24): p. 2132-7.
145. Ihasz, M., et al., *Surgical relations of Crohn's disease and the frequency of recurrence*. Acta Chir Hung, 1995. **35**(1-2): p. 63-75.
146. Sonnenberg, A., *Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 206-11.
147. Kugathasan, S., et al., *Epidemiologic and clinical characteristics of children with newly diagnosed inflammatory bowel disease in Wisconsin: a statewide population-based study*. J Pediatr, 2003. **143**(4): p. 525-31.
148. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
149. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.
150. Segal, I., et al., *The rarity of ulcerative colitis in South African blacks*. Am J Gastroenterol, 1980. **74**(4): p. 332-6.
151. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1989. **97**(4): p. 900-4.
152. Zhang, W., et al., *Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-kappaB pathway gene, HEATR3*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 310-6.
153. Kenny, E.E., et al., *A genome-wide scan of Ashkenazi Jewish Crohn's disease suggests novel susceptibility loci*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002559.
154. El-Tawil, A.M., *Jews and inflammatory bowel disease*. J Gastrointest Liver Dis, 2009. **18**(2): p. 137-8.
155. Chiodini, R.J., et al., *Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1984. **29**(12): p. 1073-9.

156. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes* infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
157. Parent, K. and P. Mitchell, *Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (group Va) bacteria in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1978. **75**(3): p. 368-72.
158. Kangro, H.O., et al., *A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1990. **98**(3): p. 549-53.
159. Momotani, E., et al., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice*. Springerplus, 2012. **1**(1): p. 47.
160. Burke, D.A. and A.T. Axon, *Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea*. *BMJ*, 1988. **297**(6641): p. 102-4.
161. Ohkusa, T., et al., *Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **17**(8): p. 849-53.
162. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
163. Negroni, A., et al., *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(5): p. 913-24.
164. Higgins, P.D., et al., *Prior Helicobacter pylori infection ameliorates Salmonella typhimurium-induced colitis: mucosal crosstalk between stomach and distal intestine*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(6): p. 1398-408.
165. Fukuda, Y., et al., *Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine*. *Digestion*, 2001. **63 Suppl 1**: p. 93-6.
166. Kirsner, J.B. and J.A. Spencer, *Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*. *Ann Intern Med*, 1963. **59**: p. 133-44.
167. Saro Gismera, C., et al., *[Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in Gijon, Asturias]*. *Gastroenterol Hepatol*, 2001. **24**(5): p. 228-35.
168. Weterman, I.T. and A.S. Pena, *Familial incidence of Crohn's disease in The Netherlands and a review of the literature*. *Gastroenterology*, 1984. **86**(3): p. 449-52.
169. McConnell, R.B., *Ulcerative colitis--genetic features*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1983. **88**: p. 14-6.
170. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. *Gut*, 1988. **29**(7): p. 990-6.
171. Halfvarson, J., et al., *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1767-73.
172. Thompson, N.P., et al., *Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study*. *BMJ*, 1996. **312**(7023): p. 95-6.

173. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. *Nat Genet*, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
174. Ohmen, J.D., et al., *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(10): p. 1679-83.
175. Economou, M., et al., *Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis*. *Am J Gastroenterol*, 2004. **99**(12): p. 2393-404.
176. Fernandez, L., et al., *IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(6): p. 715-22.
177. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(4): p. e58.
178. Schmechel, S., et al., *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. **14**(2): p. 204-12.
179. Glas, J., et al., *rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants*. *PLoS One*, 2007. **2**(9): p. e819.
180. Cox, J.H., et al., *Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(1): p. 99-109.
181. Kamada, N., et al., *Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6900-8.
182. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
183. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility*. *Nat Genet*, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
184. Prescott, N.J., et al., *A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(5): p. 1665-71.
185. Cadwell, K., et al., *A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells*. *Nature*, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
186. Van Limbergen, J., G. Radford-Smith, and J. Satsangi, *Advances in IBD genetics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014. **11**(6): p. 372-85.
187. Liang, J., S.M. Sha, and K.C. Wu, *Role of the intestinal microbiota and fecal transplantation in inflammatory bowel diseases*. *J Dig Dis*, 2014. **15**(12): p. 641-6.
188. Machiels, K., et al., *A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2014. **63**(8): p. 1275-83.

189. Sha, S., et al., *The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. **75**(3): p. 245-51.
190. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(1): p. 44-54.
191. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3380-9.
192. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2011. **17**(1): p. 179-84.
193. Riol-Blanco, L., et al., *IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections*. *J Immunol*, 2010. **184**(4): p. 1710-20.
194. Goyal, R.K. and I. Hirano, *The enteric nervous system*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(17): p. 1106-15.
195. Rao, S.S., et al., *Psychological and physical stress induce differential effects on human colonic motility*. *Am J Gastroenterol*, 1998. **93**(6): p. 985-90.
196. Enck, P., et al., *Stress effects on gastrointestinal transit in the rat*. *Gut*, 1989. **30**(4): p. 455-9.
197. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of psychological stress on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 91-7.
198. Wallon, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro*. *Gut*, 2008. **57**(1): p. 50-8.
199. Wlk, M., et al., *Corticotropin-releasing hormone antagonists possess anti-inflammatory effects in the mouse ileum*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(2): p. 505-15.
200. Reber, S.O., et al., *Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration*. *Endocrinology*, 2006. **147**(10): p. 4968-76.
201. Reber, S.O., et al., *Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms*. *Stress*, 2008. **11**(3): p. 225-34.
202. Matsunaga, H., et al., *Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011. **301**(3): p. G555-64.
203. Schwarz, S.P. and E.B. Blanchard, *Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease*. *Behav Res Ther*, 1991. **29**(2): p. 167-77.
204. Jantschek, G., et al., *Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1998. **33**(12): p. 1289-96.

205. Keller, W., et al., *Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the German Prospective Multicenter Psychotherapy Treatment study on Crohn's Disease*. J Psychosom Res, 2004. **56**(6): p. 687-96.
206. Persson, P.G., A. Ahlbom, and G. Hellers, *Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study*. Epidemiology, 1992. **3**(1): p. 47-52.
207. Russel, M.G., et al., *Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998. **10**(3): p. 243-9.
208. Shoda, R., et al., *Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(5): p. 741-5.
209. Geerling, B.J., et al., *Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(4): p. 1008-13.
210. Endres, S., et al., *Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation*. J Leukoc Biol, 1993. **54**(6): p. 599-603.
211. Meydani, S.N., et al., *Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women*. J Nutr, 1991. **121**(4): p. 547-55.
212. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells*. N Engl J Med, 1989. **320**(5): p. 265-71.
213. Kim, Y.I., *Short-chain fatty acids in ulcerative colitis*. Nutr Rev, 1998. **56**(1 Pt 1): p. 17-24.
214. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1557-60.
215. Bergstrand, O. and G. Hellers, *Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1983. **18**(7): p. 903-6.
216. Acheson, E.D. and S.C. True Love, *Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls*. Br Med J, 1961. **2**(5257): p. 929-33.
217. Hennet, T., A. Weiss, and L. Borsig, *Decoding breast milk oligosaccharides*. Swiss Med Wkly, 2014. **144**: p. w13927.
218. Penttila, I.A., *Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response*. J Pediatr, 2010. **156**(2 Suppl): p. S21-5.
219. Vidal, K. and A. Donnet-Hughes, *CD14: a soluble pattern recognition receptor in milk*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 195-216.
220. Cleary, T.G., *Human milk protective mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 145-54.
221. Bergmann, H., et al., *Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report*. Br J Nutr, 2014. **112**(7): p. 1119-28.

222. Tanabe, S., *Short peptide modules for enhancing intestinal barrier function*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(6): p. 776-81.
223. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. *Nutr Rev*, 2013. **71**(1): p. 60-5.
224. Binder, J.H., et al., *Intolerance to milk in ulcerative colitis. A preliminary report*. *Am J Dig Dis*, 1966. **11**(11): p. 858-64.
225. Lerner, A., et al., *Serum antibodies to cow's milk proteins in pediatric inflammatory bowel disease: Crohn's disease vs. ulcerative colitis*. *Acta Paediatr Scand*, 1989. **78**(1): p. 81-6.
226. Harries, A.D., A. Baird, and J. Rhodes, *Non-smoking: a feature of ulcerative colitis*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982. **284**(6317): p. 706.
227. Rampton, D.S., *Smoking and ulcerative colitis*. *Lancet*, 1984. **1**(8369): p. 168.
228. Srivasta, E.D., et al., *Smoking and ulcerative colitis: a community study*. *Int J Colorectal Dis*, 1993. **8**(2): p. 71-4.
229. Franceschi, S., et al., *Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking*. *Am J Epidemiol*, 1987. **125**(3): p. 445-52.
230. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. A case-control study*. *Scand J Gastroenterol*, 1987. **22**(9): p. 1130-6.
231. Benoni, C. and A. Nilsson, *Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 1984. **19**(6): p. 824-30.
232. Cottone, M., et al., *Smoking habits and recurrence in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(3): p. 643-8.
233. Sher, M.E., et al., *The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 1999. **5**(2): p. 73-8.
234. Motley, R.J., et al., *Smoking, eicosanoids and ulcerative colitis*. *J Pharm Pharmacol*, 1990. **42**(4): p. 288-9.
235. van Dijk, A.P., et al., *Transdermal nicotine inhibits interleukin 2 synthesis by mononuclear cells derived from healthy volunteers*. *Eur J Clin Invest*, 1998. **28**(8): p. 664-71.
236. Rutgeerts, P., et al., *Appendectomy protects against ulcerative colitis*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(5): p. 1251-3.
237. Mizoguchi, A., et al., *Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 707-15.
238. Duggan, A.E., et al., *Appendicectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study*. *Gut*, 1998. **43**(4): p. 494-8.
239. Ekbohm, A., *Appendicectomy and childhood hygiene: different sides of the same coin?* *Gut*, 1998. **43**(4): p. 451.
240. Radford-Smith, G.L., et al., *Protective role of appendicectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 808-13.
241. Cosnes, J., et al., *Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis*. *Gut*, 2002. **51**(6): p. 803-7.

242. Cosnes, J., et al., *Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(8): p. 1235-42.
243. Mahida, Y.R., *Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 241-53.
244. Booth, C. and C.S. Potten, *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1493-9.
245. Pacha, J., V. Lisa, and I. Miksik, *Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine*. Steroids, 2002. **67**(2): p. 119-26.
246. Watanabe, S., et al., *Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors*. J Gastroenterol, 2014. **49**(2): p. 270-82.
247. Liao, Y. and B. Lonnerdal, *Beta-catenin/TCF4 transactivates miR-30e during intestinal cell differentiation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2969-78.
248. Koo, B.K., et al., *Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2009. **137**(1): p. 145-55, 155 e1-3.
249. Crosnier, C., D. Stamataki, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(5): p. 349-59.
250. Melmed, G., et al., *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
251. Abreu, M.T., et al., *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
252. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
253. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
254. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
255. Hershberg, R.M., *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(4): p. G833-9.
256. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
257. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
258. Bocker, U., et al., *Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(1): p. 25-32.

259. Suzuki, M., T. Hisamatsu, and D.K. Podolsky, *Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex*. *Infect Immun*, 2003. **71**(6): p. 3503-11.
260. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20431-7.
261. Bambou, J.C., et al., *In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42984-92.
262. Nandakumar, N.S., et al., *Effect of Vibrio cholerae on chemokine gene expression in HT29 cells and its modulation by Lactobacillus GG*. *Scand J Immunol*, 2009. **69**(3): p. 181-7.
263. Tallant, T., et al., *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*. *BMC Microbiol*, 2004. **4**: p. 33.
264. Ewaschuk, J.B., et al., *Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA*. *Infect Immun*, 2007. **75**(5): p. 2572-9.
265. Akhtar, M., et al., *Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway*. *FASEB J*, 2003. **17**(10): p. 1319-21.
266. Steenholdt, C., et al., *Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(2): p. 195-204.
267. Pedersen, G., et al., *Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **141**(2): p. 298-306.
268. Rumio, C., et al., *Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(2): p. 373-81.
269. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
270. Jijon, H.B., et al., *MAP kinases contribute to IL-8 secretion by intestinal epithelial cells via a posttranscriptional mechanism*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C31-41.
271. Haller, D., et al., *IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38168-78.
272. Vora, P., et al., *Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5398-405.

273. Lee, J., et al., *Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1327-36.
274. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(4): p. 1054-70.
275. Bank, S., *A cohort of anti-TNF treated Danish patients with inflammatory bowel disease, used for identifying genetic markers associated with treatment response*. *Dan Med J*, 2015. **62**(5).
276. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
277. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
278. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(1): p. 9-20.
279. Rosenstiel, P., et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
280. Berrebi, D., et al., *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. *Gut*, 2003. **52**(6): p. 840-6.
281. Stockinger, S., et al., *IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7416-25.
282. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
283. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
284. Wilson, C.L., et al., *Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense*. *Science*, 1999. **286**(5437): p. 113-7.
285. Garabedian, E.M., et al., *Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(38): p. 23729-40.
286. Knoop, K.A., M.J. Miller, and R.D. Newberry, *Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(2): p. 112-8.
287. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. *Science*, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
288. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
289. Hart, A.L., et al., *Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria*. *Gut*, 2004. **53**(11): p. 1602-9.
290. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.

291. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
292. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. *Immunity*, 2008. **28**(1): p. 29-39.
293. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober, *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(11): p. 1297-306.
294. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(6): p. 641-9.
295. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. *J Leukoc Biol*, 1994. **55**(5): p. 662-75.
296. Menezes, J.S., et al., *Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system*. *Int Immunol*, 2003. **15**(3): p. 447-55.
297. Umesaki, Y., et al., *Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus*. *Immunology*, 1993. **79**(1): p. 32-7.
298. Komano, H., et al., *Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(13): p. 6147-51.
299. Roberts, S.J., et al., *T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11774-9.
300. Kuhl, A.A., et al., *Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 168-75.
301. Giacomelli, R., et al., *Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **98**(1): p. 83-8.
302. Mayans, S., et al., *alphabetaT cell receptors expressed by CD4(-)CD8alphabeta(-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities*. *Immunity*, 2014. **41**(2): p. 207-218.
303. Cheroutre, H., F. Lambolez, and D. Mucida, *The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(7): p. 445-56.
304. Masopust, D., et al., *Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection*. *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2348-56.
305. Tajima, M., et al., *IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells*. *J Exp Med*, 2008. **205**(5): p. 1019-27.
306. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. *Gut*, 2002. **50**(3): p. 307-13.

307. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
308. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* *Gut*, 2006. **55**(3): p. 342-7.
309. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
310. Sun, Y., et al., *Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo*. *Gut*, 2004. **53**(3): p. 362-7.
311. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **286**(3): p. G367-76.
312. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(11): p. 1739-47.
313. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 7010-7.
314. Rhee, S.H., et al., *Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13610-5.
315. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 50-65.
316. Baumgart, D.C., et al., *Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells*. *Gut*, 2005. **54**(2): p. 228-36.
317. Papadakis, K.A., et al., *Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9⁺ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4985-90.
318. Cruickshank, S.M., et al., *Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 678-84.
319. van de Wal, Y., et al., *Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(5): p. 1420-31.
320. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
321. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
322. Martin, B., et al., *Suppression of CD4⁺ T lymphocyte effector functions by CD4⁺CD25⁺ cells in vivo*. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3391-8.

323. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
324. Goebel, S., et al., *VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(4): p. G648-54.
325. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
326. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease*. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 701-9.
327. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(43): p. 36099-109.
328. Leeb, S.N., et al., *Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1341-54.
329. Keshavarzian, A., et al., *Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(5): p. 720-8.
330. Sparberg, M., J. Fennessy, and J.B. Kirsner, *Ulcerative proctitis and mild ulcerative colitis: A study of 220 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 1966. **45**(5): p. 391-412.
331. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
332. Kotler, D.P., *Cachexia*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(8): p. 622-34.
333. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. *J Infect Dis*, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
334. Gasche, C., et al., *Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency*. *Dig Dis Sci*, 1994. **39**(9): p. 1930-4.
335. Dyer, N.H. and A.M. Dawson, *Malnutrition and malabsorption in Crohn's disease with reference to the effect of surgery*. *Br J Surg*, 1973. **60**(2): p. 134-40.
336. Dyer, N.H., et al., *Anaemia in Crohn's disease*. *Q J Med*, 1972. **41**(164): p. 419-36.
337. Means, R.T., Jr., *Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases*. *Curr Opin Hematol*, 1995. **2**(3): p. 210-3.
338. Schreiber, S., et al., *Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(10): p. 619-23.
339. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 649-63.
340. Gumaste, V., et al., *Coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis*. *Dig Dis Sci*, 1989. **34**(9): p. 1457-61.

341. Bell, D.W., et al., *Ulcerative colitis complicated by autoimmune hemolytic anemia*. South Med J, 1981. **74**(3): p. 359-61.
342. Altman, A.R., C. Maltz, and H.D. Janowitz, *Autoimmune hemolytic anemia in ulcerative colitis: report of three cases, review of the literature, and evaluation of modes of therapy*. Dig Dis Sci, 1979. **24**(4): p. 282-5.
343. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
344. Loftus, E.V., Jr., et al., *Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(9): p. 2308-12.
345. Connell, W.R., et al., *Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease*. Lancet, 1994. **343**(8908): p. 1249-52.
346. Caspi, O., et al., *The association of inflammatory bowel disease and leukemia--coincidence or not?* Leuk Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 255-62.
347. Gupta, R.B., et al., *Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1099-105; quiz 1340-1.
348. Itzkowitz, S.H. and N. Harpaz, *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1634-48.
349. Rutter, M., et al., *Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 451-9.
350. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
351. Ahmed, A., et al., *Intestinal glucocorticoid synthesis enzymes in pediatric inflammatory bowel disease patients*. Genes Immun, 2019.
352. Coste, A., et al., *LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13098-103.
353. Huang, S.C., C.T. Lee, and B.C. Chung, *Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis*. Sci Signal, 2014. **7**(314): p. ra20.
354. Kostadinova, F., et al., *Why does the gut synthesize glucocorticoids?* Ann Med, 2014. **46**(7): p. 490-7.
355. Zbankova, S., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 expression in colon from patients with ulcerative colitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(7): p. 1019-23.
356. Baschant, U., N.E. Lane, and J. Tuckermann, *The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(11): p. 645-55.
357. Ford, A.C., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 590-9; quiz 600.

358. Faubion, W.A., Jr., et al., *The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study*. *Gastroenterology*, 2001. **121**(2): p. 255-60.
359. Chan, M.T., et al., *Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **101**(5): p. 594-601.
360. Duffy, D.L., et al., *Genetics of asthma and hay fever in Australian twins*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1351-8.
361. Dubois-Camacho, K., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(36): p. 6628-6638.
362. Maranville, J.C., et al., *In vitro sensitivity assays and clinical response to glucocorticoids in patients with inflammatory bowel disease*. *J Crohns Colitis*, 2014. **8**(11): p. 1539-47.
363. Manz, M., et al., *Therapy of steroid-resistant inflammatory bowel disease*. *Digestion*, 2012. **86 Suppl 1**: p. 11-5.
364. Kuenzig, M.E., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. **8**: p. CD002913.
365. Steinhart, A.H., et al., *Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(4): p. CD000301.
366. Benchimol, E.I., et al., *Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(1): p. CD002913.
367. Schoon, E.J., *Budesonide: a useful tool in the maintenance treatment of Crohn's disease?* *Neth J Med*, 2007. **65**(9): p. 316-7.
368. Rutgeerts, P., S. Vermeire, and G. Van Assche, *Mucosal healing in inflammatory bowel disease: impossible ideal or therapeutic target?* *Gut*, 2007. **56**(4): p. 453-5.
369. Gonvers, J.J., et al., *Maintenance of remission in Crohn's disease*. *Digestion*, 2005. **71**(1): p. 41-8.
370. Brookes, M.J. and J.R. Green, *Maintenance of remission in Crohn's disease: current and emerging therapeutic options*. *Drugs*, 2004. **64**(10): p. 1069-89.
371. Yang, Y.X. and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids in Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(4): p. 803-23.
372. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. Unit 15 25.
373. Eichele, D.D. and K.K. Kharbanda, *Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(33): p. 6016-6029.
374. Heller, F., et al., *Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells*. *Immunity*, 2002. **17**(5): p. 629-38.
375. Antoniou, E., et al., *The TNBS-induced colitis animal model: An overview*. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016. **11**: p. 9-15.
376. Mizoguchi, A., et al., *Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease*. *J Pathol*, 2016. **238**(2): p. 205-19.

377. Van Der Kraak, L., P. Gros, and N. Beauchemin, *Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes?* World J Gastroenterol, 2015. **21**(41): p. 11688-99.
378. Bamias, G., K.O. Arseneau, and F. Cominelli, *Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine.* Curr Opin Gastroenterol, 2017. **33**(6): p. 411-416.
379. Boismenu, R. and Y. Chen, *Insights from mouse models of colitis.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 267-78.
380. Sameer, A.S. and S. Nissar, *Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer.* Mol Biol Res Commun, 2016. **5**(1): p. 49-57.
381. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
382. Rao, C.V. and H.Y. Yamada, *Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 130.
383. Viennois, E., F. Chen, and D. Merlin, *NF-kappaB pathway in colitis-associated cancers.* Transl Gastrointest Cancer, 2013. **2**(1): p. 21-29.
384. Beaugerie, L. and S.H. Itzkowitz, *Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease.* N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 195.
385. Jess, T., et al., *Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years.* Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 375-81 e1; quiz e13-4.
386. Herrinton, L.J., et al., *Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010.* Gastroenterology, 2012. **143**(2): p. 382-9.
387. Matkowskyj, K.A., et al., *Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease: molecular pathogenesis to morphology.* Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(3): p. 338-50.
388. Robles, A.I., et al., *Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers.* Gastroenterology, 2016. **150**(4): p. 931-43.
389. Chang, W.C., et al., *Loss of p53 enhances the induction of colitis-associated neoplasia by dextran sulfate sodium.* Carcinogenesis, 2007. **28**(11): p. 2375-81.
390. Koch, S., *Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine.* Differentiation, 2017. **97**: p. 1-8.
391. Landskron, G., et al., *Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment.* J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 149185.
392. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
393. Foran, E., et al., *Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6.* Mol Cancer Res, 2010. **8**(4): p. 471-81.
394. Hartnett, L. and L.J. Egan, *Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer.* Carcinogenesis, 2012. **33**(4): p. 723-31.

395. Yang, L., N. Belaguli, and D.H. Berger, *MicroRNA and colorectal cancer*. World J Surg, 2009. **33**(4): p. 638-46.
396. Grivennikov, S.I., *Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(2): p. 229-44.
397. Kuraishy, A., M. Karin, and S.I. Grivennikov, *Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 467-77.
398. Al Bakir, I., K. Curtius, and T.A. Graham, *From Colitis to Cancer: An Evolutionary Trajectory That Merges Maths and Biology*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2368.
399. Irrazabal, T., et al., *The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer*. Mol Cell, 2014. **54**(2): p. 309-20.
400. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
401. Waldner, M.J. and M.F. Neurath, *Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015. **1**(1): p. 6-16.
402. Luo, C. and H. Zhang, *The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 5126048.
403. Davies, J.M., R. Santaolalla, and M.T. Abreu, *Use of Cancer Stem Cells to Investigate the Pathogenesis of Colitis-associated Cancer*. Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(4): p. 976-83.
404. Atreya, R. and M.F. Neurath, *Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(3): p. 187-96.
405. Becker, C., et al., *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 491-501.
406. Sangha, S., M. Yao, and M.M. Wolfe, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer prevention*. Postgrad Med J, 2005. **81**(954): p. 223-7.
407. De Simone, V., et al., *Role of TH17 cytokines in the control of colorectal cancer*. Oncoimmunology, 2013. **2**(12): p. e26617.
408. Danese, S., A. Malesci, and S. Vetrano, *Colitis-associated cancer: the dark side of inflammatory bowel disease*. Gut, 2011. **60**(12): p. 1609-10.
409. Hyun, Y.S., et al., *Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(4): p. 931-6.
410. Tong, Z., et al., *A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34959.
411. Stolfi, C., et al., *Involvement of interleukin-21 in the regulation of colitis-associated colon cancer*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2279-90.
412. Jauch, D., et al., *Interleukin 21 controls tumour growth and tumour immunosurveillance in colitis-associated tumorigenesis in mice*. Gut, 2011. **60**(12): p. 1678-86.
413. Mizoguchi, A., *Healing of intestinal inflammation by IL-22*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(9): p. 1777-84.

414. Jiang, R., et al., *IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 59.
415. Uronis, J.M., et al., *Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6026.
416. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1869-81.
417. Couturier-Maillard, A., et al., *NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 700-11.
418. Sidler, D., et al., *Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids*. Oncogene, 2011. **30**(21): p. 2411-9.
419. Schoonjans, K., et al., *Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2058-62.
420. Lin, K.T. and L.H. Wang, *New dimension of glucocorticoids in cancer treatment*. Steroids, 2016. **111**: p. 84-88.
421. Keith, B.D., *Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 84.
422. Drebert, Z., et al., *Glucocorticoids indirectly decrease colon cancer cell proliferation and invasion via effects on cancer-associated fibroblasts*. Exp Cell Res, 2018. **362**(2): p. 332-342.
423. He, J., et al., *Dexamethasone affects cell growth/apoptosis/chemosensitivity of colon cancer via glucocorticoid receptor alpha/NF-kappaB*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 67670-67683.
424. Zhang, L., et al., *Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration*. FEBS Lett, 2010. **584**(22): p. 4646-54.
425. Zhang, C., et al., *Dexamethasone desensitizes hepatocellular and colorectal tumours toward cytotoxic therapy*. Cancer Lett, 2006. **242**(1): p. 104-11.
426. Mitre-Aguilar, I.B., A.J. Cabrera-Quintero, and A. Zentella-Dehesa, *Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 1-10.
427. Parang, B., C.W. Barrett, and C.S. Williams, *AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer*. Methods Mol Biol, 2016. **1422**: p. 297-307.
428. Boivin, M.A., et al., *Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G590-8.
429. Wild, G.E., et al., *The mechanisms of prednisone inhibition of inflammation in Crohn's disease involve changes in intestinal permeability, mucosal TNFalpha production and nuclear factor kappa B expression*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(3): p. 309-17.
430. Ocon, B., et al., *The glucocorticoid budesonide has protective and deleterious effects in experimental colitis in mice*. Biochem Pharmacol, 2016. **116**: p. 73-88.

431. Chinenov, Y. and I. Rogatsky, *Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **275**(1-2): p. 30-42.
432. Das, I., et al., *Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins*. *J Exp Med*, 2013. **210**(6): p. 1201-16.
433. Barclay, G.R. and L.A. Turnberg, *Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum*. *Gastroenterology*, 1988. **94**(4): p. 994-8.
434. Saunders, P.R., et al., *Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G794-9.
435. Soderholm, J.D., et al., *Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(6): p. G1257-63.
436. Sandle, G.I. and H.J. Binder, *Corticosteroids and intestinal ion transport*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(1): p. 188-96.
437. Barreau, F., et al., *Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats*. *Gut*, 2004. **53**(4): p. 501-6.
438. Veenema, A.H., et al., *Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice*. *Endocrinology*, 2008. **149**(6): p. 2727-36.
439. Wilson, L.M. and A.L. Baldwin, *Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa*. *Microcirculation*, 1999. **6**(3): p. 189-98.
440. Jorge, E., et al., *Functional changes induced by psychological stress are not enough to cause intestinal inflammation in Sprague-Dawley rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 2010. **22**(8): p. e241-50.
441. Santos, J., et al., *Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. G391-9.
442. Soderholm, J.D. and M.H. Perdue, *Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **280**(1): p. G7-G13.
443. Finnie, I.A., et al., *Stimulation of colonic mucin synthesis by corticosteroids and nicotine*. *Clin Sci (Lond)*, 1996. **91**(3): p. 359-64.
444. Meddings, J.B. and M.G. Swain, *Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(4): p. 1019-28.
445. de Punder, K. and L. Pruimboom, *Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 223.
446. Spitz, J., et al., *The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence*. *Gastroenterology*, 1994. **106**(1): p. 35-41.
447. Spitz, J.C., et al., *Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress*. *Crit Care Med*, 1996. **24**(4): p. 635-41.

448. Farzi, A., E.E. Frohlich, and P. Holzer, *Gut Microbiota and the Neuroendocrine System*. Neurotherapeutics, 2018. **15**(1): p. 5-22.
449. Bailey, M.T., et al., *Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1509-19.
450. Morris, D.J. and A.S. Brem, *Role of gut metabolism of adrenal corticosteroids and hypertension: clues gut-cleansing antibiotics give us*. Physiol Genomics, 2019. **51**(3): p. 83-89.
451. Galand, G., *Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications*. Comp Biochem Physiol B, 1989. **94**(1): p. 1-11.
452. Jacomino, M., P. Shukla, and S.J. Henning, *Use of amphotropic retroviral vectors for gene transfer in human colon carcinoma cells*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(7): p. 835-41.
453. Yaylaoglu, M.B., et al., *Diverse patterns of cell-specific gene expression in response to glucocorticoid in the developing small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(6): p. G1041-50.
454. Aszterbaum, M., et al., *Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2703-8.
455. Sheu, H.M., et al., *Modulation of epidermal terminal differentiation in patients after long-term topical corticosteroids*. J Dermatol, 1991. **18**(8): p. 454-64.
456. Bayo, P., et al., *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1377-88.
457. Kao, J.S., et al., *Short-term glucocorticoid treatment compromises both permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity: inhibition of epidermal lipid synthesis accounts for functional abnormalities*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(3): p. 456-64.
458. Pascussi, J.M., et al., *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(1): p. 42-55.
459. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
460. Bamforth, S.D., et al., *A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 12)**: p. 1879-88.
461. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1031-49.
462. Felinski, E.A., et al., *Glucocorticoids induce transactivation of tight junction genes occludin and claudin-5 in retinal endothelial cells via a novel cis-element*. Exp Eye Res, 2008. **86**(6): p. 867-78.

463. Forster, C., *Tight junctions and the modulation of barrier function in disease*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(1): p. 55-70.
464. Burek, M. and C.Y. Forster, *Cloning and characterization of the murine claudin-5 promoter*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **298**(1-2): p. 19-24.
465. Gavard, J., *Breaking the VE-cadherin bonds*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(1): p. 1-6.
466. Blecharz, K.G., D. Drenckhahn, and C.Y. Forster, *Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008. **28**(6): p. 1139-49.
467. Salvador, E., S. Shityakov, and C. Forster, *Glucocorticoids and endothelial cell barrier function*. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(3): p. 597-605.
468. Pitzalis, C., N. Pipitone, and M. Perretti, *Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **966**: p. 108-18.
469. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
470. Pitzalis, C., et al., *Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect*. *J Immunol*, 1997. **158**(10): p. 5007-16.
471. Anacker, C., et al., *The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?* *Psychoneuroendocrinology*, 2011. **36**(3): p. 415-25.
472. Schacke, H., W.D. Docke, and K. Asadullah, *Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids*. *Pharmacol Ther*, 2002. **96**(1): p. 23-43.
473. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(12): p. 1878-86.
474. Martens, B. and Z. Drebert, *Glucocorticoid-mediated effects on angiogenesis in solid tumors*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019. **188**: p. 147-155.
475. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(10): p. 2818-24.
476. Kim, K.D., et al., *Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(3): p. 426-34.
477. Rozkova, D., et al., *Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors*. *Clin Immunol*, 2006. **120**(3): p. 260-71.
478. Cumberbatch, M., R.J. Dearman, and I. Kimber, *Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals*. *Immunopharmacology*, 1999. **41**(3): p. 235-43.
479. Kitajima, T., et al., *A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(1): p. 142-7.
480. Matyszak, M.K., et al., *Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(4): p. 1233-42.

481. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1435-40.
482. Chamorro, S., et al., *TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program*. *J Immunol*, 2009. **183**(5): p. 2984-94.
483. Pedersen, A.E., et al., *Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D3-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID T-cell transfer model*. *Immunology*, 2009. **127**(3): p. 354-64.
484. Xie, Y., et al., *Glucocorticoids inhibit macrophage differentiation towards a pro-inflammatory phenotype upon wounding without affecting their migration*. *Dis Model Mech*, 2019. **12**(5).
485. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 707-21.
486. Varga, G., et al., *Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(3): p. 644-50.
487. Stroncek, D.F., et al., *Administration of G-CSF plus dexamethasone produces greater granulocyte concentrate yields while causing no more donor toxicity than G-CSF alone*. *Transfusion*, 2001. **41**(8): p. 1037-44.
488. Lowenberg, M., et al., *Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn*. *Blood*, 2005. **106**(5): p. 1703-10.
489. Lowenberg, M., et al., *Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(10): p. 1023-9.
490. Brewer, J.A., et al., *T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation*. *Nat Med*, 2003. **9**(10): p. 1318-22.
491. Baschant, U. and J. Tuckermann, *The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. **120**(2-3): p. 69-75.
492. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(3): p. 859-69.
493. Kang, Y., et al., *Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5172-6.
494. Liberman, A.C., et al., *Regulatory and Mechanistic Actions of Glucocorticoids on T and Inflammatory Cells*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 235.
495. Noti, M., D. Sidler, and T. Brunner, *Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean?* *Semin Immunopathol*, 2009. **31**(2): p. 237-48.
496. Barreto, M., et al., *Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants*. *BMC Immunol*, 2009. **10**: p. 5.
497. Whitacre, C.C., *Sex differences in autoimmune disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 777-80.

498. Goodman, W.A., et al., *Loss of estrogen-mediated immunoprotection underlies female gender bias in experimental Crohn's-like ileitis*. *Mucosal Immunol*, 2014. **7**(5): p. 1255-65.
499. Bouman, A., M.J. Heineman, and M.M. Faas, *Sex hormones and the immune response in humans*. *Hum Reprod Update*, 2005. **11**(4): p. 411-23.
500. Berkowitz, D.M. and G.S. Martin, *Sepsis and sex: can we look beyond our hormones?* *Chest*, 2007. **132**(6): p. 1725-7.
501. Duma, D., et al., *Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence*. *Sci Signal*, 2010. **3**(143): p. ra74.
502. Mittelstadt, P.R., J.P. Monteiro, and J.D. Ashwell, *Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(7): p. 2384-94.
503. el Marjou, F., et al., *Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium*. *Genesis*, 2004. **39**(3): p. 186-93.
504. Indra, A.K., et al., *Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(22): p. 4324-7.
505. Weigmann, B., et al., *Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(10): p. 2307-11.
506. Denning, T.L., et al., *Mouse TCRalpha+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4230-9.
507. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
508. Mucida, D., et al., *Transcriptional reprogramming of mature CD4(+) helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(3): p. 281-9.
509. Vilaseca, J., et al., *Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis*. *Gut*, 1990. **31**(5): p. 539-44.
510. Trapnell, C., L. Pachter, and S.L. Salzberg, *TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1105-11.
511. Lawrence, M., et al., *Software for computing and annotating genomic ranges*. *PLoS Comput Biol*, 2013. **9**(8): p. e1003118.
512. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
513. Thomas, P.D., et al., *PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function*. *Genome Res*, 2003. **13**(9): p. 2129-41.
514. Pierdominici, M., et al., *Linking estrogen receptor beta expression with inflammatory bowel disease activity*. *Oncotarget*, 2015. **6**(38): p. 40443-51.

515. Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro, *Crosstalk of tight junction components with signaling pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 729-56.
516. Morgan, R.G., E. Mortensson, and A.C. Williams, *Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: therapeutic gold or too plastic?* *Br J Cancer*, 2018. **118**(11): p. 1410-1418.
517. Bresalier, R.S., et al., *A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(3): p. 741-8.
518. Fritsch Fredin, M., et al., *The application and relevance of ex vivo culture systems for assessment of IBD treatment in murine models of colitis*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(3-4): p. 222-31.
519. Sann, H., et al., *Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice*. *Life Sci*, 2013. **92**(12): p. 708-18.
520. van Meeteren, M.E., M.A. Meijssen, and F.J. Zijlstra, *The effect of dexamethasone treatment on murine colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(5): p. 517-21.
521. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
522. Hansberry, D.R., et al., *Fecal Myeloperoxidase as a Biomarker for Inflammatory Bowel Disease*. *Cureus*, 2017. **9**(1): p. e1004.
523. Martinez-Augustin, O., et al., *Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(1): p. 114-27.
524. Fischer, A., et al., *Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. **306**(3): p. G218-28.
525. Wu, T., et al., *Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats*. *Life Sci*, 2018. **192**: p. 173-182.
526. Bjorck, S., et al., *Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate-induced colitis in rats*. *Dig Dis Sci*, 1997. **42**(4): p. 824-32.
527. Krzesiek, E., *Fecal Calprotectin as an Activity Marker of Inflammatory Bowel Disease in Children*. *Adv Clin Exp Med*, 2015. **24**(5): p. 815-22.
528. Lee, M.J., et al., *Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e38801.
529. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1042-9.
530. Olivares-Villagomez, D. and L. Van Kaer, *Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier*. *Trends Immunol*, 2018. **39**(4): p. 264-275.

531. Stidham, R.W. and P.D.R. Higgins, *Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease*. Clin Colon Rectal Surg, 2018. **31**(3): p. 168-178.
532. Rutka, M., et al., *Diagnostic Accuracy of Five Different Fecal Markers for the Detection of Precancerous and Cancerous Lesions of the Colorectum*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 2492081.
533. Vannini, F., K. Kashfi, and N. Nath, *The dual role of iNOS in cancer*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 334-343.
534. Wu, Q.B. and G.P. Sun, *Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(20): p. 6206-14.
535. Villarejo, A., et al., *Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 930-41.
536. Cai, J., et al., *Tumor-Associated Macrophages Derived TGF-betaInduced Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells through Smad2,3-4/Snail Signaling Pathway*. Cancer Res Treat, 2019. **51**(1): p. 252-266.
537. Ji, Y., et al., *C/EBPbeta Promotion of MMP3-Dependent Tumor Cell Invasion and Association with Metastasis in Colorectal Cancer*. Genet Test Mol Biomarkers, 2018. **22**(1): p. 5-10.